

1.	Einleitung	1
1.1	Die Problematik hormonell aktiver Substanzen in Gewässern	1
1.2	Die Notwendigkeit und Vielfältigkeit biologischer Nachweissysteme zur Erfassung hormoneller Aktivität	3
1.3	Der Einsatz von <i>In vivo</i> -Biotests zur Erfassung hormoneller Aktivität im Gesamtorganismus.....	4
1.4	<i>In vitro</i> - und <i>In vivo</i> -Nachweissysteme für östrogenaktive Substanzen	4
1.4.1	Der Yeast Estrogen Screen.....	4
1.4.2	293-ER-Luciferase Assay mit menschlichen embryonalen Nierenzellen	5
1.4.3	Vitellogenin-mRNA-Synthese <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	5
1.5	Der Einsatz der Dickkopfritze (<i>Pimephales promelas</i>) in Fischtestsystemen auf endokrine Wirkung.....	6
1.6	Der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfritze	7
1.7	Ziele und Fragestellung der Dissertation.....	7
2.	Material und Methoden	9
2.1	Vitellogenin-mRNA in Primärhepatocyten der Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	9
2.1.1	Chemikalien und Vg 1.1 Plasmid.....	9
2.1.2	Spendertiere.....	9
2.1.3	Hepatocytenisolation	9
2.1.4	Belastung der Primärhepatocyten.....	10
2.1.5	Zellernte und RNA-Isolation	10
2.1.6	Analyse der Vitellogenin-mRNA im Dot Blot/RNase Protection Assay	11
2.1.7	RT-PCR-Analyse der Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-mRNA	11
2.1.8	Berechnungen und statistische Auswertung.....	12
2.2	Östrogene Aktivität von festphasenextrahierten Wasserproben.....	12
2.2.1	Probestellen	12
2.2.2	Festphasenextraktion der Wasserproben	14
2.2.3	Verbleibende östrogene Aktivität von Wasserproben nach Festphasenextraktion	15
2.2.4	Extrahierte Wasserproben im Yeast Estrogen Screen	15

2.3	Kombinierte <i>In vitro</i>- und <i>In situ</i>-Experimente zur Abschätzung der östrogenen Aktivität von Umweltwasserproben	16
2.3.1	Probestellen	16
2.3.2	Fische	16
2.3.3	<i>In situ</i> -Exposition von Regenbogenforellen.....	16
2.3.4	Isolierung und Quantifizierung der Vitellogenin-mRNA in exponierten Regenbogenforellen.....	17
2.3.5	Wasserprobenahme für Biotests.....	18
2.3.6	Wasserextraktproben in der Primärhepatocyten der Regenbogenforelle	18
2.3.7	293-ER α - und 293-ER β -Luciferase Assay	18
2.3.8	Chemische Analyse einer repräsentativen Wasserprobe.....	19
2.4	Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze.....	20
2.4.1	Chemikalien	20
2.4.2	Herkunft und Hälterung der Versuchstiere	20
2.4.3	Versuchsbedingungen	20
2.4.4	Ermittlung des Konditionsfaktors	21
2.4.5	Ermittlung des gonadosomatischen Indexes	21
2.4.6	Sekundäre Geschlechtsmerkmale.....	22
2.4.7	Plasmavitellogenin	22
2.4.8	Reproduktionsversuche, Eizahl und Befruchtungsrate.....	22
2.4.9	Histopathologie	23
2.4.10	Statistische Auswertung	24
2.5	Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze im Freiland.....	24
2.5.1	Ausgewählter Standort und Exposition der Fische	24
2.5.2	Probenahme.....	25
2.5.3	Statistische Auswertung	25
3.	Ergebnisse	27
3.1	Temperaturabhängige Vitellogenin-mRNA-Expression in Primärhepatocytenkulturen der Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) bei 14 und 18 °C	27
3.1.1	Einleitung	27
3.1.2	Vitellogenin-mRNA-Expression bei 14 und 18 °C im Dot Blot/RNase Protection Assay	27
3.1.3	Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-Genexpression bei 14 und 18 °C in der RT-PCR.....	31
3.1.4	Diskussion	33
3.2	Östrogene Aktivität von festphasenextrahierten Wasserproben zweier kommunaler Kläranlagenabwässer und Rheinwasser im Yeast Estrogen Screen	37
3.2.1	Einleitung	37

3.2.2	Östrogene Aktivität kommunaler Kläranlagenabwasser- und Rheinwasserproben nach Festphasenextraktion	37
3.2.3	Verbleibende östrogene Aktivität von gespiketen Wasserproben nach Umkehrphasen-C ₁₈ Festphasenextraktion	39
3.2.4	Diskussion	42
3.2.5	Ausblick und notwendige weiterführende Untersuchungen.....	44
3.3	Kombinierte <i>In vitro</i>- und <i>In situ</i>-Experimente zur Bestimmung der östrogenen Aktivität von Umweltwasserproben	46
3.3.1	Einleitung	46
3.3.2	Östrogene Aktivität festphasenextrahierter Kläranlagenabwässer im Yeast Estrogen Screen	47
3.3.3	Östrogenität von Wasserextrakten in 293 HEK-Zellen.....	50
3.3.4	Vitellogenin-mRNA-Induktion in Primärzellkulturen der Regenbogenforelle.....	51
3.3.5	Vitellogenin-mRNA-Induktion in <i>in situ</i> exponierten Regenbogenforellen	54
3.3.6	Chemische Analyse von Östrogenen, Fecal- und Phytosteroiden, resorcyclischen Lactonen und Flavanoiden in repräsentativen Wasserproben der untersuchten Standorte	56
3.3.7	Diskussion	58
3.3.8	Ausblick	63
3.4	Effekte von 17α-Ethinylestradiol im Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze (<i>Pimephales promelas</i>)	64
3.4.1	Einleitung	64
3.4.2	Konditionsfaktor und Gonadenwachstum	65
3.4.3	Sekundäre Geschlechtsmerkmale.....	66
3.4.4	Plasmavitellogenin	67
3.4.5	Eiproduktion und Befruchtungsrate	68
3.4.6	Histopathologie der Gonaden.....	70
3.4.7	Histopathologische Untersuchungen der Leber	75
3.4.8	Diskussion	82
3.4.9	Ausblick	85
3.5	Effekte von 17α-Methyltestosteron im Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze (<i>Pimephales promelas</i>)	87
3.5.1	Einleitung	87
3.5.2	Konditionsfaktor und Gonadenwachstum	88
3.5.3	Sekundäre Geschlechtsmerkmale.....	89
3.5.4	Plasmavitellogenin	91
3.5.5	Eiproduktion und Befruchtungsrate	92
3.5.6	Histopathologie der Gonaden.....	93
3.5.7	Diskussion	97
3.5.8	Ausblick	102

3.6	Effekte von kommunalem Kläranlagenabwasser auf adulte Dickkopfelritzen (<i>Pimephales promelas</i>) im Gonadal Recrudescence Assay	103
3.6.1	Einleitung	104
3.6.2	Konditionsfaktor und Gonadenwachstum	104
3.6.3	Sekundäre Geschlechtsmerkmale	105
3.6.4	Plasmavitellogenin	106
3.6.5	Histopathologie der Gonaden	107
3.6.6	Diskussion	111
4.	Abschlussdiskussion	115
4.1	Vergleichbarkeit von Daten aus <i>In vitro</i>- und <i>In vivo</i>-Biotests und chemischer Analytik	115
4.2	Eignung des Gonadal Recrudescence Assays mit der Dickkopfelritze zum Nachweis hormonaktiver Substanzen im Fisch	116
4.3	Mögliche Gefährdung einheimischer Fische durch hormonaktive Substanzen kommunaler Kläranlagenabwässer	119
4.4	Weiterführende Schutzmaßnahmen im Hinblick auf hormonaktive Substanzen in der aquatischen Umwelt	120
5.	Zusammenfassung	123
6.	Literatur	125
7.	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	137

1. Einleitung

Zusammenfassung

Zahlreiche natürliche und anthropogene Substanzen sind in der Lage, störend auf das Hormonsystem von Mensch und Tier einzuwirken. Diese sogenannten „Endocrine Disruptors“ stehen im Verdacht, bei Tieren für Entwicklungsstörungen, Geschlechterschiebungen und Reproduktionsstörungen verantwortlich zu sein. Auch beim Menschen werden ein Rückgang der Spermienzahl sowie ein Anstieg von Brust- und Hodenkrebs der Wirkung dieser Substanzen zugesprochen.

Über Oberflächenabfluss und Kläranlagenabwässer gelangen hormonaktive Substanzen in die Oberflächengewässer und beeinflussen dort möglicherweise aquatische Organismen. Trotz dieser Problematik gibt es bisher keine ausreichenden Informationen bezüglich des Risikos solcher Substanzen für Mensch, Tier und Umwelt, und verbindliche gesetzliche Vorschriften zur Prüfung hormoneller Aktivitäten von Einzelsubstanzen auf tierische Organismen fehlen. Die Entwicklung verschiedener biologischer Nachweissysteme zur Erfassung hormonaktiver Substanzen kann hierbei nur ein Anfang einer langen Kette notwendiger Untersuchungen sein.

In der vorliegenden Studie galt es zunächst, zwei *In vitro*-Biotests (Yeast Estrogen Screen, Primärhepatocyten der Regenbogenforelle, *Oncorhynchus mykiss*) hinsichtlich ihrer Eignung für den Einsatz im Bereich der Umweltanalyse zu optimieren. Diese sollten dann in Kombination mit einem weiteren, bereits erprobten *In vitro*-Biotest (293-ER-Luciferase-Assay mit humanen embryonalen Nierenzellen), mit Daten aus *In situ*-Experimenten mit der Regenbogenforelle und chemischer Analytik korreliert werden.

Da bisher von Seiten des Gesetzgebers kein einheitliches Testsystem zur Erfassung hormonell aktiver Substanzen und deren Auswirkungen auf Fische existiert, sollte parallel zu den Freilanduntersuchungen ein Fischtestsystem (Gonadal Recrudescence Assay) mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) hinsichtlich seiner Praktikabilität anhand zweier Referenzchemikalien (Östrogen: 17 α -Ethinylestradiol; Androgen: 17 α -Methyltestosteron) überprüft werden. In einer abschließenden Studie sollte schließlich überprüft werden, ob das zuvor getestete Fischsystem mit der Dickkopfelritze auch für Freilandversuche geeignet ist. Letztendlich soll durch die vorliegende Arbeit ein Beitrag zur Gefährdungsabschätzung einheimischer Fischpopulationen durch hormonaktive Substanzen geleistet werden.

1.1 Die Problematik hormonell aktiver Substanzen in Gewässern

Im 21. Jahrhundert wird der Kampf um Wasser einen kriegsentscheidenden Faktor darstellen (Tilzer auf 6. DBU-Sommerakademie/St. Marienthal: „Wasser im 21. Jahrhundert – Perspek-

tiven, Handlungsfelder, Strategien“). Mit dieser vielfach zitierten Aussage wird deutlich, wie wichtig es ist, gerade in heutiger Zeit auf die Reinhaltung und effiziente Nutzung und Nutzbarkeit von Trinkwasserressourcen zu achten (Alcamo et al. 2000).

Für die Trinkwassergewinnung werden neben Grundwasserleitern auch in zunehmendem Maße Oberflächengewässer genutzt. Diese unterliegen insbesondere in Industrieländern wie Deutschland, England, Frankreich, Japan und den USA einem bisweilen starken anthropogenen Einfluss durch häusliche, landwirtschaftliche und industrielle Abwässer (Gülden et al. 1997, Islinger et al. 1999a, Rathner and Sonneborn 1979). Mit diesen Abwässern gelangen neben zahlreichen anderen Substanzen wie Nährstoffe und Spurenelemente auch solche in die Gewässer, welche einen hormonellen Einfluss auf Wirbeltiere und Wirbellose besitzen. Diese sogenannten „Endocrine Disruptors“ rücken zunehmend in den Mittelpunkt der Interesses, da sie nicht nur bei aquatischen, sondern auch bei terrestrischen Wirbeltieren mit Störungen in der Entwicklung, dem Geschlechterverhältnis, der Fruchtbarkeit und dem Reproduktionsverhalten in Verbindung gebracht werden (Bergeron et al. 1994, Birnbaum 1995, Colborn et al. 1993, Fry and Toone 1981, Guillette Jr. et al. 1994, 1995, 1999, Jobling et al. 1996, Matthiesen and Gibbs 1997, Sumpter 1995). Auch beim Menschen stehen sie im Verdacht, für einen Rückgang der Spermienzahl und den Anstieg von Hodenkrebs, Kryptorchismus, Hypospadie sowie Brust- und Gebärmutterkrebs verantwortlich zu sein (Carlsen et al. 1992, 1995, Colborn et al. 1993, Giwercman et al. 1993, Shape and Skakkebaek 1993, Stone 1994, Toppari et al. 1996). Die strukturelle Vielfältigkeit der hormonaktiven Substanzen sowie ihr häufiges/ubiquitäres Auftreten macht eine Risikoabschätzung sehr schwierig. So lassen sich Vertreter solcher Substanzen u.a. in Kontrazeptiva (Ethinylestradiol), Pestiziden (Methoxychlor, DDT-Derivate), Weichmachern (Phthalate), Kunststoffen (Bisphenol A), Tensiden (Alkylphenole und Derivate) und Antifouling-Farben (Organozinn-Verbindungen) finden. Zudem können die hormonellen Störungen erst mehrere Jahre nach der eigentlichen Belastung mit den verantwortlichen Substanzen auftreten (z.B. Ausbleiben der Reproduktion nach Erreichen der Geschlechtsreife), so dass eine Rückverfolgung bis zur genauen Ursache nahezu unmöglich erscheint. Um so wichtiger erscheint es daher, bereits vorab eine Kontamination von Organismen mit hormonaktiven Substanzen zu unterbinden. Demzufolge ist es zwingend notwendig, potentielle hormonelle Effekte bei der Neuzulassung von Chemikalien abzuklären. Trotz der Einführung des Chemikaliengesetzes im Jahre 1980, welches neben der Erfassung von chemischen und physikalischen Eigenschaften neuer Substanzen auch eine Überprüfung nach toxikologischen Gesichtspunkten vorschreibt, gibt es bis heute noch kein gesetzlich vorgeschriebenes Prüfverfahren zur Erfassung hormoneller Aktivitäten dieser Substanzen. Es befinden sich daher bis heute zahlreiche Substanzen auf dem Markt und in der Umwelt, für welche keinerlei Risikoabschätzung im Bezug auf hormonelle Wirksamkeit bei Mensch und Tier besteht. Diesbezüglich liegt hier also ein dringender Nachholbedarf vor. Auch die Umstellung und Entwicklung von Alternativsubstanzen von Seiten der Chemischen Industrie ist äußerst zeit- und kostenintensiv. In besonderen Fällen scheint dies zudem kaum oder gar nicht möglich (z.B. bei Hormonpräparaten wie Kontrazeptiva). Auch in nächster Zukunft muss damit gerechnet werden, dass solche hormonaktiven Substanzen in umweltrelevanten Konzentrationen in die Gewässer gelangen - zumindest so lange, bis von technischer bzw. biologischer Seite ausreichend geeignete Abbaumechanismen für solche Substanzen vorliegen und

auch angewandt werden. Um so dringender erscheint daher eine Risikoabschätzung insbesondere auf aquatische Organismen wie Fische hinsichtlich einer hormonellen Belastung durch solche Substanzen.

1.2 Die Notwendigkeit und Vielfältigkeit biologischer Nachweissysteme zur Erfassung hormoneller Aktivität

Aufgrund der strukturellen Vielfalt bekannter hormonaktiver Substanzen ist eine auf theoretischer Basis getroffene Voraussage einer möglichen hormonellen Aktivität von anderen Substanzen sehr schwierig. Zudem können diese Substanzen einerseits direkt auf die zentralen Steuerungsorgane wie Hypothalamus, Hypophyse, Schilddrüse oder Geschlechtsorgane wirken bzw. störend in die entsprechenden Regulationsmechanismen eingreifen (Afonso et al. 1999, Anglade et al. 1998, Bayley et al. 1999, Chapin et al. 2000, Christensen et al. 1999, Cooper et al. 2000, Danzo 1997, Desai et al. 1975, Flouriot et al. 1995). Zudem sind von verschiedenen Substanzen synergistische und antagonistische Wirkungsmechanismen bekannt, so dass bei Umweltproben vor allem die Gesamtaktivität aller Substanzen und weniger die Einzelaktivität verschiedener Substanzen von Bedeutung ist. Um möglichst viele dieser Aspekte bei der Untersuchung hormoneller Aktivitäten von Einzelsubstanzen und Umweltproben zu berücksichtigen, wurden zunächst sogenannte *In vitro*-Biotests entwickelt, welche auf dem Einsatz biologischer Organismen beruhen. Sie dienen vornehmlich zur ersten Erfassung und Identifizierung des hormonaktiven Stoffes und zur Abschätzung seines relativen hormonellen Potentials (Ankley et al. 1998, Coldham et al. 1997, Desbrow et al. 1998, Gray 1998, Jobling 1998). Da sich ein Großteil der hormonaktiven Substanzen der Gruppe der Östrogene/Pseudoöstrogene zuordnen lässt, deren Wirkungsmechanismen dem des natürlichen Östrogens 17 β -Estradiol gleichen (Anderson et al. 1996, Ankley et al. 1998, MacKay et al. 1996, Sumpter 1998), wurden vornehmlich *In vitro*-Biotests zum Nachweis östrogenen Aktivität entwickelt (Arnold et al. 1996, Feldman and Krishnan 1995, Flouriot et al. 1993, Routledge and Sumpter 1996, Soto et al. 1991). Als wichtigste Vertreter sind hier Primärhepatocytenkulturen der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*, Flouriot et al. 1993, Islinger et al. 1999b), der Yeast Estrogen Screen (YES, Routledge and Sumpter 1996), MCF 7-Zelllinien (Körner et al. 1999, Zava et al. 1997) und 293 HEK-Zelllinien (Kuiper et al. 1998, Meerts et al. 2001) zu nennen. Anhand dieser sogenannten Reagenzglas tests konnten z.T. deutliche Unterschiede im östrogenen Potential verschiedener Pseudoöstrogene festgestellt werden (Balguer et al. 1999, Harries et al. 1997a, Islinger et al. 1999b, Jobling and Sumpter 1993). Dies wiederum erweist sich als wesentlicher Vorteil gegenüber einer reinen chemischen Analytik. Diese erscheint jedoch in Kombination mit biologischen Systemen dennoch als sehr sinnvoll, um gerade bei Umweltproben eine Identifizierung und Quantifizierung bekannter östrogenaktiver Substanzen zu ermöglichen.

1.3 Der Einsatz von *In vivo*-Biotests zur Erfassung hormoneller Aktivität im Gesamtorganismus

Für die erste Erfassung und Identifizierung potentieller hormonaktiver Substanzen erscheinen die *In vitro*-Biotests als zunächst ausreichend. Eine Übertragbarkeit dieser Testsysteme auf den Gesamtorganismus ist jedoch sehr vage, da Aspekte wie Bioakkumulation und Biotransformation sowie Auswirkungen auf die Entwicklung, Geschlechtsdetermination und Reproduktionserfolg von Individuen oder gar Populationen hierbei nicht beachtet werden können. Zur genaueren Risikoabschätzung für Mensch und Umwelt sind daher *In vivo*-Tests derzeit ein wichtiger Bestandteil der Untersuchungen (Cook et al. 1997, Gimeno et al. 1998, Mellanen et al. 1996, Papoulias et al. 1999, Routledge et al. 1998). Gerade bei der Untersuchung aquatischer Systeme steht daher die Entwicklung und Anwendung geeigneter Fischttests zur Erfassung hormoneller Aktivität von Einzelsubstanzen und Substanzgemischen wie Umweltproben im Vordergrund des Interesses. Für Freilandstudien wurden hier bisher hauptsächlich männliche Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*, Harries et al. 1996, Harries et al. 1997b, Routledge et al. 1998, Sumpter 1995, Sumpter, Jobling 1995), aber auch Cypriniden wie Karpfen (*Cyprinus carpio*, Folmar et al. 1996) und Rotaugen (*Rutilus rutilus*; Routledge et al. 1998) verwendet.

1.4 *In vitro*- und *In vivo*-Nachweissysteme für östrogenaktive Substanzen

1.4.1 Der Yeast Estrogen Screen

Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) sind in genetischen Studien ein weitverbreiteter Testorganismus mit eukaryontischen Eigenschaften. Die einfache Haltung und kurze Generationszeit der Hefezellen in Kultur ermöglichte es auf Basis gentechnischer Methoden ein empfindliches *In vitro*-Nachweissystem zur Erfassung östrogenaktiver Substanzen zu entwickeln (Arnold et al. 1996, Routledge and Sumpter 1996). Die Herstellung des genetischen veränderten Hefezellstammes erfolgte im Department of Genetics der GlaxoGroup Research Ltd, Greenford, Middlesex, Uxbridge und kann über Prof. Dr. John P. Sumpter für wissenschaftliche Zwecke bezogen werden. Das Prinzip des Yeast Estrogen Screen beruht dabei auf der Integration des menschlichen Estrogenrezeptors in das Genom der Hefe, an welchen östrogenaktive Substanzen binden und zur Expression eines Reportergens führen, dessen Produkt mittels Substratumsetzung photometrisch bestimmt werden kann (Routledge and Sumpter 1996). Hierzu wurde den Hefezellen zunächst die DNA-Sequenz des menschlichen Estrogenrezeptors stabil in das Hauptchromosom integriert. Um die Rezeptoraktivität zu messen, wurden den Hefezellen zusätzlich ein Expressionsplasmid eingefügt, welches das Reportergen *lac-Z* (codiert für das Enzym β -Galactosidase) trägt. Nach der Bindung hormonaktiver Sub-

stanzen an den humanen Estrogenrezeptor, kommt es nach der Dimerisierung dieses Substrat-Rezeptor-Komplexes zur Bindung an östrogen abhängige Sequenzen (ERE - estrogen responsive elements), welche innerhalb einer starken Promotorsequenz auf dem Expressionsplasmid liegen. Diese Bindung bewirkt die Expression des nachgeschalteten *lac-Z* Gens und letztendlich die Biosynthese des Enzyms β -Galactosidase. Die Aktivität des Enzyms lässt sich anschließend durch Zugabe eines geeigneten Substrates (hier das gelbe Chlorphenolrot- β -galactopyranosid) photometrisch bei 550 nm (rotes Produkt) bestimmen.

1.4.2 293-ER-Luciferase Assay mit menschlichen embryonalen Nierenzellen

Als weiteres *In vitro*-Nachweissystem zu Erfassung östrogenaktiver Substanzen wurden genetisch veränderte menschliche embryonaler Nierenzellen der Linie 293 (293 HEK-Zellen – human embryonic kidney cells) verwendet, welche jedoch im Vergleich zum Yeast Estrogen Screen mit einem Expressionsplasmid transfiziert wurden, welches DNA-Sequenzen des menschlichen Estrogenrezeptors α oder β (ER α bzw. ER β) enthält (Kuiper et al. 1998, Meerts et al. 2001). Der Nachweis östrogenen Aktivität verläuft nach einem vergleichbaren Prinzip ab. Als Reporterenzym dient hier allerdings nicht die β -Galactosidase, sondern die Luciferase, deren Aktivität sich nach Zugabe des Substrates Luciferin über Lichtproduktion nachgewiesen werden kann (Meerts et al. 2001). Dieses Nachweissystem trägt daher auch den Namen 293-ER α bzw. 293-ER β -Luc Assay.

1.4.3 Vitellogenin-mRNA-Synthese *in vitro* und *in vivo*

Während es sich beim YES und dem 293-ER-Luc Assay auf empfindliche *In vitro*-Nachweissysteme handelt, welche mit Hilfe gentechnischer Methoden entwickelt wurden, stammen Primärhepatocyten direkt aus den Spendertieren (z.B. Regenbogenforellen). Somit stellen sie ein relativ natürliches Testsystem dar, da auch im Organismus von Fischen die Leber ein zentraler Anlaufstelle für östrogenwirksame Substanzen darstellt: Durch Gonadotropine stimuliert, kommt es im Eierstock eierlegender Wirbeltiere zur Synthese von 17 β -Estradiol, dem natürlichen weiblichen Sexualhormon, welches über das Blut in die Leber gelangt (Peter 1981). Dort bindet es an intrazelluläre Estrogenrezeptoren (Flouriot et al. 1995, 1996, MacKay et al. 1996, Morales et al. 1996), welche nach ihrer Dimerisierung wiederum an östrogen abhängige DNA-Sequenzen (ERE) binden (Katzenellenbogen et al. 1993). Diese Bindung bewirkt u.a. die Expression der Gene, welche z.B. für die Synthese von Vitellogenin, dem Dottervorläuferprotein, essentiell sind. Nach der Abgabe des Vitellogenins in die Blutbahn und dem Transport über den Blutkreislauf wird es von den Eizellen über Endocytose aufgenommen und als Spaltprodukt (Lipovitellin I und II, Phosvitin) für den sich entwickelnden Embryo verwendet (Mouchel et al. 1996, Tyler et al. 1988, Wallace 1985). Der Nachweis der

Vitellogenin-Genexpression kann sowohl auf RNA- (Vitellogenin-mRNA) als auch auf Proteinebene (Plasmavitellogenin) stattfinden. Die Messung der mRNA ist im Vergleich zur Proteinmessung jedoch zeitlich früher möglich. Neben 17 β -Estradiol können auch andere Substanzen, sogenannte Pseudo- oder Xenoöstrogene an den Estrogenrezeptor binden und vergleichbare Reaktionen in der Leber bzw. in der Leberzelle auslösen. Dieser Prozess lässt sich sowohl in Primärzellkulturen (*in vitro*) als auch im Fisch selbst (*in vivo*) auslösen. Zudem stellt die Leber ein zentrales Stoffwechselorgan im Organismus dar, so dass diese Leberzellen über einige zusätzliche Stoffwechselfunktionen, wie z.B. Biotransformation verfügen. Da sich die natürliche Vitellogeninsynthese rein auf die Weibchen beschränkt, ergibt sich somit im Bezug auf die Männchen ein empfindliches und relativ realitätsnahes *In vitro*- und *In vivo*-Nachweissystem zur Erfassung östrogenaktiver Substanzen. Gerade bei der Untersuchung von Einflüssen auf Fische im Freiland stellen die Primärhepatocyten der Regenbogenforellen somit eine gute Alternative zum Fischversuch dar (Braunbeck 1993, Braunbeck and Müller 1991, Flouriot et al. 1993, Islinger et al. 1999b).

1.5 Der Einsatz der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) in Fischtestsystemen auf endokrine Wirkung

Für den Einsatz von Fischen in biologischen Nachweissystemen zur Erfassung hormoneller Aktivitäten (inklusive Reproduktionsstudien) von Einzelsubstanzen und Substanzgemischen unter Laborbedingungen spielte die Endgröße der Fische eine entscheidende Rolle bei der Auswahl der geeigneten Fischarten, so dass Regenbogenforelle und Karpfen hierfür nicht in Frage kamen. Daher beschränkte sich die Auswahl zunächst auf die beiden tropischen Fischarten Zebrabärbling (*Danio rerio*; Bulder et al. 2000, Islinger et al. 2002a, Ortiz-Zarragoitia et al. 2002, Rose et al. 2002) und Japanischer Reiskärpfling (*Oryzias latipes*; Gray and Metcalfe 1997, Islinger et al. 2002b, Knörr et al. 2000, Papoulias et al. 1999, Scholz and Gutzeit 2000), welche im Labor nahezu das ganze Jahr über geschlechtlich aktiv sind. In amerikanischen Labors wurde hingegen bereits seit längerer Zeit die Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) aus der Familie der Karpfenfische (Cyprinidae) erfolgreich in toxikologischen Studien eingesetzt (siehe Carlson and Kosian 1987, Dill et al. 1987, Gunatilleka and Poole 1999, Newsome et al. 1991, Walbridge et al. 1983). Ziel der weiterführenden Studien war demnach, diese Fischart auch hinsichtlich der Prüfung hormonaktiver Substanzen einzusetzen. Der Vorteil dieser Fischart gegenüber den tropischen Vertretern liegt in dem definierten Jahresgang der geschlechtlichen Aktivität aufgrund des ausgeprägten Jahresrhythmus der gemäßigten Klimate. Somit erscheint die Dickkopfelritze, zumindest im Hinblick auf die Gefahrenabschätzung einheimischer Fischpopulationen, geeigneter als Zebrabärbling und Japanischer Reiskärpfling.

1.6 Der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze

Im Rahmen des Einsatzes der nordamerikanischen Dickkopfelritze in biologischen Nachweis-systemen zur Erfassung hormoneller Störungen im Fisch unter Einfluss von Einzelsubstanzen und Umweltproben wurden bisher sowohl juvenile als auch adulte Fische untersucht (Ankley et al. 2001, 2002, Giesy et al. 2000, Makynen et al. 2000, Miles-Richardson et al. 1999a, Pan-ter et al. 1998, Tyler et al. 1999). Bei der Hälterung und Exposition der adulten Dickkopfelrit-zen wurde jedoch deren Jahresgang im Reproduktionsverhalten bisher nicht berücksichtigt. Dies erscheint jedoch aufgrund der Herkunft der Tiere als notwendig, zumal die Tiere, welche als sogenannte Viellaicher über mehrere Monate hinweg geschlechtlich aktiv sind, doch deut-liche Unterschiede im Reproduktionsvermögen innerhalb des Jahresgangs aufweisen (Miles-Richardson et al. 1999b). Diesem Aspekt soll in dem sogenannten Gonadal Recrudescence Assay Rechnung getragen werden: Die Fische werden zunächst bis zum Erreichen der Ge-schlechtsreife unter Sommerbedingungen, d.h. bei ca. 20 – 25 °C und einen Tag:Nacht-Rhythmus von 16:8 h herangezogen. Anschließend erfolgt die Hälterung der Tiere unter si-mulierten Winterbedingungen, d.h. bei 15 °C Wassertemperatur und einem Tag:Nacht-Rhythmus von 8:16 h für mindestens 4 Wochen, wodurch die Aktivität der Geschlechtsorgane (Ei- und Spermienreifung) zum Erliegen kommt. Während dieser Winterphase ist zugleich eine Synchronisation der Fische bezüglich der Fortpflanzung möglich. Danach erfolgt die Schadstoffexposition unter erneuten Sommerbedingungen mit bekannten hormonaktiven Sub-stanzen. Durch die vorherige Ruhephase sollte es möglich sein, direkte Einflüsse der hormon-aktiven Substanzen auf das Fortpflanzungsverhalten der Fische zu untersuchen, welches erst unter Sommerbedingungen einsetzt. Zudem sollte durch die vorherige Synchronisation der Fische die Aussagefähigkeit bzw. die Nachweisgrenze gegenüber hormonaktiven Substanzen optimiert werden, um gerade im umweltrelevanten Konzentrationsbereich mögliche hormo-nelle Effekte auf Fische feststellen zu können.

1.7 Ziele und Fragestellung der Dissertation

Beim derzeitigen Stand der Forschung bezüglich hormonaktiver Substanzen soll im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein Beitrag zur Aufklärung der Belastung einheimischer Fische im Freiland mit östrogenwirksamen Substanzen geleistet werden. Hieraus ergaben sich die folgenden Aufgabenstellungen:

1. Optimierung von *In vitro*-Biotests (Primärhepatocyten, Yeast Estrogen Screen) zur Er-fassung östrogenener Aktivitäten in Umweltproben aquatischer Systeme.
2. Auswahl geeigneter Probenstandorte für anschließende Freilandexperimente.

3. Exposition männlicher bzw. juveniler Regenbogenforellen an den jeweiligen Probestandorten bei gleichzeitiger Wasserprobennahme für die *In vitro*-Biotests.
4. Vergleich der Daten aus den *In vitro*- und *In vivo*-Biotests in Zusammenhang mit chemischen Analysendaten auf mögliche Korrelierbarkeit der Ergebnisse im Bezug auf den östrogenen Einfluss auf Fische im Oberflächengewässer.
5. Entwicklung eines empfindlichen *In vivo*-Nachweissystems mit der amerikanischen Dickkopfeleritze zur Erfassung hormonaktiver Belastungen im Fisch.
6. Prüfung der Anwendbarkeit und Übertragbarkeit des entwickelten Fischtestsystems unter Freilandbedingungen.

Dabei gewonnenen Daten sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Wie gut lassen sich Daten aus *In vitro*-Biotests zum Nachweis östrogenen Aktivität in Umweltproben bzw. Freiland mit *In vivo*-Daten exponierter Fische sowie Daten der chemischer Analytik vergleichen?
2. Ist der Gonadal Recrudescence Assay mit der nordamerikanischen Dickkopfeleritze als Fischprüfsystem zur Erfassung hormonaktiver Substanzen im Fisch geeignet?
3. Reicht die Empfindlichkeit des Fischtestsystems mit der Dickkopfeleritze aus, um auch im Freiland hormonaktive Effekte nachzuweisen?
4. Können durch die Einleitung kommunaler Klärwässer in Oberflächengewässer biologisch relevante Mindestkonzentrationen von östrogenaktiven Substanzen erreicht werden?
5. Lassen sich aus den der gewonnenen Daten Gefährdungspotentiale für einheimische Fische ableiten?

2. Material und Methoden

2.1 Vitellogenin-mRNA in Primärhepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

2.1.1 Chemikalien und Vg 1.1 Plasmid

17 β -Estradiol (Reinheit \geq 98 %), Nonylphenol (technisch; Reinheit \geq 85 %) und Bisphenol A (Reinheit \geq 97 %) wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. Das Vg 1.1 Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. L. Ren, Medical College, Wisconsin, USA (Ren et al. 1996a) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Spendertiere

Männliche Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit einem Gewicht von 200 – 500 g wurden von einer lokalen Forellenzucht (Huber, Kirchar dt) bezogen. Die Hälterung der Spendertiere erfolgte unter Durchflussbedingungen (3 L/min) in 1000 L Kunststoffwannen bei einer Temperatur von 12 ± 2 °C und 12 h:12 h Tag:Nacht-Rhythmus. Die Fische wurde fünfmal pro Woche mit kommerziellem Forellenfutter (Raiffeisen Ringfutter) *ad libidum* gefüttert und für mindestens vier Wochen vor dem Einsatz als Spendertiere unter diesen Bedingungen gehältert.

2.1.3 Hepatocytenisolation

Die Versuchstiere wurden zunächst in einer gesättigten Benzocain-Lösung (Ethyl-*p*-aminobenzoat, Sigma) betäubt, gewogen und äußerlich mit 70 % Ethanol desinfiziert. Unter der Sterilwerkbank wurde der Fisch ventral von den Bauchflossen bis zu den Brustflossen sowie lateral bis zur Niere eröffnet und die Vena porta freigelegt. Anschließend wurde eine Flügelkanüle (0,8 mm) in die Vena porta eingeführt und mittels Arterienklemmen fixiert. Die Präperfusion der Leber erfolgte mit Präperusionsmedium (9,55 g/L Phosphat gepuffertes Salz, PBS, 2 g/L NaHCO₃, 0,55 g/L EDTA; pH 7,5, alles Sigma) für maximal 8 min mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 7 ml/min (Pumpe Ismatec Reglo M8: Stufe 70, Ismatec, Zürich, Schweiz). Währenddessen wurde die Leber herauspräpariert und an einem Stativ fixiert. Im zweiten Perfusionsschritt wurde die Leber für 15 min bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 6 ml/min (Stufe 60) mit 70 ml Isolationsmedium (10,9 g/L M 199, 4,8 g/L Hepes [Na-

frei], 0,35 g/L NaHCO₃, 0,1 g/L L-Glutamin, pH 7,4; alles Sigma) mit 0,02 % Collagenase H (aus *Chlostridium histolyticum*, Roche Diagnostics, Mannheim) im Kreislauf gespült. Im dritten Schritt wurde die Durchflussgeschwindigkeit für 15 min auf 7 ml/min erhöht, anschließend die Leber vom Stativ genommen und in eine Petrischale mit 10 ml Isolationsmedium überführt. Nach Entfernen der Gallenblase wurde die Leber mit einer sterilen Rasierklinge angeschnitten und die Hepatocyten mit einem Glasstab vereinzelt. Die Zellsuspension wurde über einer Filterglocke zunächst über ein 200 µm- und anschließend über ein 70 µm-Nylongazernetz gefiltert. Dabei wurde mit jeweils 5 ml Isolationsmedium nachgespült. Danach wurde das Filtrat gleichmäßig auf zwei 50 ml-Falcon-Tubes (Greiner, Kirchheim) verteilt und für 7 min bei 110 g und 14 °C zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Pellets erneut in insgesamt 25 ml Isolationsmedium resuspendiert. Die Zentrifugation wurde noch zweimal wiederholt und die Zellen schließlich in 100 ml Kulturmedium (entspricht Isolationsmedium mit Antibiotika) mit einer 1 %igen Mischung aus Penicillin (10.000 U) und Streptomycin (10 mg/ml) aufgenommen. Die Zelldichte wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt, jeweils 2 ml in 24-Well-Platten (Greiner) pipettiert und bei 14 °C bzw. 18 °C kultiviert. Die Zellvitalität wurde mittels Trypanblau-Ausschlussmethode (0,18 % in 0,9 %iger Kochsalzlösung) abgeschätzt.

2.1.4 Belastung der Primärhepatocyten

Nach einer Regenerationsphase von 24 h bei 14 bzw. 18 °C wurde 1 ml des überstehenden Mediums durch die entsprechende Menge an frischem Medium, welches 0,15 % Dimethylsulfoxid (DMSO, als Kontrolle) bzw. 17β-Estradiol, Bisphenol A oder Nonylphenol (alle gelöst in DMSO) enthielt.

Die in diesem Versuch eingesetzten 17β-Estradiol-Konzentrationen lagen bei 0,01, 0,1, 1 und 10 nM, während Bisphenol A und Nonylphenol in den Konzentrationen von 0,01, 0,1, 1 10 und 100 µM getestet wurde. Bei einer Belastungszeit von mehr als 48 h wurde 1 ml des Mediums erneuert.

2.1.5 Zellernte und RNA-Isolation

Zur Ermittlung der Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-mRNA-Gehalte in den Primärzellkulturen wurden die Hepatocyten nach 12, 24, 48 und 96 h Belastung für die PCR-Analyse, bzw. nach 48 und 96 h für den Dot-Blot/RNase Protection Assay geerntet. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von QIA-Shredder und RNeasy Mini-Kits (Qiagen, Hilden; Islinger et al. 1999b) aus den Zellen isoliert. Die RNA-Konzentration und -Reinheit wurden anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 260/380 nm bestimmt und die RNA-Proben bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

2.1.6 Analyse der Vitellogenin-mRNA im Dot Blot/RNase Protection Assay

Alle im Dot Blot/RNase Protection Assay verwendeten Puffer und Lösungen wurden zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, Sigma) versetzt, um eine Kontamination mit RNAsen zu verhindern. Zunächst wurde die Intaktheit der RNA-Proben in einem denaturierenden Agarose/Formaldehyd-Gel anhand der 28 S und 18 S rRNA-Bande überprüft. Für den anschließenden Nachweis der Vitellogenin-mRNA im Dot Blot/RNase Protection Assay wurde 1 µg der Gesamt-RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Qiagen) aufgetragen (Zhan et al. 1997, modifiziert nach Islinger et al. 1999b). Zusätzlich wurde ein Vitellogenin-mRNA-Standard (0,12 – 300 pg RNA), welcher aus RNA-T7-Transkripten des GemZf/(-)Vg1.1 Plasmids mit unmarkierten Nucleotidtriphosphaten in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) hergestellt wurde.

Der Nachweis der Vitellogenin-mRNA erfolgte im Prinzip nach dem folgenden Schema: Nach dem Auftragen der Proben wurden diese durch beidseitiges UV-Crosslinking (UV-Stratalinker 1800; Stratagene, Heidelberg) an die Membran fixiert. Die Proben wurden dann für 2 h bei 68 °C im Hybridisierungsöfen (Hybridiser HB-1D, Gesellschaft f. Laborgeräte mbH, Weinheim) mit Hybridisierungspuffer (2,5 ml 20 x SSC [3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat], 5 ml deionisiertes Formamid, 100 µl 10 % Na-Laurylsarcosinat, 20 µl 10 % SDS, 2 ml 10 % Blockreagenz) prähybridisiert. Danach erfolgte die Hybridisierung mit der cRNA-Sonde (100 ng/ml Hybridisierungspuffer) über Nacht bei gleicher Temperatur. Anschließend wurden unspezifische Bindungen der cRNA-Sonde mit RNase A (1,25 µl/10 ml Puffer R [10 mM Tris, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA]) verdaut. Nach mehreren Waschschritten mit Puffer R, 0,1 % SSC und Maleatpuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) erfolgte die Bindung des Antikörpers *anti-DIG-AP* (3 µl/30 ml 0,2 % Blocking Puffer in Maleatpuffer) an die cRNA-Sonde für 30 min. Zur anschließenden Chemolumineszenz-Reaktion wurde die Membran für 1 min in einer 1:1-Mischung aus Lösung 1 (200 mM Tris/800 mM NaCl) und Lösung 2 (100 mM MgCl) vorinkubiert. Für die Inkubation der Blots wurden diese in Folie eingeschweißt und für 5 min mit 2 ml Detektionslösung (1980 µl Lösung 2 + 20 µl CDP-Star, Roche Diagnostics) versetzt. Die Detektionslösung wurde entfernt und nach einer Wartezeit von 10 – 15 min die Chemolumineszenz durch Auflegen von Biomax Light-1-Filmen (Kodak, Köln) nachgewiesen. Die Intensitäten der Signale wurden anschließend mit Hilfe von E.A.S.Y Win 32 Software (Herolab, Wiesloch) ausgewertet und mit dem Vitellogenin-mRNA-Standard verglichen.

2.1.7 RT-PCR-Analyse der Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-mRNA

Die RT-PCR-Analyse wurde mittels eines Gen Amp PCR Kits (Perkin Elmer, Langen) in einem PCR-Express Thermocycler (Hybaid, Heidelberg) durchgeführt. Vitellogenin (Vg) 0.8, Estrogenrezeptor (ER) 1.0 und β -Aktin 0.5 Up- und Downstream Primer wurden wie bei Ren et al. (1995, 1996a, b) beschrieben hergestellt. Die Expression von β -Aktin diente hierbei als

interner Standard. Für die reverse Transkription der RNA zu DNA wurden die RNA-Proben mit in DEPC behandeltem Wasser auf 0,5 µg/µl verdünnt. Für die RT-PCR wurden der Master Mix (1,5 mM MgCl₂, dNTP-mix [10 mM für jedes Nucleotid], 20 U/µl RNase Inhibitor, Oligo-dT₁₆, 2.5 U/µl MuLV Transkriptase vom Maus-Leukämie-Virus) und Proben vermischt. Für Vitellogenin und ER wurde die reverse Transkription für 45 min bei 42 °C und für 5 min bei 95 °C und für β-Aktin für 15 min bei 42 °C und für 5 min bei 95 °C durchgeführt. Die Proben wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für die PCR von Vg 0.8 wurde PCR Master Mix (2 mM MgCl₂, 5 % Formamid, 10 % Glycerol, 2.5 U/100 µl Ampli Taq Polymerase von *Thermus aquaticus*, Perkin Elmer) zu den RT-Proben hinzugegeben. Zur PCR von ER 1.0 und β-Aktin 0.5 wurde PCR Master mix (25 mM MgCl₂, Ampli Taq) zu den entsprechenden PCR-Proben pipettiert. Up- und Downstream-Primer von Vg 0.8, ER 1.0 und β-Aktin 0.5 wurden mit den entsprechenden Proben gemischt. Die Amplifizierung von Vg und ER-cDNA wurde in 30 Zyklen (30 sec. bei 95 °C; 30 sec. bei 59 °C, 60 sec. bei 72 °C) durchgeführt. β-Aktin wurde in 20 Zyklen mit dem gleichen Temperatur-Profil amplifiziert.

Die PCR-Produkte wurden in einem 1 %igen Agarose-Gel in TBE-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 7,4/ 1 mM EDTA, pH 8,0) analysiert und anschließend mit 1 % (w/v) Ethidiumbromid gefärbt. Die Gele wurden unter UV-Licht untersucht und densitometrisch ausgewertet (E.A.S.Y Win 3.2).

2.1.8 Berechnungen und statistische Auswertung

Die im Dot Blot/RNase Protection Assay ermittelte Vitellogenin-mRNA-Induktion wurde als Verhältnis zwischen 14 und 18 °C angegeben, wobei die Expression bei 14 °C gleich 1 gesetzt wurde. Für die PCR wurden die Daten als Verhältnisse zwischen Vitellogenin bzw. Estrogenrezeptor und β-Aktin angegeben. Jede Probe wurde in mindestens drei Replika analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden mittels One Way ANOVA Student's *t*-Test ($P < 0,05$) ermittelt.

2.2 Östrogene Aktivität von festphasenextrahierten Wasserproben

2.2.1 Probestellen

Alle drei Probestellen befinden sich im Rhein-Neckar-Dreieck, Süddeutschland (Fig. 2.1). Das Abwasser der ersten Kläranlage gelangt über den Neckarzufluss in den Rhein, während das Abwasser der zweiten Kläranlage direkt in den Rhein gelangt. Die Abwasserzusammen-

setzung beider kommunaler Kläranlagen ist hauptsächlich häuslichen Ursprungs, zudem ist die technische Aufbereitung des Abwassers vergleichbar (siehe Tab. 2.1 für weitere Details). Die Größe der beiden Kläranlagen, angegeben in Einwohnergleichwerten (EWG), unterscheidet sich jedoch um eine Zehnerpotenz (Tab. 2.1).

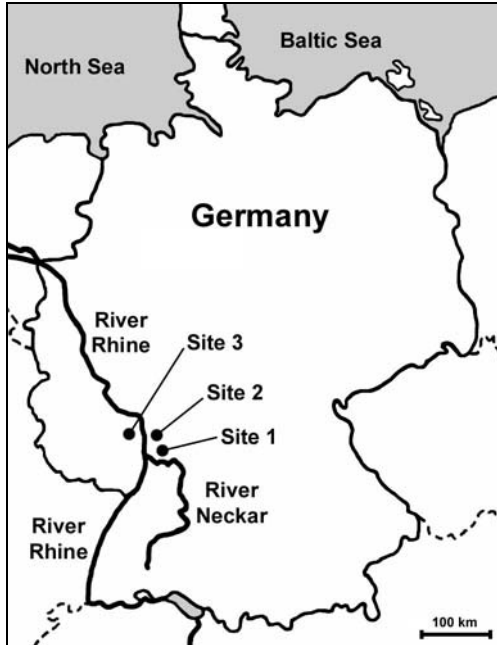
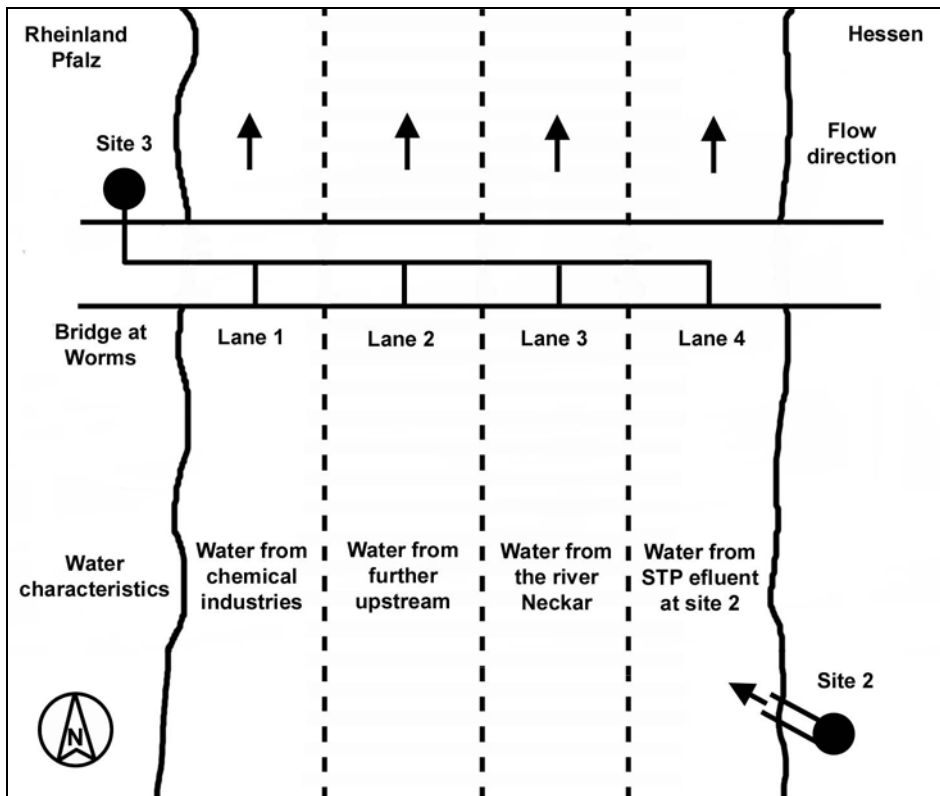


Fig. 2.1. Location of sampling sites within the Rhine-Neckar-triangle, southwestern Germany. Sites 1 and 2 represent two municipal sewage treatment plant effluents discharging into the rivers Neckar and Rhine, respectively, whereas site 3 represent the Rhine itself at the city of Worms.

Fig. 2.2. River Rhine characteristics at site 3 (Rheingütestation, Worms). Note different lanes of water sources with differences in water composition across the diameter of the Rhine.



Die dritte Probestelle liegt direkt am Rhein in der Rheingütestation Worms. Hierbei handelt es sich um eine behördliche Einrichtung zur kontinuierlichen Überprüfung der Rheinwasserqualität. Dieses Institut ist direkt an der Rheinbrücke zu Worms lokalisiert, an deren Pfeiler vier Pumpen über den Querschnitt verteilt sind. Mit Hilfe dieser Pumpen ist es möglich, kontinuierlich Wasser von beiden Seiten sowie von den zentralen Teilen des Flusses zu erhalten. Aufgrund der beachtlichen Größe kommt es im Rhein über den Querschnitt verteilt zu unterschiedlichen Wasserverhältnissen (Leitung 1-4, Fig. 2.2): Leitung 1 ist beeinflusst durch das Abwasser einer großen industriellen Kläranlage und der Stadt Ludwigshafen; Leitung 2 enthält Wasser von weiter Flussaufwärts; das Wasser von Leitung 3 wird durch den Neckar, und somit auch durch die kommunale Kläranlage 1 beeinflusst; Leitung 4 steht u.a. unter dem Einfluss der Kläranlage 2.

Tab. 2.1. Characteristics of the investigated municipal sewage treatment plants (STP)

Site	Effluent receiving river	Capacity of STP [PE]	Technical equipment	Influent composition (municipal:industrial [%])	Time of sampling	Temperature at sampling [°C]
1	River Neckar	360,000	A, N, D, P	66 : 33	4/1/00	10.4
2	River Rhine	33,000	A, N, D, P	80 : 20	10/1/00	10.1

A – activated sludge process; D – denitrification; N – nitrification; P – phosphate elimination; PE – person equivalents.

2.2.2 Festphasenextraktion der Wasserproben

Im Januar 2000 wurden von jeder Probenstelle 2 L 24 h-Mischwasserproben gezogen und unmittelbar nach Ankunft im Labor weiterverarbeitet. Die Wasserproben wurden zunächst filtriert (0,1 µM Glasfaserfilter, Typ C5, MembraPure, Bodenheim), mit konz. H₂SO₄ auf pH 2 angesäuert, in zwei 1 L-Proben geteilt und mittels Reversphasen C₁₈ Festphasenextraktion (RP-C₁₈ SPE – solid phase extraction; 1 g Kartusche, Bakerbond, J.T. Baker, Deventer, Niederlande) in Anlehnung an Spengler et al. (2001) extrahiert. Die SPE-Kartuschen wurden zuvor mit 3 x 3 ml Hexan, 3 x 3 ml Aceton und 1 x 3 ml deionisiertem Wasser konditioniert. Nach der Extraktion wurden die Kartuschen bei 2000 g für 10 min zentrifugiert und unter Stickstoffstrom getrocknet. Die Elution wurde mit 2 x 5 ml Aceton durchgeführt. Die eluierten Proben wurden mit Stickstoff bis zur Trockenheit abgeblasen, in 2,5 ml Ethanol rückgelöst und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (max. 4 Wochen). Als Prozess- bzw. Feldkontrolle wurde deionisiertes bzw. Leitungswasser verwendet und wie oben angegeben extrahiert.

2.2.3 Verbleibende östrogene Aktivität von Wasserproben nach Festphasenextraktion

Um die Effizienz der Extraktion abzuschätzen, wurde die verbleibende östrogene Aktivität von Wasserproben nach der Festphasenextraktion mit RP-C₁₈-Kartuschen ermittelt. Hierzu wurden 500 µl einer bekannten Konzentration (20 µM für jede Substanz in Ethanol) der steroiden Östrogene Estron (E₁, Reinheit ≥ 99 %; Sigma), 17β-Estradiol (E₂, Reinheit > 98 %, Sigma) und 17α-Ethinylestradiol (EE₂, Reinheit > 98 %; Sigma) zu 1 L deionisiertem Wasser gegeben und wie bereits für die Umweltproben angegeben extrahiert. Die hieraus resultierenden Extrakte wurden in 500 µl Ethanol rückgelöst und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die östrogene Aktivität des Extraktes wurde anschließend mit der Aktivität der ursprünglichen Testlösung im Yeast Estrogen Screen verglichen.

2.2.4 Extrahierte Wasserproben im Yeast Estrogen Screen

Rekombinante Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. John P. Sumpter, Brunel Universität, Uxbridge, U.K. zur Verfügung gestellt. Die Kultur der Hefezellen sowie die Durchführung des Yeast Estrogen Screen (YES) wurde mit Ausnahme einiger Modifikationen, wie bei Routledge and Sumpter (1996) beschrieben, durchgeführt. Alle Mediumkomponenten mit Ausnahme von Chlorophenolrot-β-galactopyranosid (CPRG, Roche Diagnostics) wurden von Sigma bezogen. Jeder Test wurde zweifach durchgeführt.

Zur Abschätzung der verbleibenden östrogenen Aktivität von SPE-extrahierten Wasserproben im YES wurden 200 µl einer 20 µM E₁-, E₂- bzw. EE₂-Lösung in Ethanol als Standard sowie 200 µl des entsprechenden SPE-Extraktes (E₁, E₂, EE₂) in das erste Well einer 96-Well-Platte (TTP, Renner, Dannstadt) pipettiert und dann mit 100 µl Ethanol in einer 1:2 Verdünnungsreihe über die Platte hinweg seriell verdünnt. Die höchste Konzentration des jeweiligen Standards bzw. der RP-C₁₈ SPE-Proben lag somit bei 10 µM. Als Blindwert (Negativkontrolle) wurden 100 µl Ethanol verwendet.

Zur Abschätzung der östrogenen Aktivität von Kläranlagenauslauf- und Rheinwasserextrakten wurden 200 µl des entsprechenden Extraktes in das erste Well einer 96-Well-Platte pipettiert und anschließend wie oben angegeben 1:2 mit Ethanol verdünnt. Als Positivkontrolle wurde ein E₂-Standard in Ethanol verwendet, welcher jedoch in einer separaten 96-Well-Platte angesetzt wurde. Hiervon wurden dann 10 µl jeder E₂-Konzentration in die Versuchsplatte pipettiert, um eine 10 nM E₂-Lösung in der höchsten eingesetzten Konzentration zu erhalten. Nachdem das Lösungsmittel vollständig unter der Sterilwerkbank verdunstet war, wurden 4 x 10⁷ Hefezellen/ml einer Übernachtskultur in 50 ml Versuchsmedium (siehe Routledge and Sumpter 1996 für Details) überführt und anschließend 200 µl Hefezellen in Versuchsmedium in jedes Well pipettiert. Die Platten wurden mittels Autoklavierband verschlossen und für 2 min auf einem Mikrotiterplattenschüttler geschüttelt, bevor sie in einem

Wärmeschrank (Typ B5050E, Heraeus, Hagen) für 3 Tage bei 32 °C inkubiert wurden. Nach 24 h wurden die Platten nochmals kurz für 2 min geschüttelt. Nach drei Tagen wurden die Platten in einem Mikrotiterplattenreader (MR 7000, Dynex Technologies, Frankfurt a.M.) bei Wellenlängen von 550 (Absorption) und 630 nm (Trübung) vermessen. Die Daten wurden wie bei Routledge and Sumpter (1996) angegeben ausgewertet.

2.3 Kombinierte *In vitro*- und *In situ*-Experimente zur Abschätzung der östrogenen Aktivität von Umweltwasserproben

2.3.1 Probestellen

Bei der Untersuchung der östrogenen Aktivität von Wasserproben zeigten die Extrakte der beiden Kläranlagenabwässer sowie die Fahne 4 des Rhein bei Worms die höchsten Aktivitäten im Yeast Estrogen Screen. Daher wurden diese drei Probestellen für die weiter führenden Untersuchungen mit kombinierten *In vitro*- und *In situ*-Experimenten ausgewählt.

2.3.2 Fische

Zweijährige männliche (250 – 350 g) und einjährige (20 – 160 g) Regenbogenforellen wurden von der gleichen Forellenzucht (Huber) bezogen, von der auch die Hepatocytenspendertiere (s.o.) bezogen wurden. Die Halterung der Fische erfolgte wie bereits angegeben.

2.3.3 *In situ*-Exposition von Regenbogenforellen

Aufgrund des geringen Sauerstoffgehaltes im Abwasser der Kläranlagen wurde ein Bypasssystem entwickelt. Hierzu wurde mittels einer kommerziell erhältlichen Wasserförderpumpe (4000 L/h; EHEIM, Deizisau) Abwasser in 600 L Glasfaserbecken geleitet. Diese wurden mit einem Drahtgitter abgedeckt, um zu verhindern, dass die Fische heraus springen bzw. durch mögliche Prädatoren negativ beeinflusst werden. Zudem wurde das Wasser mittels einer Luftpumpe (800 L/h; Rebie, Bielefeld) mit Sauerstoff angereichert. Der Sauerstoffgehalt in den Becken schwankte zwischen 3,9 und 7,75 mg/L (im direkten Auslauf ca. 2 mg/L). In Abhängigkeit von der Jahreszeit schwankte die Wassertemperatur zwischen 10 und 19 °C (siehe Tab. 2.2 für Details). Zur Abschätzung der östrogenen Aktivität des Kläranlagenabwassers wurden je Standort und Versuchszeitraum fünf männliche Regenbogenforellen für 15 Tage im Abwasser exponiert.

Table 2.2. Technical data and water flow conditions of the investigated sampling sites during the whole sampling period

Date of sampling/fish exposure	STP site 1			STP site 2			River Rhine		
	Nov 00	May 01	Sep 01	Mar 01	May 01	Sep 01	Mar 01	May 01	Sep 01
Capacity of STP [in people equivalents, PE]*		360,000			33,000			-	
Influent composition [municipal:industrial in %]*		66 : 33			80 : 20			-	
General flow through [m ³ /day]*		65,000			4,200			-	
Mean actual flow through [m ³ /day for STP and m ³ /s for river, respectively]*	65,474	63,116	76,798	9,845	8,569	6,120	3,004	1,868	1,884
Water level [cm]*	-	-	-	-	-	-	458	295	697
Normal level approx. 200 cm									
Mean water temperature [°C]	15.3 ± 1.5	18.3 ± 1.0	18.8 ± 0.3	10.8 ± 0.1	16.8 ± 0.5	18.1 ± 0.8	9.8 ± 0.8	19.0 ± 1.2	16.0 ± 0.8

*Data were kindly provided from the responsible persons at the investigated sites. Nov 00 – November 2000; Mar 01 – March 2001; May 01 – May 2001; Sep 01 – September 2001

Aufgrund von räumlichen Limitierungen in der Rheingütestation Worms wurden an diesem Standort juvenile Regenbogenforellen verwendet. Hierzu wurden jeweils 15 Fische in ein 100 L Glasaquarium überführt, in welches Wasser der Leitung 4 zugeleitet wurde (ca. 800 L/h). Der Sauerstoffgehalt in dem Aquarium schwankte zwischen 5,5 und 8,85 mg/L und die Wassertemperatur zwischen 8 und 21 °C.

Die jeweiligen Untersuchungszeiträume lagen im November 2000 (Standort 1), März (Standort 2 u. 3), Mai (Standort 1, 2 u. 3) und September 2001 (Standort 1, 2, 3). Die Kontrollfische wurden unter vergleichbaren Bedingungen gehalten, erhielten aber Leitungswasser.

2.3.4 Isolierung und Quantifizierung der Vitellogenin-mRNA in exponierten Regenbogenforellen

Nach einer Expositionszeit von 15 Tagen wurden die Regenbogenforellen zunächst in einer gesättigten Benzocain-Lösung betäubt und ventral eröffnet. Anschließend wurden kleine Gewebestücke (ca. 3 mm Kantenlänge) aus der Leber herausgeschnitten, sofort in RNAlater (Qiagen) überführt und bis zu 6 h bei Raumtemperatur gelagert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei – 20 °C bis zur Isolation der Gesamt-RNA aus dem Gewebe. Die Isolation erfolgte wie bereits erwähnt mit Hilfe von QiaShredder und RNeasy Mini-Kits (Qiagen, Islinger et

al. 1999b). Alle weiteren Schritte zur Intaktheit der Gesamt-RNA und zum Nachweis der Vitellogenin-mRNA entsprachen den bereits zuvor erwähnten Methoden.

2.3.5 Wasserprobenahme für Biotests

Parallel zur 15-tägigen Exposition männlicher bzw. juveniler Regenbogenforellen an den ausgewählten Standorten wurden 0,5 L 24 h-Tagesmischproben gezogen und wie oben angegeben extrahiert. Für die jeweiligen Untersuchungszeiträume wurden die Extraktproben eines Standortes zusammengefasst, um eine mittlere östrogene Aktivität in den jeweiligen Biotests (Yeast Estrogen Screen, Primärhepatocyten der Regenbogenforelle, 293-ER-Luciferase Assay) zu erhalten. Für die Abschätzung der östrogenen Aktivität der Wasserextraktproben in den Primärhepatocyten der Regenbogenforelle wurde das Lösungsmittel Ethanol durch DMSO ersetzt.

2.3.6 Wasserextraktproben in der Primärhepatocyten der Regenbogenforelle

Für die Hepatocytenprimärkultur wurden zweijährige männliche Regenbogenforellen (250 – 350 g) verwendet. Die Isolation der Primärhepatocyten erfolgte wie bereits zuvor erwähnt. Für die Kultur wurden 2 ml-Aliquots der Hepatocytenzellsuspension (1×10^6 Zellen/ml) in 24 Well-Platten (TTP, Renner) ausgesät und bei 18 °C inkubiert. Nach einer 24-stündigen Regenerationsphase wurde 1 ml der Überstandes durch frisches Medium ersetzt, welchem entweder nur 0,15 % DMSO als Negativkontrolle, 17 β -Estradiol (E₂) als Positivkontrolle oder das entsprechende Extrakt in DMSO gelöst enthalten war.

Die Extrakte wurden in den Konzentrationsfaktoren 12,5, 25 und 50 (bezogen auf das Ausgangsvolumen der ursprünglichen Wasserprobe) getestet, während E₂ in den Konzentrationen von 0,1 und 1 nM eingesetzt wurde. Nach 48 h Belastung bei 18 °C wurde nochmals 1 ml des Mediums erneuert. Nach einer Belastungszeit von 96 h wurden die Zellen zur Analyse der Vitellogenin-mRNA geerntet. Die Isolation und Quantifizierung der Vitellogenin-mRNA erfolgte wie bereits zuvor angegeben. Die Daten wurden mit der E₂-Positivkontrolle verglichen und als E₂-Äquivalente dargestellt.

2.3.7 293-ER α - und 293-ER β -Luciferase Assay

Die Messung der östrogenen Aktivität der extrahierten Wasserproben im 293-ER-Luciferase Assay erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Tatjana Kluczka, Tierärztliche Hochschule Hannover in der Abteilung für Lebensmitteltoxikologie. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um menschliche embryonale Nierenzellen der Linie 293 (293-HEK – human embryonic

kidney cells), welche stabil mit rekombinanten menschlichen Estrogenrezeptoren (293-ER α oder 293-ER β -Luc-Assay) transfiziert wurden (Kuiper et al. 1998). Die Zellkultur und Schadstoffexposition erfolgte wie bei Meerts et al. (2001) und Kuiper et al. (1998) angegeben, jedoch wurden die Zellen bei 5 °C CO₂ anstelle von 7,5 % inkubiert. Im Prinzip wurden die Zellen einer Übernachtskultur (ca. 50 % konfluent) mit Trypsin vom Plattenboden abgelöst und in Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 96-Wellplatten bei einer Dichte von 15000 Zellen/Well in 200 μ l Medium ausgesät. Nach 48 h hatten die Zellen in den Wells einen Konfluenzgrad von 50 – 60 % erreicht. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Testmedium abgezogen und durch das entsprechende Belastungsmedium (Testmedium + Extrakt, Ethanol oder Positivkontrolle) ersetzt. Die Lösungsmittelkonzentration in den Wells lag bei < 0,1 % Ethanol, was einer 1:1000 verdünnten Extraktprobe entsprach (eingesetzter Konzentrationsfaktor von 2). Als Positivkontrolle wurde 17 β -Estradiol (0,1, 1, 10, 100, 1000 pM) in Ethanol gelöst verwendet. Nach 24 h Belastung bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Platten auf Eis gestellt und das Medium abgezogen. Nach dem Waschen mit 100 μ l PBS wurden die Zellen lysiert, tiefgefroren und anschließend die Luciferase-Aktivität photometrisch ermittelt. Jedes Extrakt wurde in 5 Replika im ER-Luciferase-Assay auf östrogene Aktivität untersucht. Die Daten wurden mit der E₂-Positivkontrolle verglichen und als E₂-Äquivalente dargestellt.

2.3.8 Chemische Analyse einer repräsentativen Wasserprobe

Die chemische Analyse einer repräsentativen Wasserprobe der untersuchten Standorte erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Ternes, ESWE-Institut, Wiesbaden. Zur Identifizierung und Quantifizierung von potentiellen Östrogenen in den untersuchten Kläranlagenabwässern sowie in der Fahne 4 des Rhein bei Worms wurden am 10. September 2001 24 h-Mischproben gezogen (siehe Tab. 2.3 für Details) und am ESWE-Institut für Wasseruntersuchungen und Wassertechnologie in Wiesbaden analysiert. Die Wasserproben wurden während des Transportes bei 4 °C gelagert und innerhalb von 24 h nach Ankunft am Institut für die Analyse von ausgewählten Östrogenen, Phytoöstrogenen, und Flavanoiden herangezogen. Die Aufarbeitung, Prozessierung und Analyse entsprach den bei Stumpf et al. (1996) und Ternes et al. (1999) gemachten Angaben. Im Prinzip wurde den jeweiligen Wasserproben (1 L filtriert bzw. 0,1 L unfiltriert) zunächst ein entsprechender interner Standard (sog. Surrogat-Standard) zugegeben. Anschließend wurden die Proben mittels RP-C₁₈ Festphasenextraktion extrahiert. Die Elution der Säulen erfolgte mit Aceton, welches danach mit Stickstoff bis zur Trockenheit abgeblasen wurde. Für die Analyse der resorcyclischen Lactone und Flavanoide im LC-ESI-Tandem-MS wurden die Extrakte in einem Gemisch aus Acetonitril/Aceton (50/50 %, V/V) rückgelöst. Für die Analyse der Östrogene, Fecal- und Phytoöstrogene war ein weiterer Aufreinigungsschnitt mittels einer Silicat-Gel-Säule notwendig. Danach wurden die Extrakte mit einem Gemisch aus *n*-Hexan/Aceton (65/65 %, V/V) eluiert, unter Stickstoff bis zur Trockenheit abgeblasen, mit *n*-Methyl-*n*-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA), Trimethylchlorosilan (TMSI) und Dithioerytol (DTE) derivatisiert und im GC/MS bzw. GC-MS/MS (Fecal- und Phytoöstrogene) sowie GC-Ion-Trap-MS/MS (Östrogene) analysiert.

Table 2.3. Water and flow characteristics of the investigated sewage treatment plants and lane 4 from the River Rhine on the 10th of September 2001

	Site 1 (STP 1)	Site 2 (STP 2)	Site 3 (Rhine, lane 4)
General flow through [m ³ /day]*	65,000	4,200	-
Actual flow through [m ³ /day for STP and m ³ /s for river, respectively]*	66,810	4,708	1,642
Actual water level [cm]; normal approx. 200 cm*	-	-	257
Water temperature [°C]	1	18,2	17,6

*Data were kindly provided by the responsible persons at the investigated sites.

2.4 Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze

2.4.1 Chemikalien

17 α -Ethinylestradiol (EE₂, Reinheit \geq 98 %), 17 α -Methyltestosteron (MT, Reinheit \geq 98 %) und Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden von Sigma bezogen.

2.4.2 Herkunft und Hälterung der Versuchstiere

Die zur Anzucht der Versuchstiere verwendeten adulten Dickkopfelritzen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Reinhard Länge (Schering AG, Berlin) zur Verfügung gestellt. Geschlechtsreife männliche und weibliche Dickkopfelritzen im Alter von 6 – 15 Monaten, wurden für mindestens 30 Tage vor Versuchsbeginn unter Winterbedingungen (15 \pm 1 °C Wassertemperatur und 8 h:16 h Tag:Nacht-Rhythmus) gehaltet.

2.4.3 Versuchsbedingungen

Die Versuche fanden unter Durchflussbedingungen statt, bei welchem kontinuierlich Frischwasser und Schadstoff den jeweiligen Versuchsaquarien zugeleitet wird. Als Versuchswasser wurde eine Mischung aus Leitungs- und demineralisiertem Wasser verwendet. Die Gesamtwasserharte betrug 20 °dH und die Carbonathärte 12 °dH (213 mg/L CaCO₃). Der pH-Wert lag zwischen 7,5 und 8,2. Nitrat (NO₃⁻) lag bei \leq 48 mg/L, während Ammonium (NH₄⁺) und Nitrit (NO₂²⁻) unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1 mg/L lagen. Der Sauerstoffgehalt lag während der gesamten Versuchsdauer über 85 %.

Stammlösungen von EE₂ und MT wurden in Aqua bidest. angesetzt, welchem DMSO als Lösungsvermittler in einer maximalen Konzentration von 0,001 % zugesetzt wurde. Die jeweiligen Stammlösungen wurden mittels Minipuls-Pumpen (Abimed, Langenfeld) bei einer Flussrate von 25 ml/h einer vorgeschalteten Mischkammer mit dem Versuchswasser (Flussrate 1 L/h) verdünnt, bevor dieses in die entsprechenden Versuchsaquarien geleitet wurde. Das Wasser in den entsprechenden Aquarien wurde somit alle 48 h erneuert. Wasser- (Aqua bidest.) und Lösungsmittelkontrolle (0,04 % DMSO) wurden in der gleichen Art und Weise den jeweiligen Aquarien zugeführt. Die nominalen Konzentrationen in den jeweiligen Versuchsaquarien lagen für EE₂ bei 0, 0,1, 1, 3, 10 und 100 ng/L und für MT bei 0, 0,1, 1, 5, 50 µg/L.

Das Durchflusssystem wurde eine Woche vor dem eigentlichen Versuchsbeginn aufgebaut, um eine adäquate Equilibrierung des Systems zu erreichen. Die Durchflussraten für das Versuchswasser und die jeweiligen Schadstofflösungen wurden mindestens einmal täglich kontrolliert. Die Wassertemperatur wurde schrittweise von 15 °C bei Versuchsbeginn auf 20 °C nach 24 h erhöht (ca. 1 °C innerhalb 2 h). Die Photoperiode betrug bis zum Tag sieben 12 h:12 h Tag:Nacht (vgl. 8 h:16 h unter Winterbedingungen). Am achten Tag wurde die Wassertemperatur auf 25 °C erhöht und die Photoperiode auf 16 h:8 h Tag:Nacht eingestellt. Diese Konstellation wurde bis zum Versuchende (nach drei Wochen) beibehalten.

Zu Versuchbeginn wurden jeweils 25 zufällig ausgewählte männliche und weibliche Dickkopfelritzen nach Geschlecht getrennt in 64 L Versuchsaquarien mit den entsprechenden Schadstoffkonzentrationen überführt. Die Fische wurden dreimal täglich *ad libitum* (ca. 0,1 % des Körpergewichtes) mit tiefgefrorenen adulten Artemien (*Artemia* sp., Fumigro, Darmstadt) und einmal täglich mit kommerziellem Fischflockenfutter (Tetra Min, Melle) gefüttert. Futterreste und Faeces wurden zweimal täglich aus den jeweiligen Versuchsbecken entfernt.

2.4.4 Ermittlung des Konditionsfaktors

Nach dreiwöchiger Belastung der adulten Dickkopfelritzen mit EE₂ bzw. MT wurden diese in einer gesättigten Lösung von Ethyl-4-aminobenzoat (Benzocain; Sigma) betäubt, Länge und Körpergewicht der Fische notiert und der Konditionsfaktor nach der nachfolgend aufgeführten Formel ermittelt: $100 \cdot \text{Körpergewichtes [g]} / \text{Gesamtlänge}^3 \text{ [mm]}$.

2.4.5 Ermittlung des gonadosomatischen Indexes

Zur Ermittlung des gonadosomatischen Index (GSI) wurden die Gonaden beider Geschlechter herauspräpariert, gewogen und wie nachfolgend angegeben berechnet: $\text{Gonadengewicht [g]} / \text{Körpergewicht [g]} \cdot 100$.

2.4.6 Sekundäre Geschlechtsmerkmale

Die Anzahl der Tuberkel, welche sich auf dem Kopf männlicher und weiblicher (nach Belastung mit MT) Dickkopfelritzen befinden, wurde unter Betäubung mittels eines Binokulars (20-fache Vergrößerung) ermittelt.

2.4.7 Plasmavitellogenin

Die Ermittlung des Plasmavitellogenin-Gehaltes exponierter Dickkopfelritzen erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Charles R. Tyler, Department of Environmental and Molecular Fish Biology, University of Exeter, U.K. Um die Blutgerinnung während der Probenahme zu unterbinden, wurden die Fische zunächst für mindestens 30 min in einem Glassaquarium gehältert, welchem 2000 U/L Heparin (Sigma) zugesetzt wurde. Anschließend wurden die Fische, wie angegeben, betäubt und das Blut mittels einer kommerziell erhältlichen Insulinspritze (enthielt 2 T.I.U Aprotinin/ml) per Caudalvenenpunktur gewonnen. Die Blutproben wurden in 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt und bei 3000 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das resultierende Plasma abgezogen und bei – 80 °C bis zur Analyse im Vitellogenin-Assay gelagert. Der Plasmavitellogenin-Gehalt in männlichen und weiblichen Dickkopfelritzen wurde mit Hilfe eines Karpfen (*Cyprinus carpio*)-Vitellogenin-ELISAs durchgeführt, welche zuvor erfolgreich für den Einsatz in der Dickkopfelritze getestet wurde (Tyler et al. 1996, 1999).

2.4.8 Reproduktionsversuche, Eizahl und Befruchtungsrate

Nach dreiwöchiger Belastung mit den jeweiligen Einzelchemikalien wurden 3 (EE₂-) bzw. 4 Paare (MT-Versuch) von Dickkopfelritzen jeder Schadstoffkonzentration sowie der jeweiligen Kontrollgruppen in 64 L Aquarien überführt. Für die beiden höchsten EE₂-Schadstoffkonzentrationen (10 und 100 ng/L) wurden nochmals drei weitere Brutpaare herangezogen, um die Datenlage zu verbessern. Die Wasserbedingungen entsprachen den vorab genannten ohne die jeweiligen Schadstoffe. Die Wassertemperatur betrug 25 °C bei einem Tag:Nacht-Rhythmus von 16 h:8 h. Jedes Aquarium enthielt drei (EE₂) bzw. vier (MT) halbierte Tonschalen als Laichsubstrat. Die Fütterung der Fische erfolgte wie bereits angegeben mit tiefgefrorenen Artemien und Flockenfutter. Eizahl (Gelegegröße) und Befruchtungsrate wurden über einen Zeitraum von drei Wochen nach Belastung untersucht. Die abgelegten Eier wurden unmittelbar nach Beendigung des Laichaktes aus den jeweiligen Aquarien entfernt und in belüftete Schlupfaquarien (25 °C) überführt, um zu verhindern, dass diese von den Elterntieren aufgefressen wurden. Zwei Tage nach der Eiablage wurde die Befruchtungsrate mittels Binokular (20-fache Vergrößerung) ermittelt.

2.4.9 Histopathologie

Lichtmikroskopische Untersuchungen der Gonade

Nach dreiwöchiger Belastung der adulten Dickkopfritzen mit den jeweiligen Schadstoffen wurden jeweils 5 Paar Gonaden von männlichen und weiblichen Fischen jeder Schadstoffkonzentration entnommen. Nach ihrer Präparation wurden die Gonaden sofort in Bouin's Lösung (15 ml gesättigte Pikrinsäure-Lösung, 5 ml 39 % Formaldehyd, 1 ml Eisessig) fixiert. Nach 24 h wurden die Gewebeproben mit 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils für 3 min in 80, 90 und 96 %igem Ethanol sowie 100 Isopropanol) entwässert. Danach wurde der Alkohol durch Methylbenzoat (über Nacht) ersetzt, die Gewebeproben in Paraffin eingebettet und Längsschnitte von 5-6 µm Dicke mittels Mikrotom angefertigt. Die Schnitte wurden für die lichtmikroskopischen Untersuchungen anschließend mit Hämatoxylin und Eosin (Standardmethode) gefärbt. Die relative Häufigkeit von primären, sekundären und tertiären Follikel in den weiblichen Ovarien wurde durch Untersuchung von jeweils 50 Follikeln pro Schnitt ermittelt. Die hierfür verwendeten Areale wurden zufällig aus 10 verschiedenen Schnitten pro Fisch ausgewählt. Des Weiteren wurden auch alle andere abnormale Veränderungen in den Ovarien erfasst. Für die Untersuchung der Hoden wurden jeweils 10 Schnitte von jedem Tier herangezogen. Neben der Spermienzahl wurden auch alle anderen abnormalen Veränderungen wie phagozytierte oder degenerierte Spermien in den Hoden untersucht.

Ultrastrukturelle Untersuchungen von Leber und Hoden

Zur ultrastrukturellen Untersuchung von Leber und Hoden wurden lediglich die Tiere aus dem Belastungsversuch mit EE₂ herangezogen. Ovarien wurden aufgrund ihrer Größe nicht für elektronenmikroskopische Untersuchungen in Erwägung gezogen. Jeweils drei Fische pro Konzentration wurden zunächst wie angegeben mit Benzocain betäubt, ventral eröffnet und mittels Glaskanüle kardial perfundiert (Perfusionsrate: 12-15 ml; Pumpe Ismatec Reglo M12, Zürich, Schweiz). Die Perfusion erfolgte zunächst mit 0,9 % Kochsalzlösung/2 % Polyvinylpyrrolidon (PVP; Merck, Darmstadt) und 0,5 % Porcainhydrochlorid (Serva, Heidelberg) für 30 sec, um Blutzellen auszuspülen. Anschließend wurde das Gewebe mit 1,5 % Glutardialdehyd und 1,5 % Formaldehyd (frisch angesetzt aus Paraformaldehyd) in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,6)/2,5 % PVP (4°C) fixiert (GA I). Nach Abschluss der Perfusion wurden Leber und Gonade entfernt und in GA I bei 4 °C für max. 1 Woche gelagert. Danach wurde das Gewebe mittels einer scharfen Rasierklinge in kleine Stücke von ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten und in GA II (2,5 % Glutardialdehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer [pH 7,6] mit 4 % PVP und 0,05 % Calciumchlorid) über Nacht gelagert. Zur weiteren Fixierung wurden die Gewebeproben für 1 h in 1 % Osmiumferrocyanit (Karnovsky 1971) inkubiert. Nach-

dem die Proben dreimal mit 0,1 M Natriumcacodylat- und Maleatpuffer (pH 5,2) gewaschen wurden, erfolgte die Färbung mit 1 %igem Uranylacetat in Maleatpuffer für 1 h. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Spurr's Medium eingebettet (Spurr 1969). Mindestens 20 Semidünnschnitte von 0,4 mm Dicke wurden mit einer 1 %igen Silberdiamin-Lösung (Singh 1964) bei 60 °C für 1 h sowie mit Methyleneblau Azur II (Richardson et al. 1960, modifiziert) für lichtmikroskopische Untersuchungen gefärbt. Ultradünnschnitte von 60 – 80 nm Dicke von Leber und Hoden wurden mit alkalischem Bleicitrat (Reynolds 1963) für 1 min gefärbt und in einem Zeiss Elektronenmikroskop (EM 10) ausgewertet. Von jeder Schadstoffgruppe wurden mindestens 10 Schnitte von Leber und Gonade beider Geschlechter für ultrastrukturelle Untersuchungen herangezogen. Ultrastrukturelle Veränderungen der Leber wurden semiquantitativ nach einem 5-Punkte-System erfasst: - nicht vorhanden; ± kaum entwickelt; + mäßig vorhanden; ++ stark vorhanden; +++ sehr stark vorhanden.

2.4.10 Statistische Auswertung

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten von Konditionsfaktor, gonadosomatischem Index, der Anzahl der abgelegten Eier, der Anzahl der Tuberkel, Plasma-Vitellogenin-Gehalt, Befruchtungsrates und die relative Häufigkeit der verschiedenen Follikelstadien in den Ovarien wurde mittels One Way ANOVA, gefolgt von einem Dunn's (bei gleicher n -Zahl) bzw. Dunnett's Post-hoc Test (bei gleicher n -Zahl, Sigma Stat, SPSS-Jandel, Erkrath) analysiert ($p < 0,05$). Jede Versuchsgruppe wurde mit den Kontrollgruppen (Wasser, DMSO) verglichen. Weiterhin wurden lineare Regressionsanalysen zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der jeweiligen Schadstoffe und den verschiedenen Endpunkten durchgeführt.

2.5 Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze im Freiland

2.5.1 Ausgewählter Standort und Exposition der Fische

In der vorangegangenen Freilandstudie mit kombinierten *In vitro*- und *In situ*-Experimenten konnten im Kläranlagenauslauf von Standort 1 (STP 1; siehe Fig. 2.1) das größte östrogene Potential nachgewiesen werden. Daher wurde dieser Standort für die exemplarische Anwendung des Gonadal Recrudescence Assays mit der Dickkopfelritze ausgewählt. Für die Exposition der Dickkopfelritzen wurde im Prinzip das gleiche Durchflusssystem verwendet, wie es auch bei den Regenbogenforellen zum Einsatz kam. Um jedoch zu verhindern, dass es innerhalb des Tanks zu unkontrollierten Paarungen bzw. zum Verlust der Tiere durch den Überlauf kommt, wurden die Fische, getrennt nach Geschlecht in Aluminiumlochboxen (Lochgröße:

0,5 cm) mit einer Größe von 50 x 30 x 20 cm gesetzt. Für den Versuch wurden jeweils 20 Fische pro Geschlecht, welche zuvor wie angegeben unter Winterbedingungen gehalten wurden, für drei Wochen im Mai/Juni 2002 (siehe Tab. 2.4 für Details) im Abwasser exponiert. Während des Versuches fanden kontinuierliche Messungen von Wassertemperatur und Sauerstoffgehalt statt. Die gleiche Anzahl der Fische wurde unter kontrollierten Bedingungen mit einer Mischung aus Leitungswasser und deionisiertem Wasser gehältert. Beleuchtungsdauer und Wassertemperatur entsprach im Wesentlichen den vorangegangenen Laborversuchen, mit der Ausnahme, dass die Wassertemperatur am 8. Tag nicht auf 25 °C erhöht wurde, sondern nur auf 22 °C, da die Temperatur des Kläranlagenabwassers maximal 20 °C erreichte.

Table 2.4. Water characteristics at the investigated municipal STP at site 1 during the exposure of adult male and female fathead minnow in May/June 2002

Investigated characteristics	Technical data from STP 1
Date of fish exposure	27/05/02 – 17/06/02
Actual flow through; mean ± SD [m ³ /day]*	63,765 ± 9,816
Average oxygen content [mg/L]	2.9 - 3.07
Measured water temperature at tank [°C]	17.8 ± 0.3
Day:night regime [h]	Approx.14:10

* Data kindly provided by the responsible person at site 1.

2.5.2 Probenahme

Nach einer Expositionszeit von 3 Wochen wurden die Dickkopfelnitzeln zunächst in einer gesättigten Benzocain-Lösung betäubt, vermessen und gewogen. Für die Endpunkte Konditionsfaktor, gonadosomatischer Index und Tuberkelzahl wurden je 20 Tiere pro Geschlecht und Belastung untersucht. Für Plasmavitellogenin-Messungen wurden je 12 Fische pro Geschlecht und Belastung herangezogen. Je 5 Fische pro Geschlecht und Belastung wurden für lichtmikroskopische Untersuchungen der Gonade verwendet. Aufgrund der geringeren Wassertemperaturen im Versuchsverlauf wurden keine anschließenden Reproduktionsversuche mit den Dickkopfelnitzeln durchgeführt.

2.5.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten für Konditionsfaktor, gonadosomatischer Index, Tuberkelzahl, Plasmavitellogenin und die relative Häufigkeit der Follikelstadien in den Ovarien erfolgte wie bereits angegeben mittels One-Way ANOVA, gefolgt von einem Dunnett's Post-hoc Test (Sigma Stat, SPSS-Jandel) durchgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen den belasteten Gruppen und den Kontrollgruppen wurden mit $p < 0,05$ angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Temperaturabhängige Vitellogenin-mRNA-Expression in Primärhepatocytenkulturen der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) bei 14 und 18 °C

Zusammenfassung

Um den Einfluss der Temperatur auf die Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-Genexpression in Primärhepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) zu untersuchen, wurden die Zellen über 48 und 96 Stunden mit 17 β -Estradiol, Bisphenol A und Nonylphenol belastet. Die Induktion der Vitellogenin(VTG)-mRNA-Expression wurde in einem nicht radioaktiven Dot Blot/RNase Protection Assay und in der RT-PCR nachgewiesen. Im Dot Blot/RNase Protection Assay war das östrogene Potential von Bisphenol A 10⁴ bis 10⁵-fach und das von Nonylphenol 10⁵-fach schwächer, als das von 17 β -Estradiol. Das relative östrogene Potential zeigte hingegen keine Unterschiede zwischen 14 und 18 °C. In der RT-PCR konnten bei 18 °C im Vergleich zu 14 °C erhöhte Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-RNA-Mengen nach 12 und 24 Stunden Belastung mit 17 β -Estradiol nachgewiesen werden. Infolge der erhöhten Vitellogenin-Genexpression bei 18 °C konnte die Sensitivität der Primärhepatocyten gegenüber 17 β -Estradiol und Bisphenol A gesteigert werden.

3.1.1 Einleitung

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-Genexpression in Primärhepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) untersucht, um hierdurch Aussagen bezüglich der Empfindlichkeit im Umweltanalysebereich gegenüber östrogen wirksamen Substanzen zu erhalten.

3.1.2 Vitellogenin-mRNA-Expression bei 14 und 18 °C im Dot Blot/RNase Protection Assay

Im Rahmen der Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Vitellogenin(VTG)-mRNA-Expression von der Temperatur, Inkubationszeit und der eingesetzten Östrogen/Pseudo-

östrogen-Konzentration abhängig ist. In allen getesteten Hepatocytenprimärkulturen der Regenbogenforelle war die maximale VTG-mRNA-Expression bei 18 °C höher als bei 14 °C.

Bei 18 °C war die Induktionsrate der Vitellogenin-mRNA nach 48 und 96 h Belastung mit 17 β -Estradiol 8- bis 16-fach höher, als bei 14 °C (Fig. 3.1). Demzufolge war die VTG-mRNA-Expression in Hepatocyten von Fisch 2 und 3 nach 96 h Belastung mit 0,1 nM 17 β -Estradiol so hoch wie in Zellen, welche mit 1 nM bei 14 °C belastet wurden (Table 3.1).

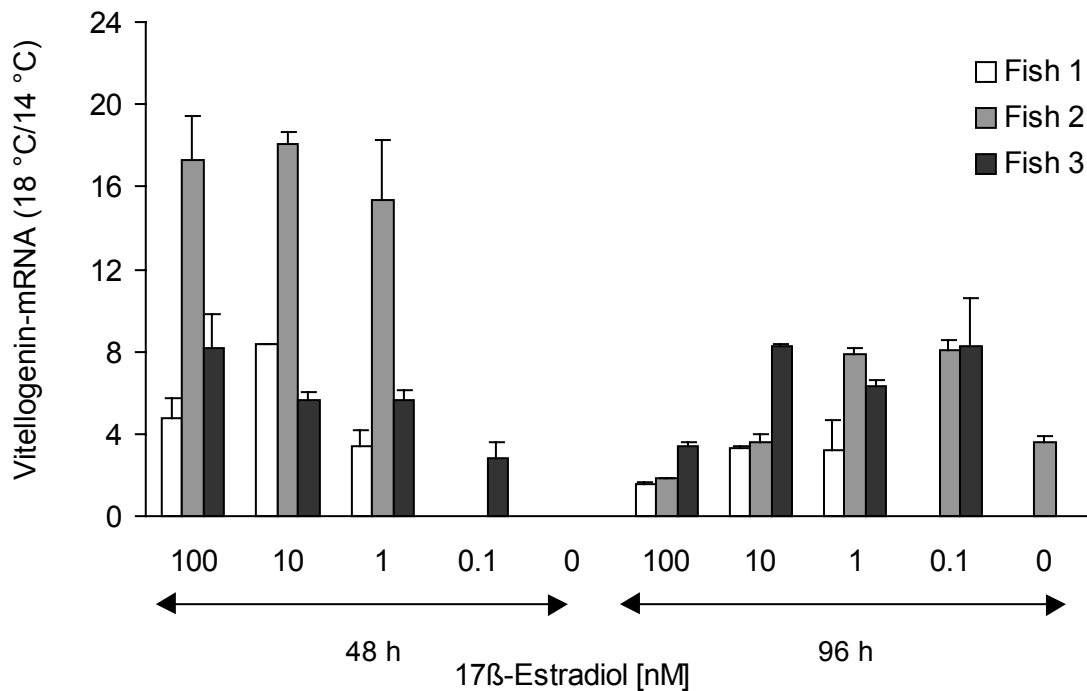


Fig. 3.1. Vitellogenin-mRNA expression at 14 °C and 18 °C in primary hepatocytes from three male rainbow trout after 48 and 96 hrs of exposure to 17 β -estradiol, given as a ratio of vitellogenin 18 °C/VTG 14 °C. Induction rate of vitellogenin-mRNA was 8 to 16-fold higher at 18 °C. Error bars represent standard deviation of ≥ 3 determinations for each hepatocyte preparation.

Die VTG-Genexpression in mit Bisphenol A belasteten Primärhepatocyten war bei 18 °C ebenfalls um den Faktor 12 – 22 höher als bei 14 °C (Fig. 3.2). Im speziellen Fall konnte in Fisch 1 und 2 bei 14 °C keine VTG-mRNA-Expression festgestellt werden, während bei 18 °C geringe Mengen nachweisbar waren (Tab. 3.1).

Als eine Konsequenz daraus zeigte sich in Fisch 3, dass bei 18 °C und 48-stündiger Belastung mit 1 μ M Bisphenol höhere VTG-mRNA-Gehalte erreicht wurden, als bei Belastung mit 10 μ M Bisphenol A bei 14°C. Der Einfluss der Inkubationstemperatur auf die VTG-mRNA-Expression konnte bei längerer Belastung auch bei entsprechend niedrigeren Bisphenol A-Konzentrationen nachgewiesen werden. So konnte lediglich bei 18 °C eine Induktion der VTG-mRNA-Expression in Fisch 2 und 3 nach 96 h Belastung mit 0.1 μ M Bisphenol A beobachtet werden (Fig. 3.2). Es zeigte sich zudem, dass Hepatocyten, welche mit 100 μ M Bisphenol A belastet wurden, eine erhöhte Cytotoxizität im Lichtmikroskop aufwiesen.

Table 3.1. Vitellogenin-mRNA (pg/ μ g total RNA) in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes from various male fish after exposure to 17 β -estradiol, bisphenol A and nonylphenol.

Exposure time	Compound	Fish 1			Fish 2			Fish 3		
		14 °C	18 °C	14 °C	18 °C	14 °C	18 °C	14 °C	18 °C	
48 h	17 β -Estradiol [nM]	100	81.72 \pm 9.32*	389.22 \pm 119.58*	55.97 \pm 12.11*	969.41 \pm 96.99*	308.01 \pm 67.39*	2509.36 \pm 73.68*		
		10	21.92 \pm 4.53*	183.13 \pm 38.98*	39.04 \pm 5.23*	707.15 \pm 71.97*	159.23 \pm 16.39*	900.08 \pm 40.51*		
		1	0	3.4 \pm 0.82*	0	15.31 \pm 2.92*	4.99 \pm 0.67*	28.25 \pm 6.25*		
96 h	17 β -Estradiol [nM]	0,1	0	0	0	0	0	2.83 \pm 0.75*		
		0	0	0	0	0	0	0		
		100	797.20 \pm 20.89*	1246.35 \pm 112.01*	588.94 \pm 82.42*	1093.87 \pm 154.25*	980.10 \pm 28.36*	3330.87 \pm 238.63*		
48 h	Bisphenol A [μ M]	10	165.2 \pm 15.97*	539.14 \pm 69.47*	293.16 \pm 41.05*	1055.94 \pm 37.84*	313.11 \pm 31.55*	2571.94 \pm 295.01*		
		1	5.04 \pm 3.02*	16.15 \pm 4.84*	6.36 \pm 1.45*	50.05 \pm 9.79*	5.52 \pm 0.71*	34.85 \pm 3.14*		
		0,1	0	0	0	8.02 \pm 0.49*	0	8.27 \pm 2.29*		
96 h	Bisphenol A [μ M]	0	0	0	0	3.62 \pm 0.23	0	4.96 \pm 1.12		
		10	0	3.45 \pm 0.1*	0	2.97 \pm 1*	4.68 \pm 0.1*	59.57 \pm 6.99*		
		1	0	2.33 \pm 0.1*	0	3.56 \pm 0.1*	0	21.05 \pm 3.43*		
48 h	Nonylphenol [μ M]	0	0	0	0	0	0	0		
		10	0	13.38 \pm 3.2*	0	31.28 \pm 5.69*	29.81 \pm 6.72*	704.02 \pm 60.5*		
		1	0	2.81 \pm 0.1*	0	10.54 \pm 3.36*	8.78 \pm 1.26*	177.2 \pm 7.55*		
96 h	Nonylphenol [μ M]	0,1	0	0	0	3.54 \pm 0.1*	5.21 \pm 0.62*	5.75 \pm 0.39*		
		0	0	0	0	0	0	0		
		100	2.46 \pm 0.07*	66.02 \pm 10.91*	433.57 \pm 28.41*	236.04 \pm 25.28*	32.23 \pm 3.25*	754.71 \pm 39.02*		
48 h	Nonylphenol [μ M]	10	0	2.06 \pm 0.06*	0	18.79 \pm 6.06*	0	13.8 \pm 3.4*		
		1	0	0	0	0	0	3.18 \pm 0.1*		
		0	0	0	0	0	0	0		
96 h	Nonylphenol [μ M]	100	61.67 \pm 11.21*	397.56 \pm 57.81*	6177.21 \pm 747.89*	84.71 \pm 7.15*	1575 \pm 75.03*			
		10	1.64 \pm 0.01*	12.16 \pm 4.24*	11.47 \pm 1.99*	33.05 \pm 3.68*	3.31 \pm 0.1*	22.53 \pm 1.45*		
		1	0	2.03 \pm 0.03*	0	24.5 \pm 0.45*	3.19 \pm 0.07*	19.19 \pm 0.78*		
0	0	1.6 \pm 0.12	0	20.54 \pm 1.07	0	5.1 \pm 0.42				

*Significant from control (P < 0.05, one way ANOVA, Student's t-test)

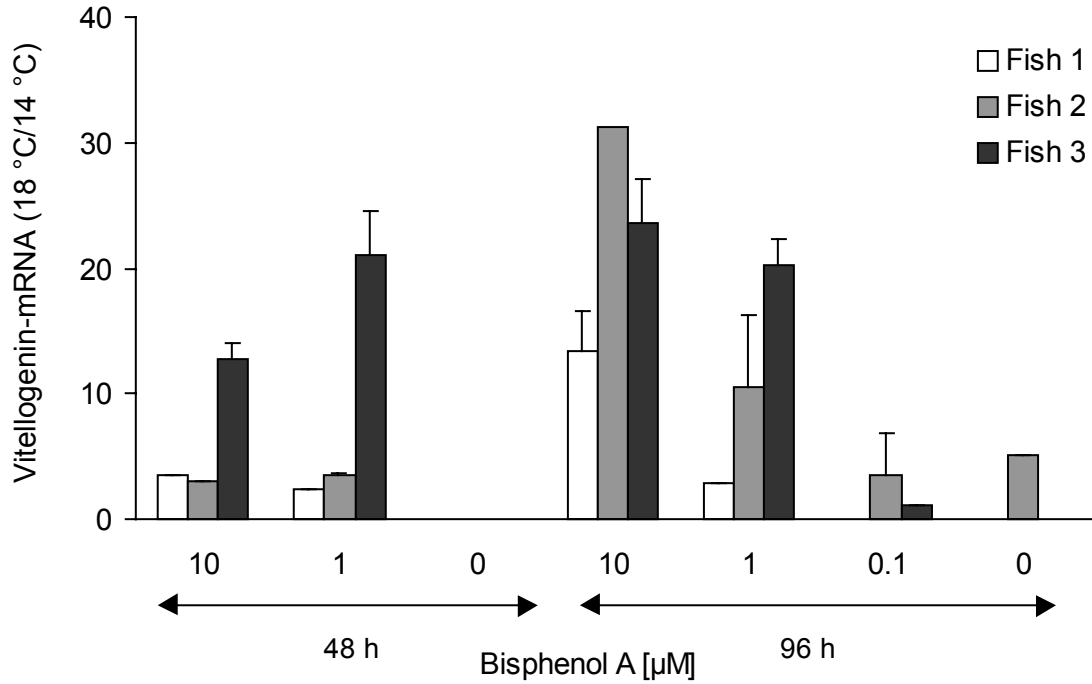


Fig. 3.2. Vitellogenin-mRNA expression at 14 °C and 18 °C in primary hepatocytes from 3 male rainbow trout after 48 and 96 hrs of exposure to bisphenol A, given as a ratio of vitellogenin 18 °C/VTG 14 °C. Induction rate of vitellogenin-mRNA was 12 to 22-fold higher at 18 °C. Error bars represent standard deviation of ≥ 3 determinations for each hepatocyte preparation.

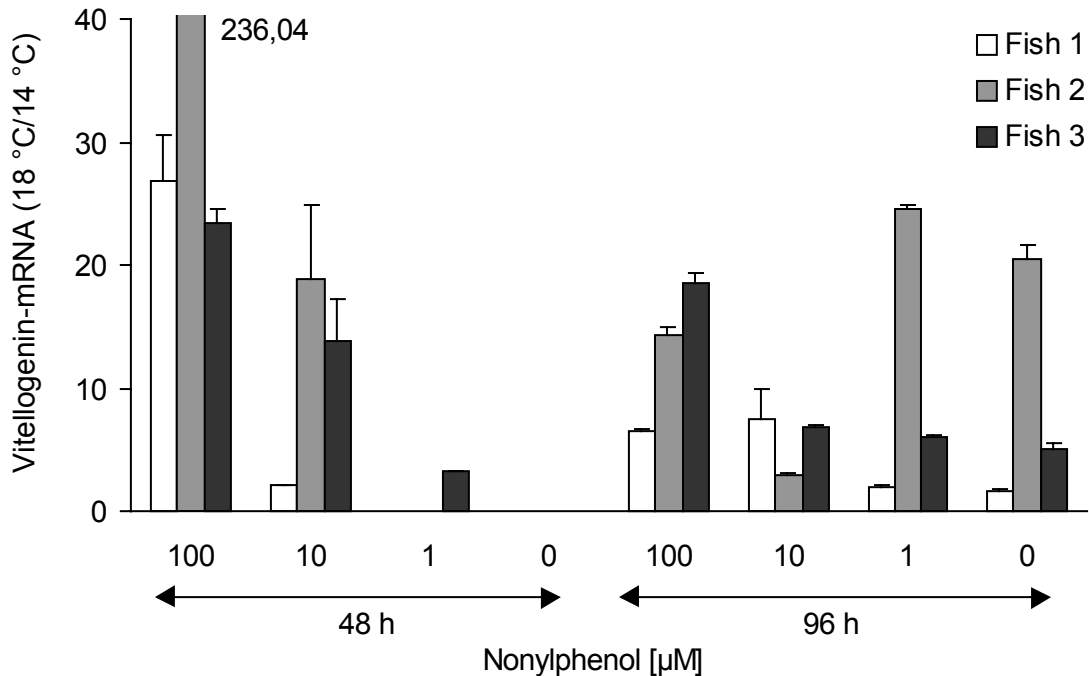


Fig. 3.3. Vitellogenin-mRNA expression at 14 °C and 18 °C in primary hepatocytes from 3 male rainbow trout after 48 and 96 hrs of exposure to nonylphenol, given as a ratio of vitellogenin 18 °C/VTG 14 °C. Induction rate of vitellogenin-mRNA was 18 to 28-fold higher at 18 °C. Error bars represent standard deviation of ≥ 3 determinations for each hepatocyte preparation.

In Zellen von Fisch 1 und 2 ergab eine 96-stündige Belastung mit Nonylphenol eine nachweisbare VTG-mRNA-Expression ab Konzentrationen von 10 µM bei 14 °C bzw. 1 µM bei 18 °C (Tab. 3.1). Mit Ausnahme der Belastung von Fisch 2-Zellen mit 100 µM Nonylphenol bei 18 °C und 48 h war die maximale VTG-mRNA-Induktion bei 18 °C zwischen 18 und 28-fach höher als bei 14 °C (Fig. 3.3). Die relativ starken Hintergrundsignale in den Kontrollen verhinderte jedoch den zweifellos möglichen Nachweis der induzierten VTG-mRNA bei Nonylphenol-Konzentrationen unter 1 µM.

Insgesamt zeigte sich, dass das östrogene Potential von Bisphenol A (704,02 pg VTG-mRNA/µg Total-RNA nach 10 µM Bisphenol A bei 18 °C und 96 h in Fisch 3) im Vergleich zu dem von 17β-Estradiol (34,85 pg VTG-mRNA/µg Total-RNA mit 1 nM 17β-Estradiol in Fisch 3) um ca. 10⁴ bis 10⁵-fach schwächer war. In gleicher Weise war die östrogene Aktivität von Nonylphenol (13,8 pg VTG-mRNA/µg Total-RNA nach 10 µM Nonylphenol in Fisch 3) ca. 10⁵-fach schwächer als die von 17β-Estradiol.

3.1.3 Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-Genexpression bei 14 und 18 °C in der RT-PCR

Im Dot Blot/RNase Protection Assay konnte in manchen Kontrollen, welche bei 18 °C inkubiert wurden, eine erhöhte Hintergrundaktivität für die VTG-mRNA-Expression festgestellt werden. Um nun festzustellen, ob es sich hierbei entweder um eine erhöhte unspezifische Bindung der cRNA-Sonde oder um eine Induktion der VTG-mRNA-Expression handelte, wurde eine PCR entwickelt, um sowohl VTG-mRNA- als auch Estrogenrezeptor-mRNA-Expression in den Primärhepatocyten bei 14 und 18 °C nach Belastung mit verschiedenen 17β-Estradiol-Konzentrationen nachzuweisen. Die Messung der VTG- und Estrogenrezeptor-mRNA-Expression in den Primärzellkulturen mittels RT-PCR ergab eine dosis-, zeit- und temperaturabhängige Induktion beider mRNAs nach Belastung mit 17β-Estradiol.

In allen Kontrollen, welche für 12, 24, 48 und 96 h bei 14 bzw. 18 °C inkubiert wurden, zeigte sich in der PCR ein dosisabhängiger Anstieg der VTG-mRNA (Fig. 3.4). Im Gegensatz hierzu war in allen untersuchten Zellkulturen die Konzentration der β-Actin-mRNA nach Belastung mit Östrogenen/Pseudoöstrogenen konstant.

Die Ergebnisse zeigten sowohl nach 12 als auch nach 24 h Belastung deutliche Unterschiede der Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-mRNA-Expression bei 14 und 18 °C (Figs. 3.4 und 3.5). So konnten z.B. bei 14 °C erhöhte Mengen an Vitellogenin-mRNA in den Zellen festgestellt werden, welche zuvor für 12 h mit 10 nM 17β-Estradiol belastet wurden, während nur bei 18 °C vergleichbare VTG-mRNA-Gehalte nach Belastung mit 1 nM 17β-Estradiol erzielt wurden. Nach 24 h Belastung mit 0,1 nM 17β-Estradiol bei 18 °C lagen die VTG-mRNA-Gehalte um 100 % höher als in den Zellen, welche mit 1 nM 17β-Estradiol bei 14 °C inkubiert wurden. Nach 96 h Belastung konnten somit die Nachweisgrenzen für die VTG-mRNA-Induktion in Primärhepatocyten von 1 nM 17β-Estradiol bei 14 °C auf 0,01 nM 17β-Estradiol bei 18 °C herabgesenkt werden.

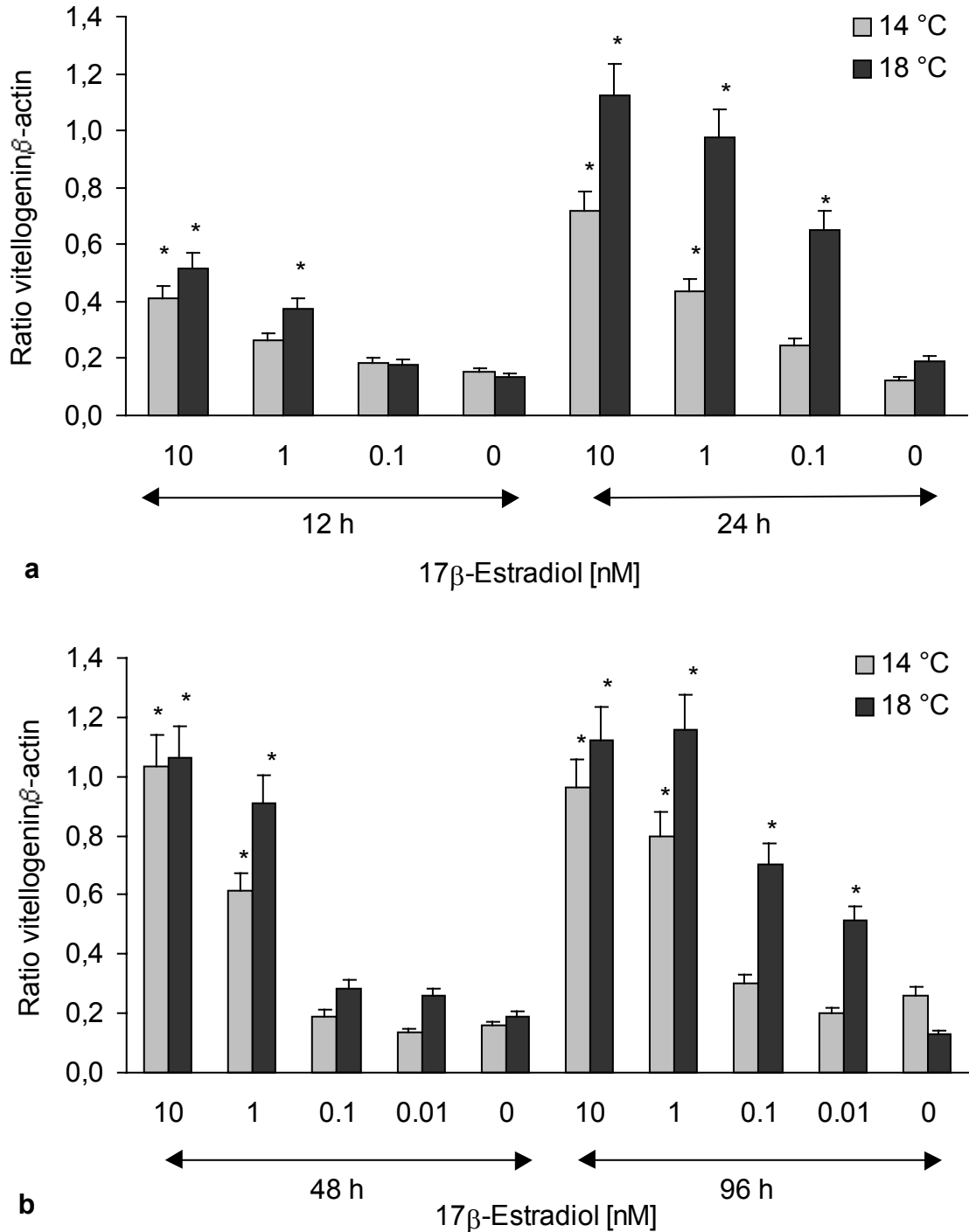


Fig. 3.4. Dose- and time-response of vitellogenin-mRNA expression in primary hepatocytes exposed to 17β-estradiol at 14 and 18 °C for 12 and 24 h (a) as well as for 48 and 96 h (b), given as a ratio of vitellogenin/β-actin. Semiquantitative analysis of vitellogenin and β-actin-mRNA amplified by RT-PCR and identified by ethidium bromide staining after agarose gel electrophoresis. An elevated vitellogenin-mRNA induction was observed in hepatocytes at 18 °C after all exposure times. **p* < 0.05 from control.

Durch Belastung der Zellen mit 17 β -Estradiol bei 18 °C konnten nach 12 und 24 h erhöhte Estrogenrezeptor-mRNA-Gehalte im Vergleich zu 14 °C festgestellt werden. Speziell nach 12 h Belastung bei 18 °C lag die Estrogenrezeptor-mRNA-Expression in den Primärhepatocyten um ca. 40 % höher als bei den 14 °C-Zellen. Die Nachweisgrenzen für die Estrogenrezeptor-mRNA-Expression lagen nach 12 h bei 10 (14 °C) und 0,1 nM 17 β -Estradiol (18 °C) bzw. bei 0,1 nM 17 β -Estradiol nach 24 h.

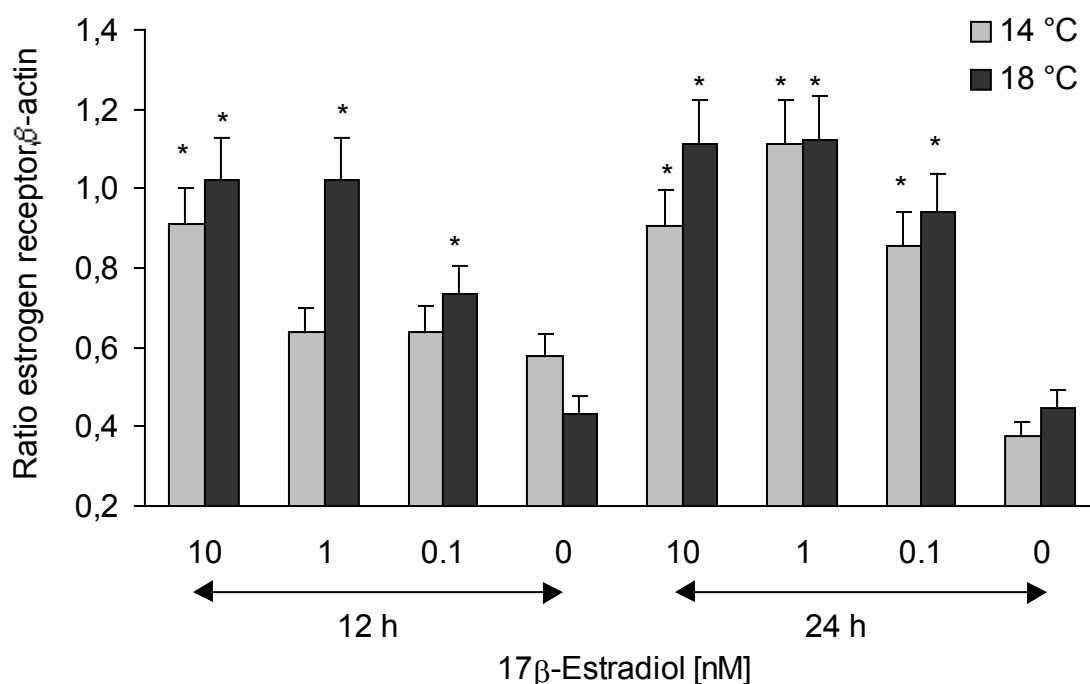


Fig. 3.5. Dose- and time-response of estrogen receptor-mRNA expression in primary hepatocytes exposed to 17 β -estradiol at 14 and 18 °C, respectively, for 12 and 24 h, given as a ratio of estrogen receptor/ β -actin. Semiquantitative analysis of estrogen receptor and β -actin-mRNA amplified by RT-PCR and identified by ethidium bromide staining after agarose gel electrophoresis. An elevated estrogen receptor-mRNA induction was observed in hepatocytes at 18 °C after 12 and 24 h. * $p < 0.05$.

3.1.4 Diskussion

Viele hormonaktive Substanzen mit einer schwachen östrogenen Aktivität lassen sich in niedrigen Konzentrationen in aquatischen Systemen nachweisen. Um den Nachweis der VTG-mRNA-Detektion zu optimieren und somit dessen Nachweisgrenze in den Primärhepatocyten der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) zu verbessern, wurden die Zellen bei unterschiedlichen Temperaturen (14 und 18 °C) inkubiert.

Nach Belastung der Primärhepatocyten mit dem Östrogen 17 β -Estradiol und den Pseudoöstrogenen Bisphenol A und Nonylphenol konnte eine dosis- und zeitabhängige Expression der Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-mRNA festgestellt werden. Die Primärzellkulturen der Regenbogenforelle produzierten bei 18 °C höhere Mengen an VTG- und Estrogenrezeptor-

mRNA als bei 14 °C. Ein Vergleich mit anderen *In vitro*- und *In vivo*-Studien zeigte ähnliche Effekte der Temperatur auf die Proteinsynthese. So konnte z.B. im Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) und in Regenbogenforellen, welche *In vivo* bei höheren Temperaturen gehalten wurden, eine höhere Vitellogeninsynthese nach Injektion von 17 β -Estradiol beobachtet werden (Korsgaard et al. 1986, MacKay and Lazier 1993). Im Primärhepatocytenkulturen des kleinfleckten Katzenwelses (*Ictalurus punctatus*) konnte ein erhöhter Gehalt an Gesamtprotein bei höherer Inkubationstemperatur festgestellt werden (Koban 1986). Wie zu erwarten, konnten im Gegensatz dazu in der gegenwärtigen Studie keine temperaturabhängigen Effekte bei der Expression der β -Actin-mRNA festgestellt werden.

Viele Studien mit den natürlichen Östrogen 17 β -Estradiol zeigten, dass es sich hierbei um einen der potentesten Auslöser der Vitellogeninsynthese handelt (Milligan et al. 1998, Nath and Sundaraj 1981, van Bohemen et al. 1982, Wiegand 1996). Auch in der vorliegenden Studie war 17 β -Estradiol hinsichtlich der VTG-mRNA-Induktion wesentlich potenter als Bisphenol A und Nonylphenol. Während bei 14 °C eine Konzentration von 1 nM 17 β -Estradiol notwendig war, um eine nachweisbare VTG-mRNA-Synthese in den Primärhepatocyten von zwei der drei untersuchten Fische nach 96 h Belastung zu erzielen, genügte bei 18 °C eine Konzentration von 0,1 nM 17 β -Estradiol. Smeets et al. (1999a, b) konnten in männlichen Karpfen (*Cyprinus carpio*) ein Anstieg des Plasmavitellogenin-Gehalts ab 17 β -Estradiol-Konzentrationen von 2 nM feststellen. In Aggregatzellkulturen von Primärhepatocyten der Regenbogenforelle lag die Nachweisgrenze der Vitellogenin-mRNA bei 0,001 nM 17 β -Estradiol (Flouriot et al. 1996, Vaillant et al. 1988).

In vergleichbarer Weise konnte die niedrigste effektive Konzentration von Bisphenol A in den Primärhepatocyten von 10 μ M bei 14 °C auf 1 μ M bei 18 °C nach 48 h Belastung, sowie auf 0,1 μ M nach 96 h Belastung herabgesetzt werden. Im konkreten Fall konnte in zwei von drei untersuchten Fischen nach Belastung mit 1 und 0,1 μ M Bisphenol A nur bei 18 °C geringe Mengen an induzierter Vitellogenin-mRNA festgestellt werden. Das östrogene Potential von Bisphenol A, welches in den Primärhepatocyten der Regenbogenforelle mittels Dot Blot/RNase Protection Assay bei 14 und 18 °C nachgewiesen werden konnte, war zwischen 10⁴ und 10⁵-fach schwächer als das des natürlichen Östrogens 17 β -Estradiol. Im Vergleich hierzu lag die niedrigste effektive Konzentration für die Induktion der Plasmavitellogeninsynthese in Primärhepatocyten des Karpfen bei 50 μ M Bisphenol A (Smeets et al. 1999b). Das östrogene Potential von Bisphenol A lag in dieser Studie bei dem 10⁵-fachen von 17 β -Estradiol. Im Vergleich zur vorliegenden Studie konnten Smeets et al. (1999b) ebenfalls zeigen, dass Bisphenol A bei 100 μ M cytotoxisch auf Karpfenhepatocyten wirkt. Im Rezeptor-Bindungs-Assay lag die Nachweisgrenze bei 1 μ M Bisphenol A, wobei das östrogene Potential 10³ bis 10⁴-fach schwächer als das von 17 β -Estradiol war (Dodge et al. 1996, Krishnan et al. 1993, Nagel et al. 1997, Olea et al. 1996).

Die Belastung von Primärhepatocyten mit Nonylphenol bei 14 und 18 °C zeigte aufgrund der höheren Hintergrundaktivität in den Kontrollen hingegen keine Verbesserung der Nachweisgrenze für die Vitellogenin-mRNA. In den Primärhepatocyten der Regenbogenforelle war das östrogene Potential von Nonylphenol im Vergleich zu dem von 17 β -Estradiol um ca. 10⁵-fach

schwächer. In der gegenwärtigen Studie lag die niedrigste effektive Konzentration von Nonylphenol im Bezug auf die Induktion der Vitellogenin-mRNA-Synthese sowohl bei 14 als auch bei 18 °C bei 1 µM nach 96 h Belastung. Im Vergleich hierzu lag die Nachweisgrenze für die Induktion der Vitellogeninsynthese in Primärhepatocyten, welche mit einem Radioimmunoassay erfolgte, bei 10 µM (Jobling and Sumpter 1993). Im Yeast Estrogen Screen waren östrogene Signale ab einer Konzentration von 3 µM Nonylphenol nachweisbar (Routledge and Sumpter 1996). In Aggregatzellkulturen von Regenbogenforellenhepatocyten sowie in MCF 7-Zellen lag die Nachweisgrenze bei 100 nM Nonylphenol (Flouriot et al. 1993, Soto et al. 1995, White et al. 1994). Demzufolge sind die Aggregatzellkulturen um den Faktor von ca. 10 sensitiver gegenüber östrogenen Substanzen als vergleichbare Monolayerkulturen. Das östrogene Potential von Nonylphenol war in allen Studien um den Faktor 10^3 bis 10^5 schwächer als das von 17β-Estradiol.

Die Nachweisgrenze der VTG-mRNA-Induktion in Primärzellkulturen der Regenbogenforelle nach Belastung mit niedrigen Schadstoffkonzentrationen hängt zudem von dem Hintergrundsignal in den Kontrollzellen ab. Dieses war insbesondere in den Versuchen mit Nonylphenol ausgesprochen hoch. Anhand der RT-PCR-Untersuchungen zur VTG-mRNA-Expression konnte gezeigt werden, dass eine nicht-spezifische Bindung der cRNA-Sonde für dieses hohe Hintergrundsignal nicht in Frage kommt. Vielmehr handelt es sich hierbei um eine induzierte Vitellogenin-mRNA-Synthese in den Hepatocyten der Kontrolle. Eine Prä-Vitellogenin-mRNA, wie sie in nicht-induzierten Regenbogenforellen von Ren et al. (1995, 1996b) nachgewiesen werden konnte, war in der vorliegenden Studie nicht nachweisbar. Östrogene Effekte, welche durch Mediumkomponenten hervorgerufen werden können (siehe Miller et al. 1986), konnten ausgeschlossen werden, da das Medium zuvor mit Aktivkohle behandelt wurde. Eine vorherige Induktion der Vitellogenin-mRNA in den männlichen Regenbogenforellen kann aufgrund der Tatsache ausgeschlossen werden, dass lediglich fünf von 36 Kontrollgruppen solche erhöhten Hintergrundsignale im Dot Blot/RNase Protection Assay aufwiesen. Daher liegt einerseits die Vermutung nahe, dass entweder östrogene Substanzen, welche aus den Platten freigesetzt werden, oder wahrscheinlicher, speziell im Nonylphenol-Experiment Verunreinigungen (vielleicht sogar in Kombination mit der Freisetzung von Substanzen von der Platte) für die Vitellogenin-mRNA-Synthese in den Primärhepatocyten verantwortlich sind. Ähnliche Studien von Soto et al. (1991) zeigten eine Freisetzung von *p*-Nonylphenol aus Polystyrol, welche zu östrogenen Effekten in MCF 7-Zellen führte. Zudem konnten Krishnan et al. (1993) östrogene Effekte im Yeast Estrogen Screen nachweisen, welche auf die Freisetzung von Bisphenol A aus Kunststoffen während des Autoklavierens von Medien zurückzuführen waren. Aufgrund des höheren Hintergrundsignals in den Kontrollzellen der Nonylphenol-Platte ist zudem anzunehmen, dass ein sogenanntes Kriechen von Nonylphenol über die Versuchsplatte, wie für Alkylphenole (Beresford et al. 2000) beschrieben wurde, auch in der gegenwärtigen Studie zur Induktion der Vitellogenin-mRNA-Synthese geführt hat. Möglicherweise kann durch eine Verkürzung der Expositionszeit das Hintergrundsignal in den Kontrollzellen reduziert werden, jedoch sind hierfür weitere Untersuchungen notwendig.

Die gesteigerte Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-mRNA-Synthese in den bei 18 °C inkubierten Primärzellkulturen ist möglicherweise auf eine temperaturabhängige Steigerung des

Metabolismus zurückzuführen. Die Inkubation bei 18 °C führte auch zu einer erhöhten Reaggregation der Zellen, welche dadurch sogenannte „Culture Shock“ Effekte (Wolffe et al. 1984) 17 β -Estradiol, welche bei der Hepatocytenisolation auftraten, reduzierte. Die Reaggregation der Hepatocyten in Kultur kann möglicherweise sogar als Indikator einer hohen Zellvitalität angesehen werden (Braunbeck et al. 1995b, Maitre et al. 1986). Die Unterschiede in der Vitellogenin- und Estrogenrezeptor-mRNA-Expression bei 14 und 18 °C kann jedoch nicht nur auf die Reaggregation der Zellen zurückgeführt werden. Vielmehr scheint bei 18 °C ein erhöhter Metabolismus für diesen Anstieg verantwortlich zu sein. Im Gegensatz hierzu zeigten Studien an MCF 7-Zellen einen Abfall in der Bindung von 17 β -Estradiol zu dem entsprechenden Estrogenrezeptor bei 37 °C im Vergleich zu 2 °C (Rossini and Malaguti 1995). Daher scheint es, als ob sich Hepatocyten, welche eine natürliche Zielzelle für 17 β -Estradiol darstellen, sich bezüglich ihrer Östrogen-Sensibilität bei verschiedenen Temperaturen von den MCF 7-Zellen unterscheiden.

Da die Temperatur möglicherweise einen Einfluss auf Metabolismus und Reaktionsfähigkeit von Fischen gegenüber hormonaktiven Substanzen im Freiland hat (z.B. erhöhte Wassertemperatur von Kläranlagenabwässern), kann nicht ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Wassertemperatur zu verschiedenen Jahreszeiten auch zu unterschiedlichen Reaktionsmustern bei den Fischen führen können. Daher wäre eine weitergehende Berücksichtigung der Wassertemperatur bei Freilanduntersuchungen an Fischen insbesondere im Hinblick auf die Vitellogeninsynthese sinnvoll.

3.2 Östrogene Aktivität von festphasenextrahierten Wasserproben zweier kommunaler Kläranlagenabwässer und Rheinwasser im Yeast Estrogen Screen

Zusammenfassung

In der dieser Studie wurde der Yeast Estrogen Screen (YES) zur Erfassung des östrogenen Potentials von festphasenextrahierten (SPE – solid phase extraction) Wasserproben zweier kommunaler Kläranlagenabwässer (STP 1 und 2 - sewage treatment plant) und vom Rhein bei Worms herangezogen. In beiden Kläranlagenabwässern konnte eine östrogene Aktivität ab einem Konzentrationsfaktor (CF - concentration factor) von 2 nachgewiesen werden. Die östrogene Aktivität des Rheinwassers war zwar niedriger, jedoch zeigten sich deutliche Unterschiede innerhalb des Flussquerschnitts (CF 110 für die Leitungen 1-3; CF 30 für Leitung 4). Die östrogenen Aktivitäten für Estron (E_1), 17β -Estradiol (E_2) und 17α -Ethinylestradiol (EE_2) nach SPE lagen im YES, bezogen auf die Ausgangsaktivität vor der Extraktion bei 0,03 % (E_1), 0,003 % (E_2) und 0,001 % (EE_2). Die vorliegenden Befunde zur östrogenen Aktivität untersuchten Wasserextrakte im YES sind mit den Daten andere Studien vergleichbar. Weiterhin lassen die Berechnungen hinsichtlich der Wiederfindungsraten und Aufkonzentrierungsfaktoren darauf schließen, dass nicht nur in den nativen Wasserproben der beiden Kläranlagenausläufe, sondern auch in den verschiedenen Rheinwasserproben eine östrogene Aktivität vorliegt. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der YES auch zum Nachweis östrogenen Aktivität von extrahierten Umweltproben geeignet ist.

3.2.1 Einleitung

Um die Eignung des Yeast Estrogen Screen (YES) im Umweltanalysebereich zum *In vitro*-Nachweis östrogen wirksamer Substanzen in extrahierten Wasserproben zu überprüfen, wurden exemplarisch Wasserproben zweier kommunaler Kläranlagenausläufe sowie vier Oberflächenwasserproben des Rheins herangezogen.

3.2.2 Östrogene Aktivität kommunaler Kläranlagenabwasser- und Rheinwasserproben nach Festphasenextraktion

Nach der Umkehrphasen C_{18} -Festphasenextraktion (RP- C_{18} SPE; RP - reverse phase) beider Kläranlagenabwasserproben konnte eine östrogene Aktivität im Yeast Estrogen Screen (YES) ab einem Konzentrationsfaktor von 2 nachgewiesen werden (Fig. 3.6). Das östrogene Poten-

tial der extrahierten Wasserprobe von Kläranlage 1 (Standort 1) war etwa doppelt so stark, wie das der Kläranlage 2 (Standort 2). Bei einem Konzentrationsfaktor von 30 war das östrogene Potential vom Standort 1 mit dem von 0,3 nM 17β -Estradiol (E_2 , angegeben als E_2 -Äquivalente) vergleichbar, während die extrahierte Wasserprobe von Standort 2 bei höherer Aufkonzentrierung lediglich ein östrogenes Potential von 0,16 nM E_2 -Äquivalenten erreichte. Bei höheren Extraktkonzentrationen war hingegen eine Reduzierung des östrogenen Potentials festzustellen, welches mit toxischen Effekten der Extrakte gegenüber den Hefezellen korreliert werden konnte (dies konnte durch den klaren Boden der 96-Wellplatte in den höchsten beiden Extraktkonzentrationen belegt werden).

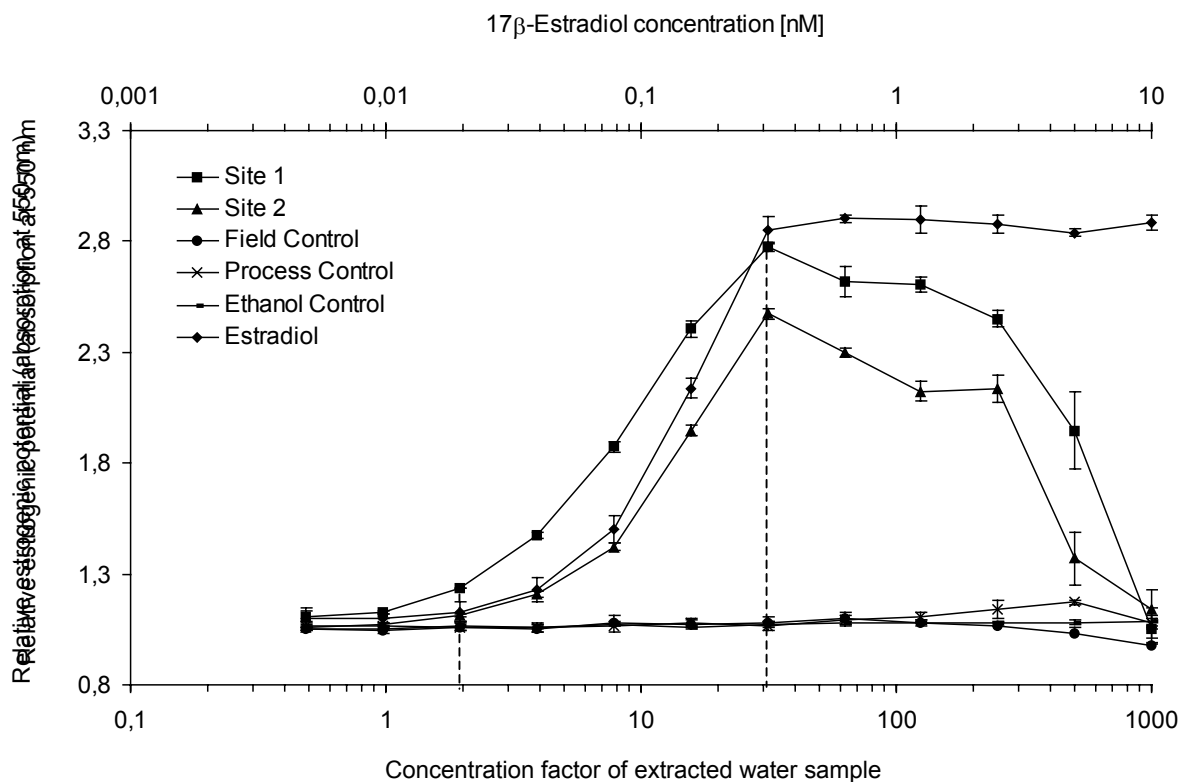


Fig. 3.6. Estrogenic activity of reverse phased C_{18} solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant (STP) effluents at sites 1 and 2 (Rhein-Neckar-triangle SW Germany) in the yeast estrogen screen (YES). In both water sample extracts, estrogenic activity could be detected at a concentration factor of 2. The estrogenic potential of STP effluent 1, however, was about two times higher, if compared to the effluent of STP 2. Data are given as means \pm standard deviation of two independent measurements.

Die östrogenen Aktivitäten aller vier SPE-Wasserproben vom Rhein bei Worms waren im Vergleich zu den Extrakten der beiden kommunalen Kläranlagenabwässer niedriger als diese. Die vier Leitungen wiesen zudem deutliche Unterschiede in ihrem östrogenen Potential auf (Fig. 3.7). In den extrahierten Wasserproben von Leitung 1, 2 und 3 konnte ab einem Aufkonzentrierungsfaktor von ca. 110 eine östrogene Aktivität im YES nachgewiesen werden. Die maximalen Induktionsraten lagen hierbei bei einem Konzentrierungsfaktor von 1000 (Leitung 1, 0,11 nM E_2 -Äquivalente), 500 (Leitung 2, 0,14 nM E_2 -Äquivalente) und 250 (Leitung 3, 0,07 nM E_2 -Äquivalente). Die SPE-Wasserprobe von Leitung 4, welche u.a. den Abwasser-

strom der kommunalen Kläranlage von Standort 2 beinhaltet, war um etwa vierfach mehr östrogen als die extrahierten Wasserproben der anderen drei Leitungen. Die extrahierte Wasserprobe von Leitung 4 wies eine östrogene Aktivität ab einem Konzentrationsfaktor von ca. 30 auf. Die maximalen Induktionsraten lagen bei einer 60-fachen Aufkonzentrierung, welche 0,06 nM E₂-Äquivalenten entsprach.

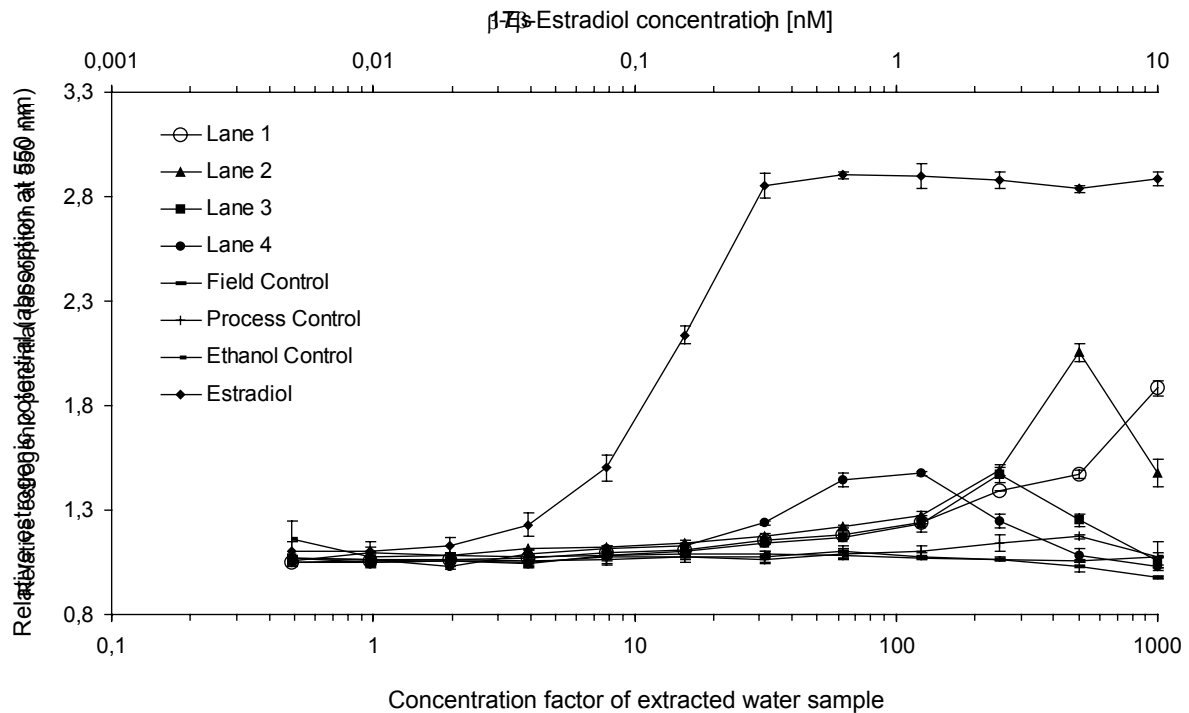


Fig. 3.7. Estrogenic activity of reverse phased C₁₈ solid phase-extracted water samples from river Rhine water at Worms (Rhein-Neckar-triangle SW Germany) in the yeast estrogen screen. Estrogenic activity varied within the different sides of the river: Estrogenic activity in water sample extracts from lane 4 was found at a concentration factor of about 30, whereas estrogenic activity from lanes 1-3 appeared at a concentration factor of about 110. Data are given as means \pm standard deviation of two independent measurements.

3.2.3 Verbleibende östrogene Aktivität von gespiketen Wasserproben nach Umkehrphasen-C₁₈ Festphasenextraktion

Aufgrund des möglichen Verlusts von östrogen aktiven Substanzen während der Umkehrphasen-C₁₈ Festphasenextraktion (RP-C₁₈ SPE) wurden deionisierte Wasserproben mit bekannten Konzentrationen von Estron (E₁), 17 β -Estradiol (E₂) und 17 α -Ethinylestradiol (EE₂) gespiket. Nach der Extraktion wurden die östrogenen Aktivitäten mit denen der Ausgangskonzentration der jeweiligen Substanzen im Yeast Estrogen Screen (YES) verglichen. Nach der RP-C₁₈ SPE lag die östrogene Aktivität einer 10 μ M E₁-Lösung in Ethanol bei ca. 0,03 % der ursprünglichen 10 μ M E₁-Lösung vor der Extraktion (Fig. 3.8). Die verbleibenden östrogenen Aktivitäten von E₂ und EE₂ lagen bei 0,003 bzw. 0,001 % der entsprechenden Ausgangslösungen (Figs. 3.9, 3.10).

3. Ergebnisse und Diskussion

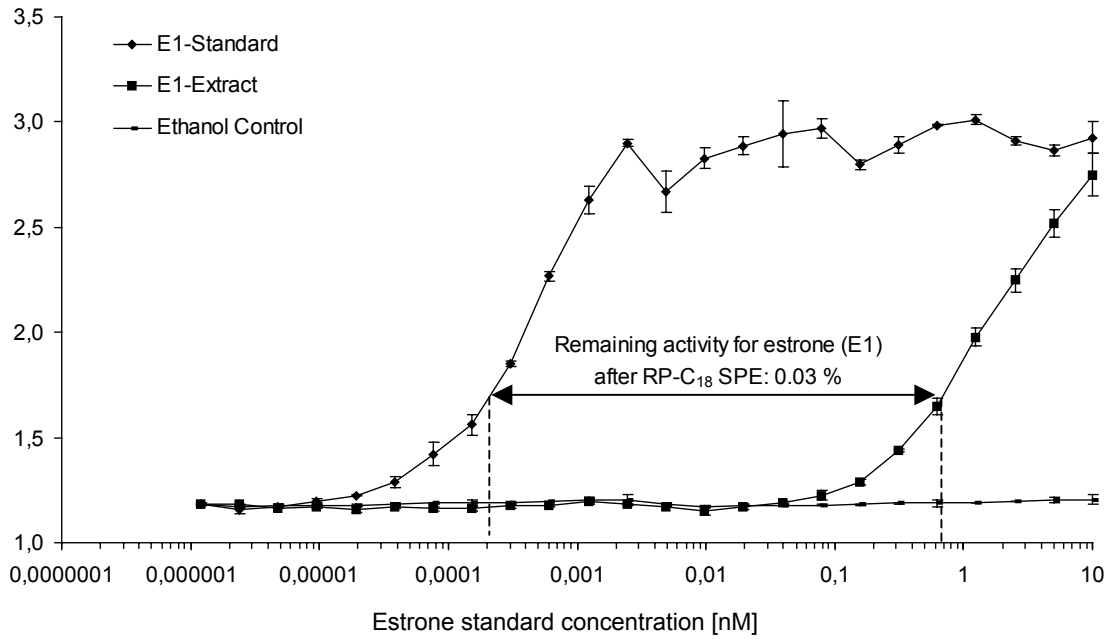


Fig. 3.8. Remaining estrogenic activity of estrone (E_1) after reverse phase C_{18} solid phase extraction (RP- C_{18} SPE) in the yeast estrogen screen. Estrogenic activity of an extracted 20 μM E_1 solution in deionised water was about 0.03 % of the respective stock solution in the yeast estrogen screen. Data are given as means \pm standard deviation of two independent measurements.

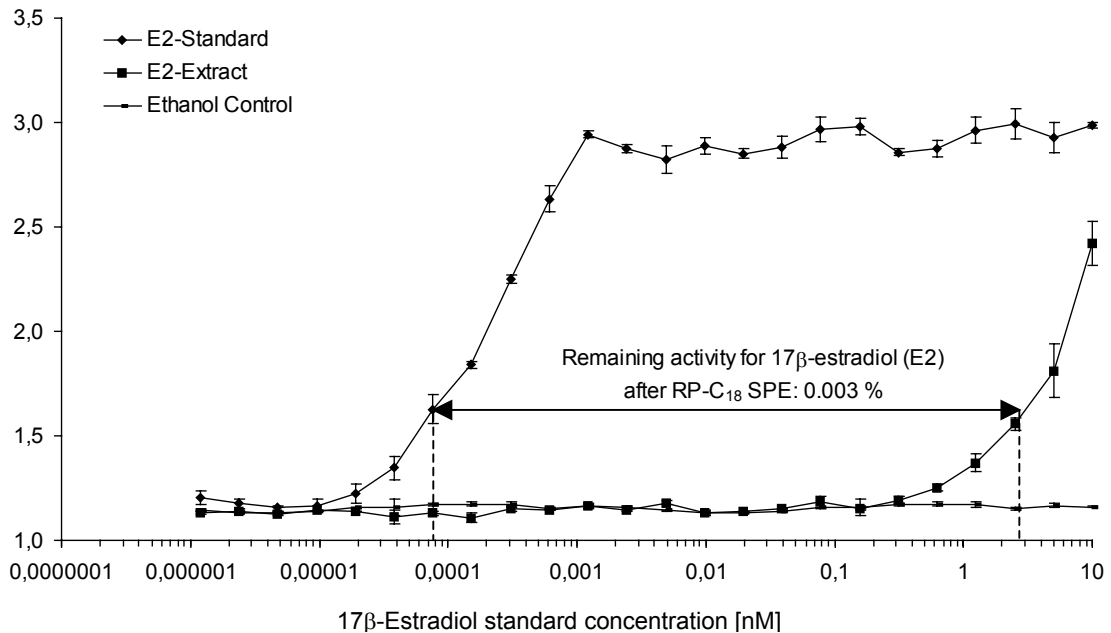


Fig. 3.9. Remaining estrogenic activity of 17 β -estradiol (E_2) after reverse phase C_{18} solid phase extraction (RP- C_{18} SPE) in the yeast estrogen screen. Estrogenic activity of an extracted 20 μM E_2 solution in deionised water was about 0.003 % of the respective stock solution in the yeast estrogen screen. Data are given as means \pm standard deviation of two independent measurements.

3. Ergebnisse und Diskussion

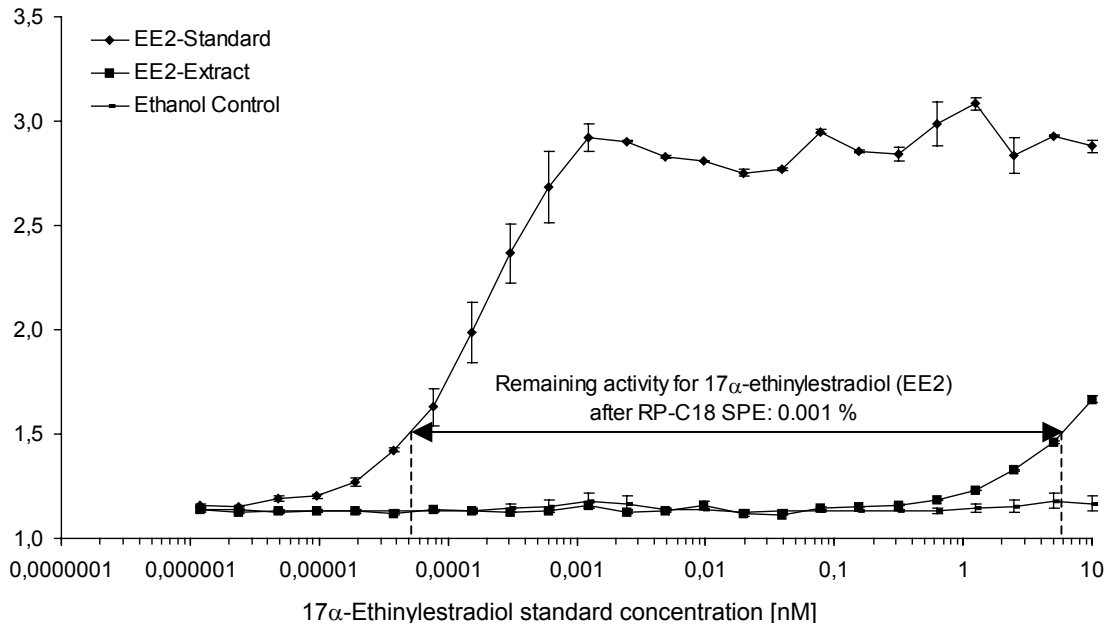


Fig. 3.10. Remaining estrogenic activity of 17α -ethinylestradiol (EE_2) after reverse phase C_{18} solid phase extraction (RP- C_{18} SPE) in the yeast estrogen screen. Estrogenic activity of an extracted $20\ \mu\text{M}$ EE_2 solution in deionised water was about 0.001 % of the respective stock solution in the yeast estrogen screen. Data are given as means \pm standard deviation of two independent measurements.

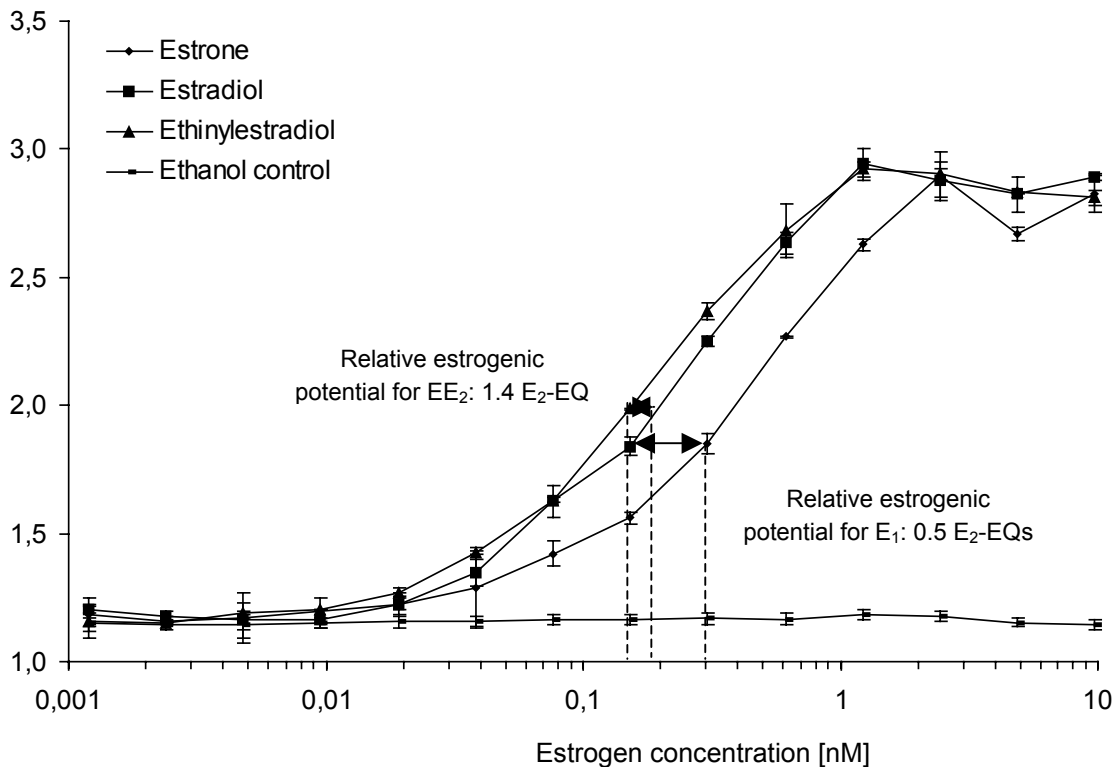


Fig. 3.11. Relative estrogenic potential of the investigated steroidal estrogens estrone (E_1), 17β -estradiol (E_2) and 17α -ethinylestradiol (EE_2) in the yeast estrogen screen (YES). The natural degradation product E_1 was about two-times weaker (0.5 E_2 -equivalents, E_2 -EQs) in the YES, if compared to E_2 . In contrast, the synthetic steroidal estrogen EE_2 was about 1.4-times stronger than E_2 .

Anhand eines Vergleiches der östrogenen Aktivitäten von Estron (E₁), 17β-Estradiol und 17α-Ethinylestradiol (EE₂) im Yeast Estrogen Screen bezogen auf das natürliche Hormon E₂ (dargestellt als E₂-Äquivalente, E₂-EQs) konnten für E₁ ein östrogenes Potential von 0,5 E₂-EQs bzw. 1,4 E₂-EQs für EE₂ festgestellt werden (Fig. 3.11).

3.2.4 Diskussion

Der Yeast Estrogen Screen (YES) stellt ein geeignetes *In vitro*-Testsystem zum Nachweis östrogenen Aktivitäten verschiedener Einzelsubstanzen sowie von Substanzgemischen, wie sie bei Umweltproben vorliegen, dar. In der gegenwärtigen Studie wurde mit Hilfe des YES ein Vergleich der östrogenen Aktivität von Umkehrphasen-C₁₈-festphasenextrahierten (RP-C₁₈ SPE) Wasserproben zweier kommunaler Kläranlagenabwässer (STP, Standort 1 und 2) und von Rheinwasser bei Worms (Standort 3, Leitungen 1 – 4; unterhalb der beiden Kläranlagenausläufe gelegen) durchgeführt. Die östrogene Aktivität der extrahierten Wasserproben der beiden Kläranlagenabwässer war deutlich höher, als die des Rheinwassers. Dies konnte nicht nur anhand des höheren Aufkonzentrierungsfaktors der Rheinwasserextrakte im Vergleich zum Kläranlagenabwasser, sondern auch durch die insgesamt niedrigere Maximalaktivität im YES dargestellt werden. Die extrahierten Wasserproben der beiden Kläranlagen unterschieden sich hingegen nur geringfügig (Standort 1 > Standort 2). Unter Berücksichtigung der Verdünnung des Abwassers im Vorfluter erscheint eine geringere östrogene Aktivität im Rheinwasser im Vergleich zum Kläranlagenabwasser sehr wahrscheinlich. Diese Annahme lässt sich durch mehrere unabhängige Studien zum Gehalt an östrogen wirksamen Substanzen im Ab- und Oberflächenwasser belegen (Belfroid et al. 1999, Kuch and Ballschmiter 2000, 2001, Stumpf et al. 1996). Die Ergebnisse des YES scheinen daher im Vergleich von Ab- und Oberflächenwasser zur Erfassung östrogenen Unterschiede in extrahierten Wasserproben geeignet.

Im Vergleich der vier Wasserproben (Leitung 1 – 4) am Rhein bei Worms zeigten sich deutliche Unterschiede innerhalb des Flussquerschnittes. Während die Wasserextrakte von Leitung 1 – 3 erst ab einem Aufkonzentrierungsfaktor von etwa 110 eine östrogene Aktivität im YES aufwiesen, war die östrogene Aktivität von Leitung 4 (im Einflussbereich der STP am Standort 2) deutlich höher (ab Aufkonzentrierungsfaktor von etwa 30). Da sich Leitung 4 im Einflussbereich der kommunalen Kläranlage am Standort 2 befindet, könnte das Abwasser dieser Kläranlage die Ursache für die höhere Aktivität von Leitung 4 sein. Weiter flussaufwärts liegende Kläranlagen scheinen zu keiner deutlichen Erhöhung der östrogenen Fracht im Rhein beizusteuern, bzw. aufgrund der Verdünnungs- und möglicher biologischer Abbaueffekte im „Hintergrundrauschen“ des Rheinwassers aufzugehen. Dies würde die relativ niedrigen östrogenen Aktivitäten von Leitung 1 (im Einflussbereich einer ca. 10 km flussaufwärtsgelegenen chemischen Industrie bei Ludwigshafen, welche auch kommunale Abwässer aufarbeitet), Leitung 3 (Wasser aus dem Einzugsbereich des Neckars mit dem Abwasser des Standortes 2) und Leitung 2 (Wasser von weiter flussaufwärts) erklären. Vorangegangene Studien zum östrogenen Einflussbereich kommunaler Kläranlagenausläufe im Oberflächenwasserverlauf zeigten,

dass die östrogene Aktivität mit zunehmender Fließstrecke abnimmt (Jürgens et al. 2002). Somit konnten auch Unterschiede in der östrogenen Fracht innerhalb des Rheinquerschnitts in den extrahierten Wasserproben mittels YES nachgewiesen werden.

Ergebnisse einer vorangegangenen Studie aus dem Jahr 1998 mit nichtaufkonzentriertem Rheinwasser von Leitung 1 wiesen jedoch eine östrogene Aktivität in der nativen Wasserprobe mittels YES nach (Diehl et al. 1998). Auch in chemischen Analysen des Rheinwassers bei Wiesbaden konnten östrogen wirksame Substanzen in ng/L-Bereich nachgewiesen werden (Stumpf et al. 1996).

In der vorliegenden Studie war das Wasserextrakt der gleichen Leitung hingegen erst ab einer Aufkonzentrierung von etwa 110 östrogen aktiv. Die Extrakte der beiden Kläranlagenabwässer als auch die des Rheinwassers zeigten ebenfalls erst ab einer Aufkonzentrierung von ≥ 2 (STP) bzw. ≥ 30 (Rhein, Leitung 4) eine östrogene Aktivität im YES. Es wäre demnach zu erwarten gewesen, dass die östrogene Aktivität in den Extrakten, zumindest der Kläranlagenabwässer, auch bei einer Aufkonzentrierung < 1 im YES nachweisbar ist. Zur Klärung, ob nun die geringere Aktivität der untersuchten Extrakte der gegenwärtigen Studie im Vergleich mit der aus dem Jahre 1998 (Diehl et al. 1998) auf eine tatsächlich geringere östrogene Fracht von Ab- und Flusswasser beruht oder auf Aktivitätsverluste während der Extraktion zurückzuführen sind, wurden Wiederfindungsversuche mit bekannten östrogenen Steroiden durchgeführt, welche zumindest in Kläranlagenabwasser den Hauptanteil der östrogenen Aktivität ausmachen (Desbrow et al. 1998). Die Resultate des Wiederfindungsversuchs belegen, dass es sich bei den vorliegenden Befunden keineswegs um eine geringere Gesamtaktivität der untersuchten Wasserproben im Vergleich zu vorangegangenen Studien handelte, sondern vielmehr um die relativ niedrige Restaktivitäten von Estron (0,03 %), 17β -Estradiol (0,003 %) und 17α -Ethinylestradiol (0,001 %) nach erfolgter Extraktion. Zur Kompensation dieser Verluste während der Aufkonzentrierung von Wasserproben werden diesen z.B. in der chemischen Analytik interne Standards (sogenannte Surrogat-Standards) zugesetzt (vgl. Spengler et al. 2001, Stumpf et al. 1996, Ternes et al. 1999). Da diese jedoch ebenfalls eine östrogene Aktivität aufweisen, sind sie für den Einsatz im YES ungeeignet.

Vergleichende Untersuchungen zum östrogenen Aktivität von Estron (E_1), 17β -Estradiol (E_2) und 17α -Ethinylestradiol (EE_2) im YES ergaben, dass alle drei steroiden Östrogene vergleichbare östrogene Potentiale besitzen. So war das natürliche Abbauprodukt von 17β -Estradiol, Estron nur etwa um den Faktor 0,5 schwächer als E_2 , während das synthetische Östrogen EE_2 um den Faktor 1,4 stärker als E_2 war. Auch in Studien mit anderen *in vitro*-Biotests wie Primärhepatocyten (Islinger et al. 1999b, Pelissero et al. 1993) und MCF 7-Zellen (Zava et al. 1997) wird für EE_2 ein östrogenes Potential von 1 – 1,3 E_2 -Äquivalenten angegeben. Anhand von *in vivo*-Studien mit männlichen Dickkopfelritzen konnte für E_1 ein östrogenes Potential nachgewiesen werden, welches ca. etwa 0,3 E_2 -Äquivalenten entsprach (Panter et al. 1998). Die steroiden Östrogene E_1 , E_2 und EE_2 sind aufgrund ihres vergleichbaren östrogenen Potentials als wesentlich aktiver einzuschätzen, als die Gruppen der Phthalate (Jobling et al. 1995) und Alkylphenole (Islinger et al. 1999b, Miles-Richardson et al. 1999b) welche etwa 10^4 bis 10^6 -fach schwächer als E_2 sind.

Unter Einbeziehung der Restaktivität ausgewählter östrogenen Steroide und dem entsprechenden Aufkonzentrierungsfaktor des Rheinwassers von Leitung 1 wäre eine östrogene Aktivität in der nativen Wasserprobe durchaus denkbar. Unter der Annahme, dass die östrogene Aktivität in dem Extrakt zu 100 % auf 17 β -Estradiol (E₂, Restaktivität 0,003 %) zurückzuführen ist und diese ab einer Aufkonzentrierung von ca. 110 im YES nachweisbar war, ergibt sich folgende Berechnung:

$$\ddot{O}A_{\text{nativ}} = \frac{CF_{\text{Extrakt}}}{MFR_{\text{Östrogen}}}$$

Wobei:

- $\ddot{O}A_{\text{nativ}}$ = nachweisbare östrogene Aktivität der nativen Wasserprobe im YES
- CF_{Extrakt} = Aufkonzentrierungsfaktor des Extraktes
- $MFR_{\text{Östrogen}}$ = Multiplikationsfaktor aus verbleibender Restaktivität des jeweiligen Östrogens [%]

Für E₂ und Leitung 4: $MFR_{E_2} = 33333,33$ (aus $100/0,003$)
 $CF_{\text{Leitung 4}} = 110$ als CF-Wert

Daraus folgt: $110 \text{ CF} / 33333,333 = 0,0033 \text{ CF}$

Eine vergleichbare östrogene Aktivität der nativen Wasserprobe von Leitung 4, Rhein würde demzufolge einer Aufkonzentrierung von 0,0033 bzw. einer 1: 303-fachen Verdünnung der nativen Wasserprobe entsprechen. Bei den Kläranlagenausläufen wäre dieser Verdünnungsfaktor weitaus höher anzusiedeln (bei Extrakt mit CF 2: Ca. 0,00006 CF bzw. 1:16666,67 Verdünnung der nativen Probe). Aufgrund der für die Kläranlagen angegeben sehr hohen Verdünnungsangaben lassen sich auch die höheren östrogenen Aktivitäten in Leitung 4 unter dem Einfluss der Kläranlage am Standort 2 erklären. Anhand einer Studie mit exponierten Fischen konnte zudem gezeigt werden, dass sich der Einflussbereich von kommunalen Kläranlagen auch in Fließgewässern über mehrere Kilometer hinweg erstrecken kann (Harries et al. 1996).

3.2.5 Ausblick und notwendige weiterführende Untersuchungen

Unter Berücksichtigung der Befunde zeigte sich, dass die beiden untersuchten Kläranlagenabwässer eine hohe östrogene Fracht aufweisen, deren Einfluss durchaus noch im nachgeschalteten Vorfluter (Standort 2: Rhein) nachweisbar ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass selbst in den Rheinabschnitten mit geringerer östrogenen Aktivität (Leitung 1-3) eine östrogene Belastung nicht ausgeschlossen werden kann. Das mögliche Auftreten einer östrogenen

Aktivität im nativen Rheinwasser könnte sich auch für die darin lebenden Organismen, insbesondere der Fische, nachteilig auswirken. Demzufolge sind weitere Studien zur östrogenen Aktivität in den untersuchten kommunalen Abwässern und dem Rheinwasser unter Einbeziehung von *In vivo*- und *In vitro*-Biotests zur Gefahrenabschätzung sowie einer chemischer Analytik zur Identifizierung und Quantifizierung der östrogenaktiven Substanzen dringend notwendig.

3.3 Kombinierte *In vitro*- und *In situ*-Experimente zur Bestimmung der östrogenen Aktivität von Umweltwasserproben

Zusammenfassung

Vorangegangene Studien zur östrogenen Belastung zweier kommunaler Kläranlagenabwässer sowie des Rheins bei Worms (Rhein-Neckar-Kreis) wiesen an allen drei Standorten ein östrogenes Potential in extrahierten Wasserproben mittels Yeast Estrogen Screen nach. Zur weiteren Abschätzung des östrogenen Potentials beider Abwässer sowie des Rheins bei Worms wurden daher *In situ*-Experimente mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) durchgeführt und mit Daten parallel durchgeführter *In vitro*-Biotests (Yeast Estrogen Screen, 293 HEK-Zellen, Fischprimärhepatocyten) und Wasseranalysen verglichen. Je Standort wurden im Zeitraum von November 2000 bis September 2001 drei Probenahmen durchgeführt. Die Exposition männlicher Regenbogenforellen im Auslauf beider Kläranlagenstandorte führte zu deutlichen hormonellen Effekten mit VTG-mRNA-Gehalten von bis zu 7.160 bzw. 910 $\mu\text{p}/\mu\text{g}$ Total-RNA (Standort 1 bzw. 2). Auch in den *In vitro*-Biotests konnten deutliche östrogene Potentiale nachgewiesen werden. Die Exposition juveniler Regenbogenforellen im Rheinwasser der Leitung 4 (Einflussbereich der zweiten Kläranlage) führte nach zwei Wochen zu keiner Induktion der VTG-mRNA. Dennoch zeigte sich im YES und den Primärhepatocyten der Regenbogenforelle, dass auch im Rheinwasser ein östrogenes Potential vorhanden ist, welches jedoch im Vergleich zu den beiden Kläranlagenabwässern schwächer war. Die chemische Analyse repräsentativer Wasserproben ergab für die beiden Kläranlagenausläufe Östrogengehalte von 5,6 bzw. 1 ng/L 17 β -Estradiol (E₂, Standort 1 bzw. 2), 19 bzw. 1,2 ng/L Estron (Standort 1 bzw. 2) sowie 1,5 ng/L 17 α -Ethinylestradiol. Weiterhin konnten Fecal- und Phytosteroide sowie resorcyclische Lactone und Flavonoide in Gesamtkonzentrationen von 1.204 bzw. 278 ng/L (Standort 1 bzw. 2) nachgewiesen werden. Im Rheinwasser lagen die Konzentrationen der gemessenen Substanzgruppen mit 3,9 ng/L (E₂) bzw. 250 ng/L (Fecal- und Phytosteroide) im Bereich des Kläranlagenauslaufes am Standort 2. Somit ist es durchaus möglich, dass auch in Fließgewässern wie dem Rhein biologisch wirksame Konzentrationen an östrogen wirksamen Substanzen nachzuweisen sind, weshalb eine Gefährdung der Fische im Gewässer nicht ausgeschlossen werden kann.

3.3.1 Einleitung

Vorangegangene Studien zur östrogenen Belastung zweier kommunaler Kläranlagenabwässer sowie des Rheins bei Worms (Rhein-Neckar-Kreis) wiesen an allen drei Standorten ein östrogenes Potential in extrahierten Wasserproben mittels Yeast Estrogen Screen nach. Zur weiteren Abschätzung des östrogenen Potentials beider Abwässer sowie des Rheins bei Worms

wurden daher *In situ*-Experimente mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) durchgeführt und mit Daten parallel durchgeführter *In vitro*-Biotests (Yeast Estrogen Screen, 293 HEK-Zellen, Fischprimärhepatocyten) und Wasseranalysen verglichen. Je Standort wurden im Zeitraum von November 2000 bis September 2001 drei Probenahmen durchgeführt.

3.3.2 Östrogene Aktivität festphasenextrahierter Kläranlagenabwässer im Yeast Estrogen Screen

Während des gesamten Probenahmezeitraumes vom November 2000 (Nov 00) bis September 2001 (Sep 01) konnte mit Hilfe des Yeast Estrogen Screen (YES) in den extrahierten Wasserproben beider kommunaler Kläranlagen (Standort 1 und 2) eine östrogene Aktivität nachgewiesen werden (Fig. 3.11, 3.12), welche im Jahresverlauf nur geringe Unterschiede aufzeigten. Beide Standorte unterschieden sich geringfügig hinsichtlich ihres östrogenen Potentials im Yeast Estrogen Screen (YES), wobei Standort 1 etwas potenter als Standort 2 war.

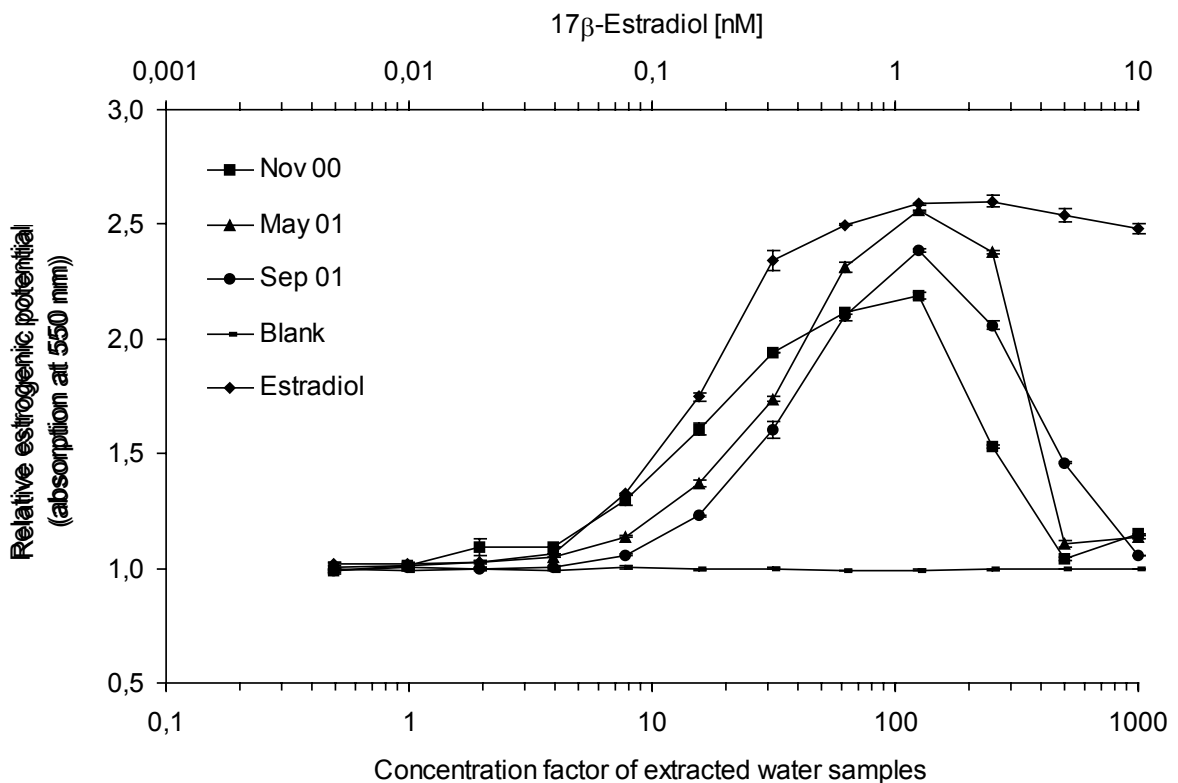


Fig. 3.12. Estrogenic activity of extracted water samples from site 1 (municipal sewage treatment plant 1) in the yeast estrogen screen (YES) from November 2000 (Nov 00) to September 2001 (Sep 01). Estrogenic activities of extracted water samples were similar at all investigated time periods. Extracted water samples from Nov 00 displayed the highest estrogenic activity in the YES, followed by samples from May 2001 (May 01) and Sep 01, respectively. Blank – 99.9 % ethanol.

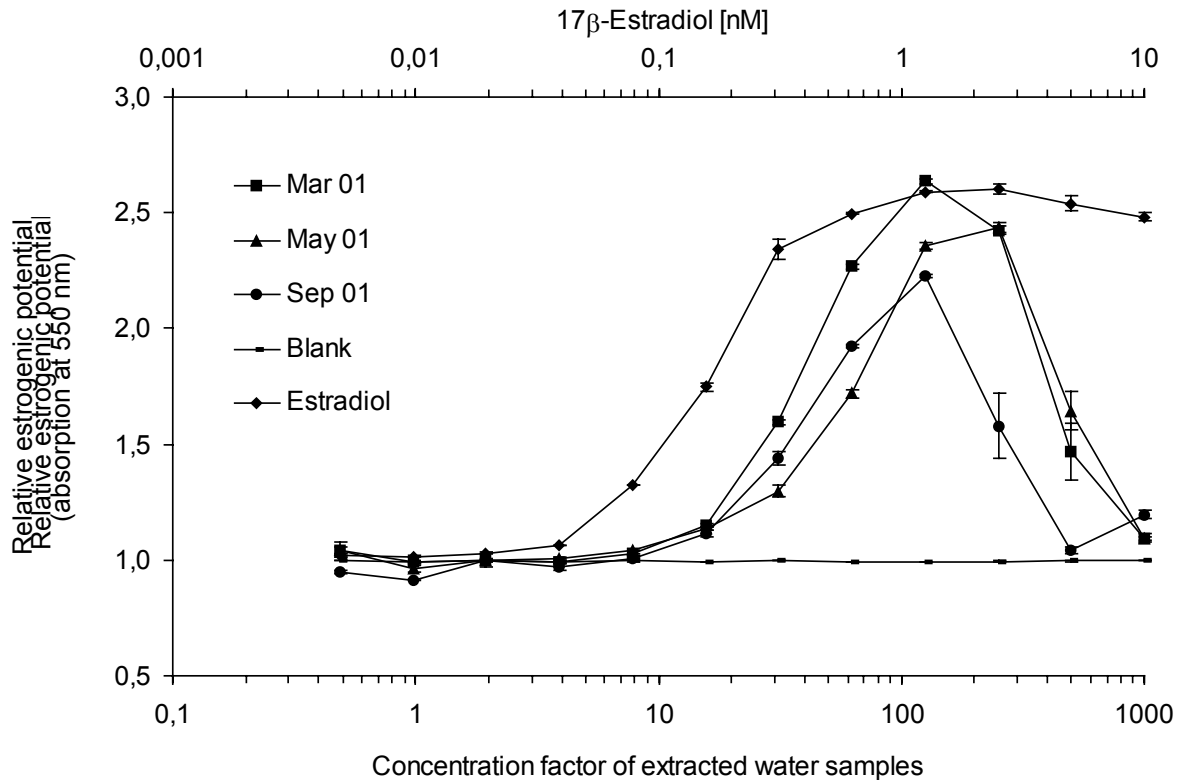


Fig. 3.13. Estrogenic activity of extracted water samples from site 2 (municipal sewage treatment plant 2) in the yeast estrogen screen from March to September 2001 (Mar and Sep 01). Estrogenic activities of extracted water samples were similar at all investigated time periods. Highest estrogenic activity of extracted water samples could be observed in Mar 01, followed by Sep 01 and May 2001 (May 01). Blank – 99.9 % ethanol.

In den extrahierten Abwasserproben der Kläranlage 1 (Standort 1) konnte in den allen Untersuchungsperioden ab einem Aufkonzentrierungsfaktor (CF) von 8 eine östrogene Aktivität im YES ermittelt werden (Fig. 3.12). Im Vergleich der verschiedenen Probenahmezeiträume war das Abwasser vom Nov 00 östrogener als das vom Mai 2001 (Mai 01) und Sep 01, zumindest bis zu einem CF von 30. Bei höherer Aufkonzentrierung traten bei der Probe von Nov 01 bereits erste toxische Effekte des Extrakts auf die Hefezellen auf (vermindertes bis ausbleibendes Zellwachstum in den Wells höherer Extraktkonzentrationen), wodurch das östrogene Potential des Extraktes vermindert wurde. Dennoch lagen die maximalen Werte bei einer Aufkonzentrierung von etwa 150 bei E_2 -Äquivalenten von 0,26 nM (Nov 00 bzw. 0,9 nM ohne vorhandene toxische Effekte bis CF 150), 0,9 nM (Mai 01) und 0,39 nM (Sep 01). Bei jeder weiteren Aufkonzentrierung der Wasserproben wurden die östrogenen Effekte im YES mehr und mehr durch toxische überlagert.

Die östrogene Aktivität aller extrahierten Abwasserproben der kommunalen Kläranlage 2 (Standort 2) war im Vergleich zur ersten Kläranlage niedriger (Fig. 3.13). So konnte erst ab einer Aufkonzentrierung von 15 ein östrogenes Potential dieser Extrakte im YES nachgewiesen werden. Dabei erwies sich die Probe vom März 2001 (Mär 01) als aktivste, gefolgt vom Sep und Mai 01. Die maximalen Werte lagen in den Proben vom März und September 2001 bei E_2 -Äquivalenten von > 1 (Mär 01) bzw. 0,29 nM (Sep 01). Die Probe vom Mai 01 erwies

sich ab einer Aufkonzentrierung von 240 mit 0,4 nM E₂-Äquivalenten am aktivsten. Auch bei den Extraktproben vom Standort 2 traten bei höherer Aufkonzentrierung toxische Effekte im YES auf.

Die extrahierten Wasserproben des Rheinwassers der Lane 4 (Standort 3) wiesen im Vergleich zu den beiden untersuchten kommunalen Kläranlagenabwässern in allen Untersuchungszeiträumen geringere östrogene Aktivitäten im YES auf (Fig. 3.14). Während die Abwasserproben im Jahresverlauf relativ ähnliche östrogene Potentiale aufwiesen, variierten die Wasserproben vom Rhein im Jahresverlauf doch sehr stark. Im Vergleich der Probenahmezeiträume untereinander war der Mai 2001 am aktivsten, gefolgt vom September und März 2001. In der Probe vom Mai zeigte sich eine östrogene Aktivität ab einer Aufkonzentrierung von etwa 30, mit maximalen Werten bei CF 500 und 0,25 nM E₂-Äquivalenten. Hingegen zeigte sich in der Probe vom Mai 01 nur eine schwache, kaum messbare östrogene Aktivität bei einer Aufkonzentrierung von 250 und 0,046 nM E₂-Äquivalenten. Die Probe vom September 2001 war hingegen wieder aktiver als die vom Mai. So konnte in dieser Probe ab einer Aufkonzentrierung von > 100 ein östrogenes Potential im YES nachgewiesen werden. Die maximalen Werte lagen hier bei einem CF von 250 und 0,09 nM E₂-Äquivalenten.

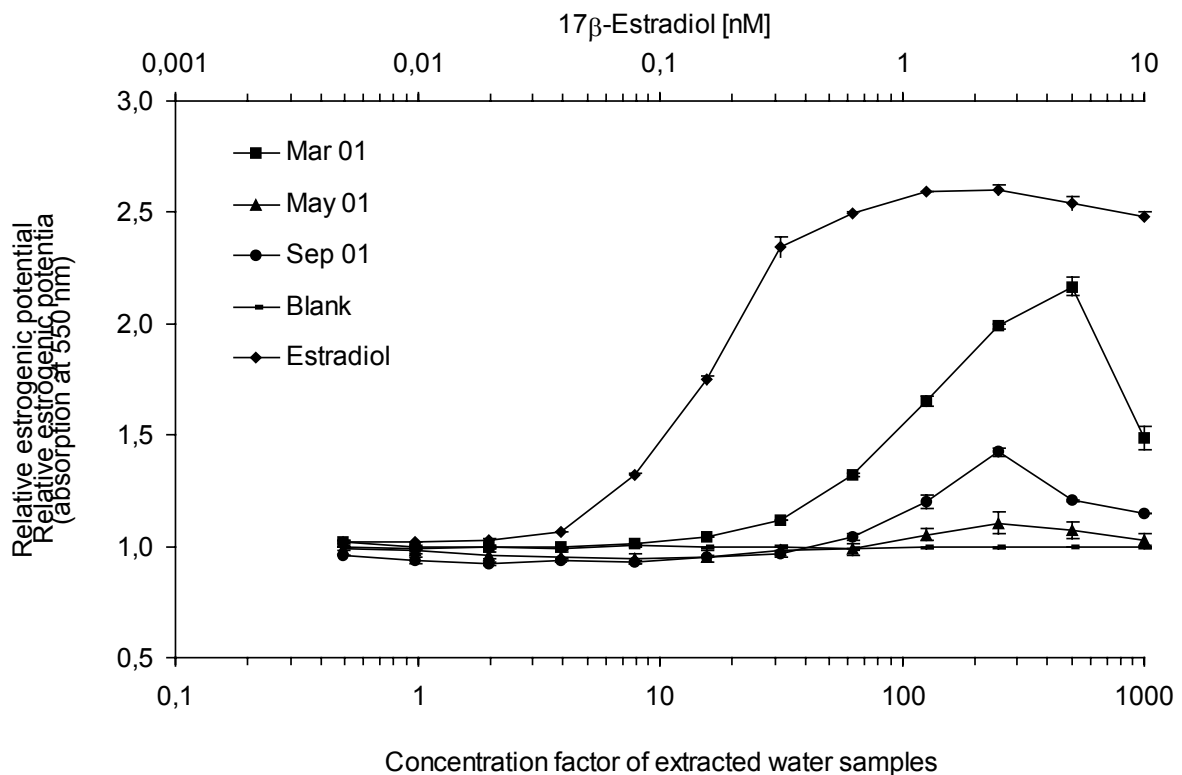


Fig. 3.14. Estrogenic activity of extracted water samples from site 3 (River Rhine, lane 4) in the yeast estrogen screen from March to September 2001 (Mar and Sep 01). During the different time of water sampling, estrogenic activities of extracted water samples in the YES varied between the sampling periods. Estrogenic activity of extracted water sample from Mar 01 was higher, if compared to samples from Sep 01. In May 2001 (May 01); estrogenic activity of extracted water samples in the YES was very low. Blank – 99.9 % ethanol.

3.3.3 Östrogenität von Wasserextrakten in 293 HEK-Zellen

Die Untersuchung der östrogenen Aktivität der extrahierten Wasserproben in 293 HEK-Zellen ergab hinsichtlich der Induktion von ER α und β im Vergleich der drei Standorte kein einheitliches Bild (Fig. 3.15). Am Standort 1 (Kläranlage 1) konnten im November 2000 und im September 2001 mit rund 8 (Nov 00) bzw. 4 pM E₂-Äquivalenten (Sep 01) die höchsten Induktionsraten beim ER α festgestellt werden. Beim ER β lagen die höchsten Induktionsraten hingegen im Mai 01 mit Werten von rund 3 pM E₂-Äquivalenten. Am zweiten Standort (Kläranlage 2) konnten insbesondere beim ER β im Jahresverlauf (von rund 3 pM im März auf rund 10 pM E₂-Äquivalente im September 2001) deutlich zunehmende Induktionsraten durch die Extrakte festgestellt werden. Beim ER α waren die Induktionsraten des zweifach aufkonzentrierten Extraktes hingegen sehr gering und lagen bei rund 1 pM E₂-Äquivalenten.

Am dritten Standort (Rhein) lagen die Induktionsraten bei beiden Estrogenrezeptoren mit E₂-Äquivalenten unter 1 pM im Bereich der Kontrolle. Lediglich im März 2001 war die Aktivität geringfügig höher als die Kontrolle.

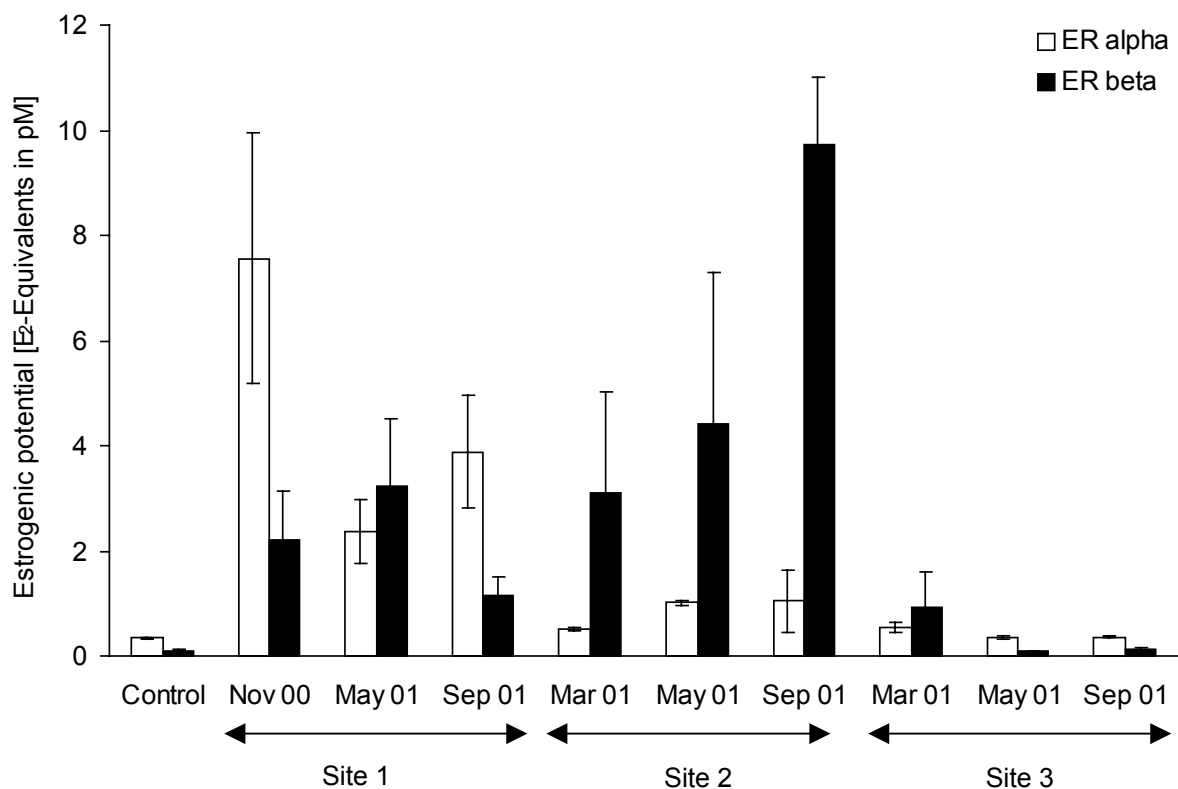


Fig. 3.15. Induction of estrogen receptor α and β (ER α and ER β)-expression in 293 human embryonic kidney (293 HEK) cells after exposure to a 2x concentrated extracted water sample from two municipal sewage treatment plant effluents (site 1 and 2) and Rhine water (site 3). Note the variance in the expression of ER α and β at sites 1 and 2, with induction equivalents up to about 8 (ER α in Nov 00 at site 1) and about 10 pM (ER β in Sep 01 at site 2), respectively. At site 3, no induction of both ERs α and β could be observed in 293 HEK-cells after exposure to extracted water samples from May and Sep 01. Samples from Mar 01 gave a low induction rate of ER α and β . Control – 0.1 % ethanol; Nov 00 – November 2000; Mar 01 – March 2001; May 01 – May 2001; Sep 01 – September 2001.

3.3.4 Vitellogenin-mRNA-Induktion in Primärzellkulturen der Regenbogenforelle

Im gesamten Untersuchungszeitraum konnte in allen Proben der drei untersuchten Standorte ein östrogenes Potential, in Form von induzierter Vitellogenin-mRNA in den Primärhepatocytenkulturen männlicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) festgestellt werden (Fig. 3.16 - 3.18). Die Proben vom Standort 1 (Kläranlage 1) zeigten in der höchsten eingesetzten Extraktkonzentration (50-fach) toxische Effekte bei den Primärhepatocyten, welche sowohl durch eine reduzierte VTG-mRNA-Synthese in den Zellen als auch durch reduziertes Reaggregationsvermögen der Zellen (lichtmikroskopische Beobachtung) feststellbar war (Fig. 3.16). Bei einer 25-fachen Aufkonzentrierung der Extrakte vom November 2000 und Mai 2001 konnte eine Induktion der VTG-mRNA ermittelt werden, welche 7 bzw. 6 nM E₂-Äquivalenten entsprach, während die Probe vom September 2001 lediglich 0,79 – 0,99 nM E₂-Äquivalente erreichte (Fig. 3.16). Die östrogene Aktivität der Extrakte bei 12,5-facher Aufkonzentrierung war bei allen Proben niedriger, im Vergleich zu den entsprechend höheren Konzentrationen, jedoch lagen die Werte von November 2000 und Mai 2001 auch hier über den Werten vom September 2001.

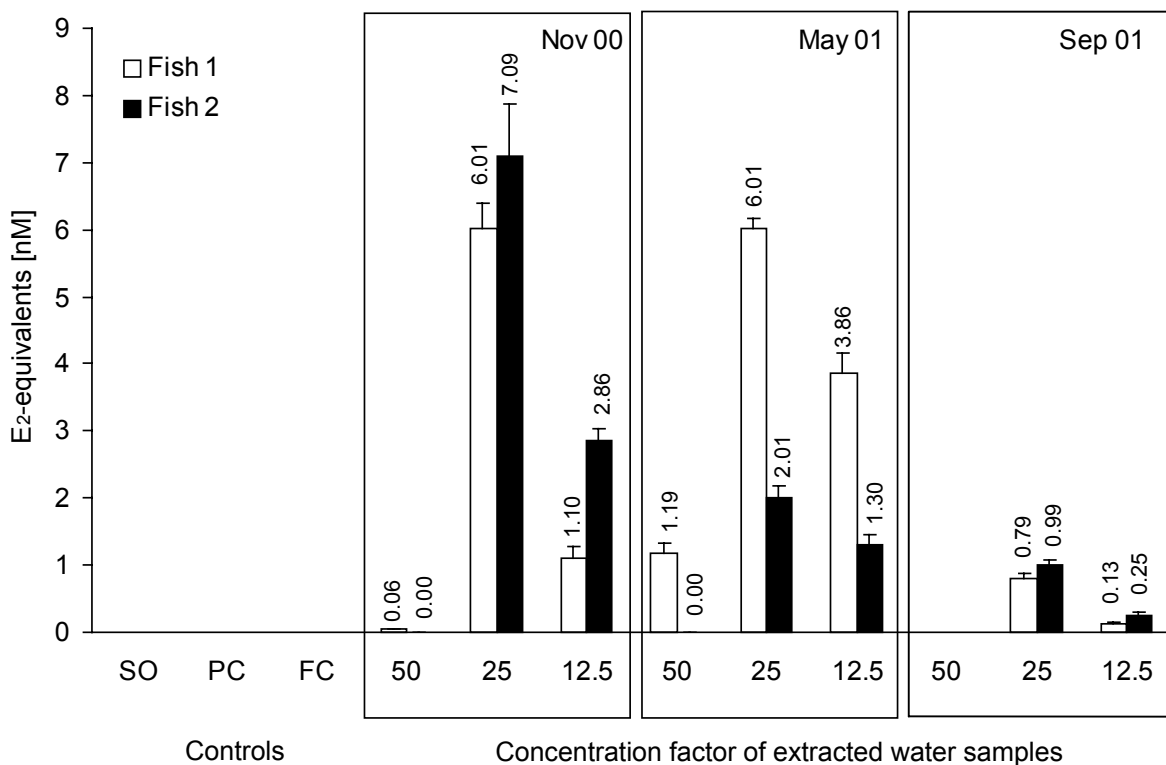


Fig. 3.16. Vitellogenin-mRNA induction in primary rainbow trout hepatocytes after exposure to SPE-extracted effluent samples from the municipal sewage treatment plant at site 1 from different sampling periods during November 2000 (Nov 00) to September 2001 (Sep 01). Induction of VTG-mRNA could be observed during all sampling periods, with acute toxicity effects at the highest concentration factor (CF 50), resulting in a reduced VTG-mRNA induction. Samples from Nov 00 and May 2001 (May 01) were more estrogenic than the sample from Sep 01. SO – Solvent control (0.15 % DMSO); PC – Process control (deionised water); FC – Field control (tap water).

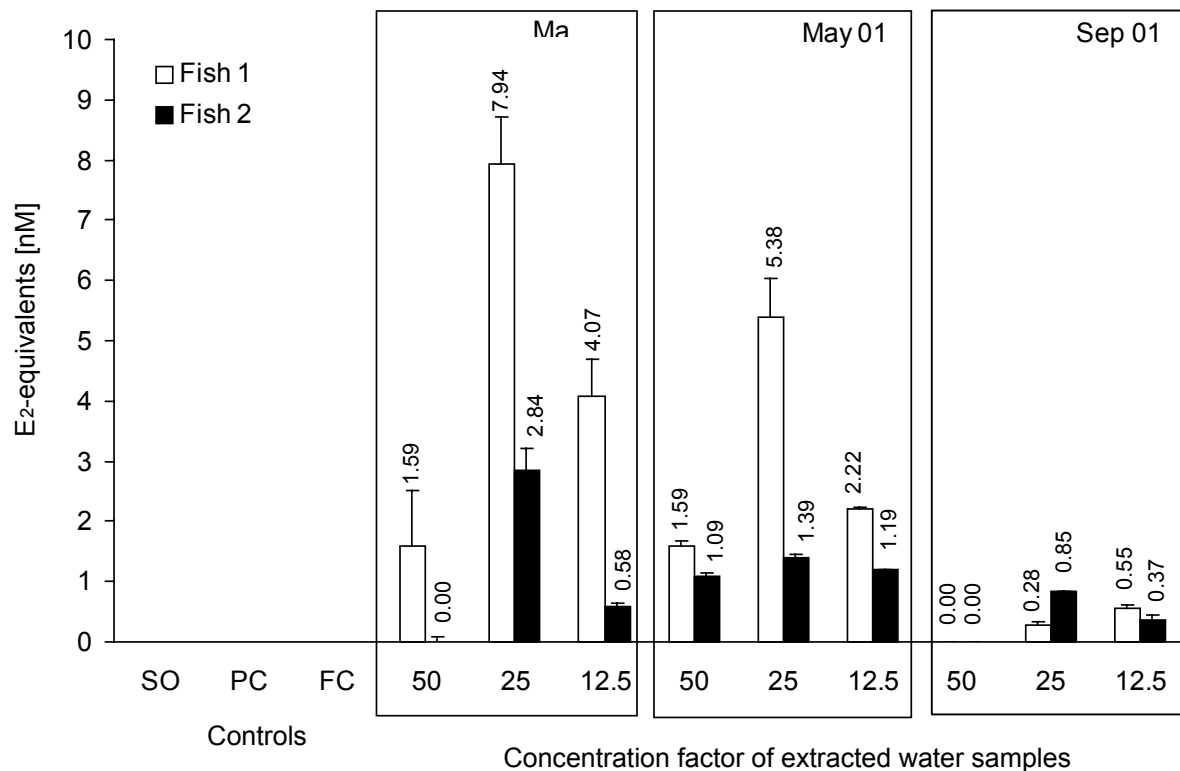


Fig. 3.17. Vitellogenin-mRNA induction in primary rainbow trout hepatocytes after exposure to SPE-extracted effluent samples from the municipal sewage treatment plant at site 2 from different sampling periods during March 2001 (Mar 01) to September 2001 (Sep 01). Induction of VTG-mRNA could be observed during all sampling periods, with acute toxicity effects at the highest concentration factor (CF 50), resulting in a reduced VTG-mRNA induction. Extracted water sample from Mar 01 was found to be the most estrogenic sample, followed by May 2001 (May 01) and Sep 01. SO – Solvent control (0.15 % DMSO); PC – Process control (deionised water); FC – Field control (tap water).

Ähnlich wie bei Standort 1 konnten auch bei den Abwasserextrakten des zweiten Standorts (Kläranlage 2) eine verringerte VTG-mRNA-Synthese in der höchsten eingesetzten Extraktkonzentration (50-fach) aufgrund toxischer Effekte festgestellt werden (Fig. 3.17). Die höchsten VTG-mRNA-Induktionsraten in den beiden Primärzellkulturen konnten hier in den Proben vom Mär 01 mit 2,84 sowie 7,94 (25-fach) bzw. mit 0,58 und 4,07 nM E₂-Äquivalenten (12,5-fach) festgestellt werden. Es folgte die Probe vom Mai 01 mit 1,39 und 5,38 (25-fach) sowie 1,19 und 2,22 nM E₂-Äquivalente. Die niedrigsten VTG-mRNA-Induktionsraten konnten in den Proben vom Sep 01 nachgewiesen werden, welche bei beiden Kulturen unter 0,85 nM E₂-Äquivalenten lagen.

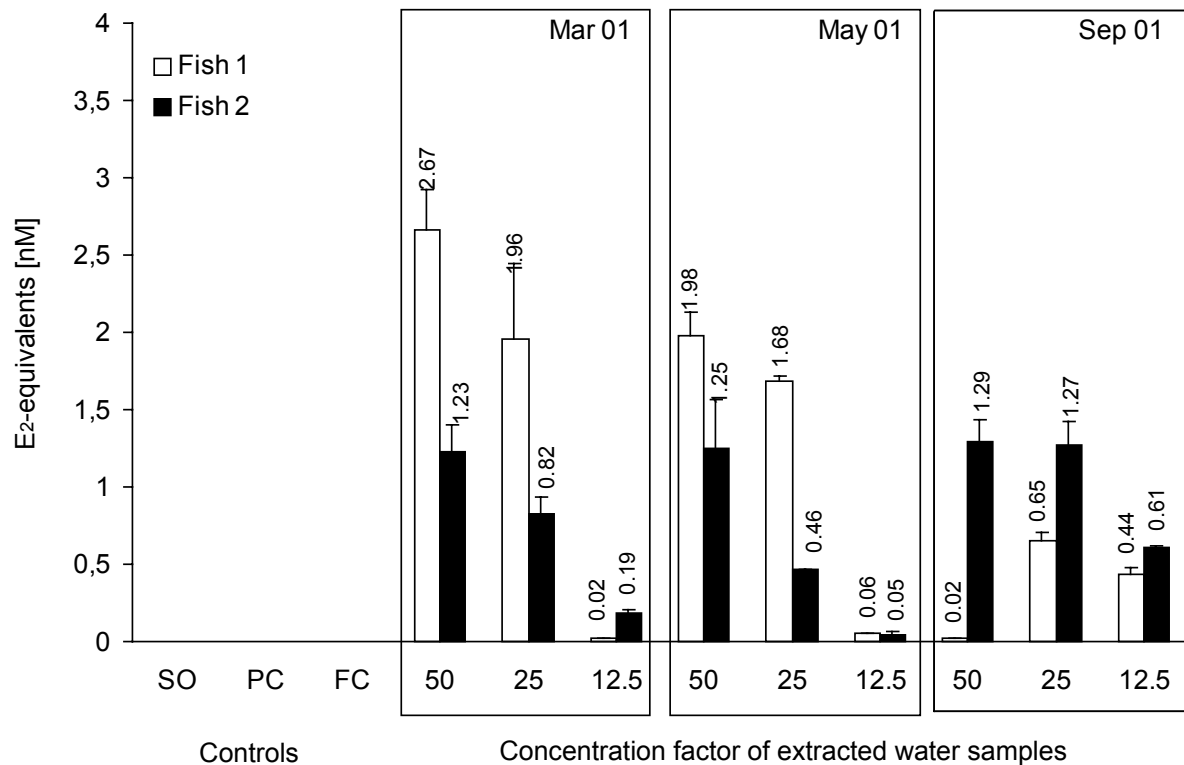


Fig. 3.18. Vitellogenin-mRNA induction in primary rainbow trout hepatocytes after exposure to SPE-extracted Rhine water samples from site 3 at different sampling periods from March 2001 (Mar 01) to September 2001 (Sep 01). Induction of VTG-mRNA could be observed during all sampling periods, with highest rates in March 01, followed by May 2001 (May 01) and Sep 01. SO – Solvent control (0.15 % DMSO); PC – Process control (deionised water); FC – Field control (tap water).

In den untersuchten Extraktproben des Rheinwassers konnte im Vergleich zu den beiden kommunalen Kläranlagen ein geringere östrogene Aktivität in den Primärhepatocyten festgestellt werden. Die maximalen VTG-mRNA-Induktionsraten lagen hier im März 2001 bei 2,67 (Fisch 1) bzw. 1,23 (Fisch 2), sowie bei 1,98 bzw. 1,25 (Fisch 1 bzw. 2) im Mai 2001 und 0,65 bzw. 1,29 nM E₂-Äquivalenten im September 2001 (Fig. 3.18). Lediglich in der höchsten Aufkonzentrierung der Probe vom September 2001 konnte in einem Fisch ein leichter Rückgang der VTG-mRNA-Induktion gegenüber den niedrigeren Extraktkonzentrationen beobachtet werden, was auf leicht toxische Einflüsse auf die Hepatocyten zurückzuführen sein dürfte. In allen drei Untersuchungszeiträumen konnten klare Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen Extraktkonzentration und VTG-mRNA-Induktion nachgewiesen werden, jedoch waren die Unterschiede im Vergleich der drei Probenahmen relativ gering. Die höchsten östrogenen Aktivitäten lassen sich der Probe vom März 2001 zuordnen, gefolgt vom May und September 2001.

3.3.5 Vitellogenin-mRNA-Induktion in *in situ* exponierten Regenbogenforellen

Im Vergleich der drei untersuchten Probenstandorte war die Vitellogenin-mRNA-Induktion in *in situ* exponierten Regenbogenforellen am Standort 1 am höchsten, gefolgt vom Standort 2 (Kläranlage 2) und zuletzt Standort 3 (Rhein mit keiner nachweislichen Induktion). Die VTG-mRNA-Induktionsraten in männlichen Regenbogenforellen am Standort 1 waren im November 00 und März 01 mit Werten von 1850 bis 7160 (Nov 00) bzw. 750 bis 5200 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Total-RNA (Mar 01) in etwa gleich hoch (Fig. 3.19). Im Vergleich hierzu lagen die Induktionsraten vom September 2001 mit Werten von 170 bis 290 $\text{pg VTG-mRNA}/\mu\text{g Total-RNA}$ jedoch deutlich unter denen der Vormonate.

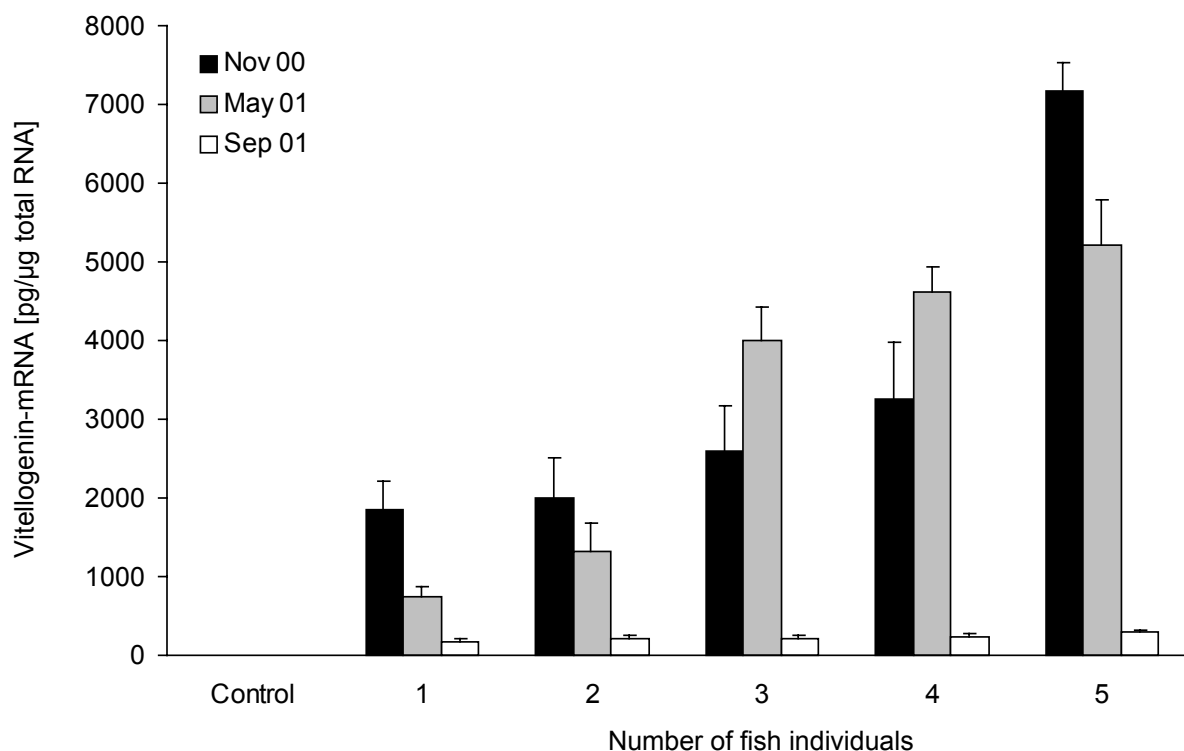


Fig. 3.19. Vitellogenin-mRNA induction in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; $n = 5$) after a three week exposure to municipal sewage treatment plant effluent at site 1 during various seasons from November 2000 (Nov 00) to September 2001 (Sep 01). VTG-mRNA induction in male rainbow trout was similar in Nov 00 and May 2001 (May 01) with values between 1850 to 7160 (Nov 00) and 750 to 5200 $\text{pg}/\mu\text{g}$ total-RNA, respectively. In Sep 01, levels of induced VTG-mRNA were lower, if compared to the previous exposure periods with values 370 to 910 pg/mg total-RNA. Control – tap water control ($n = 5$).

Am zweiten Standort (Kläranlage 2) konnte im März 2001 durch die Östrogenität des Abwassers lediglich in zwei der fünf exponierten Fische eine Induktion der VTG-mRNA festgestellt werden (Fig. 3.20). Selbst bei den beiden positiven Befunden waren die Induktionsraten mit Werten von 3,7 und 11,5 $\text{pg}/\mu\text{g}$ Total-RNA sehr niedrig (Fig. 3.20). Im Mai 2001 lag die Östrogenität der Abwasserproben mit Werten von 107 bis 227 $\text{pg VTG-mRNA}/\mu\text{g Total-RNA}$

RNA hingegen deutlich höher als im März. Die Regenbogenforellen, welche im September 2001 im Abwasser des zweiten Standortes exponiert wurden, wiesen mit Induktionsraten von 370 bis 910 pg VTG-mRNA/ μ g Total-RNA die höchsten Werte an diesem Standort auf.

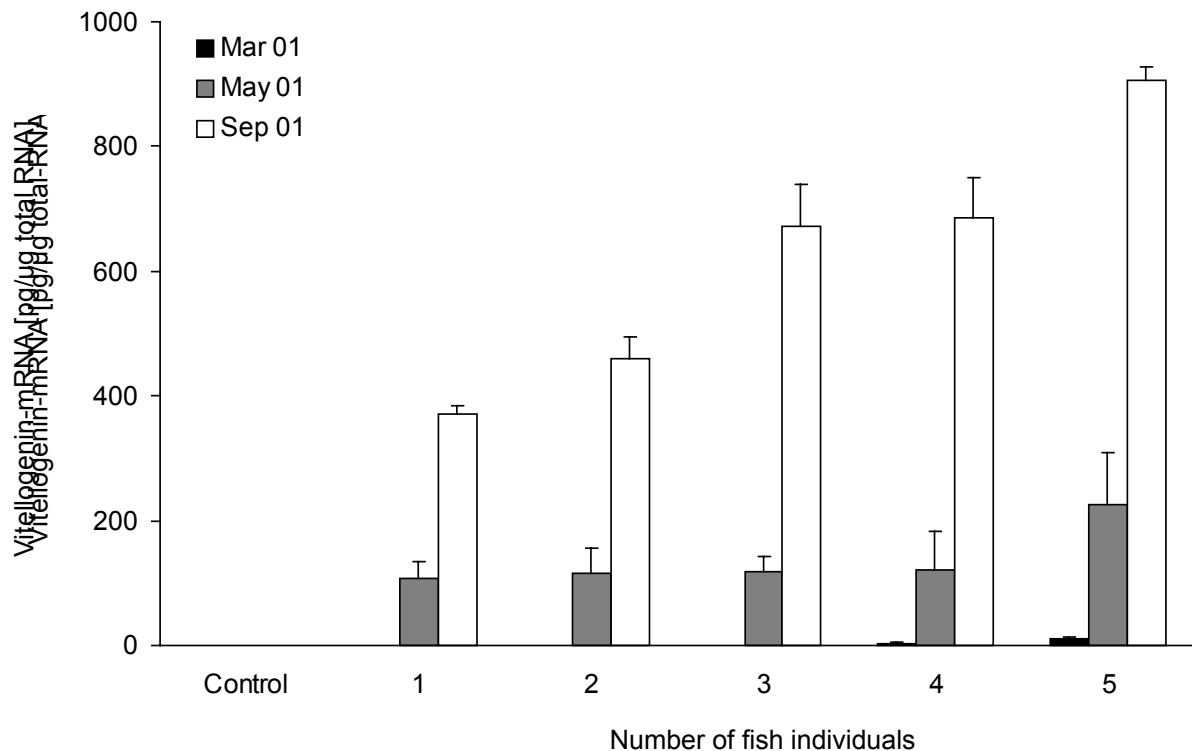


Fig. 3.20. Vitellogenin-mRNA induction in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; $n = 5$) after a three week exposure to municipal sewage treatment plant effluent at site 2 during various seasons from March (Mar 01) to September 2001 (Sep 01). In Mar 01, VTG-mRNA induction was low with levels up to a few pg/ μ g total RNA in only two out of five exposed fish. In May 2001 (may 01), VTG-mRNA induction was higher, but still at a low level ranging from about 107 to 227 pg/ μ g total RNA in all fish. Highest rates of VTG-mRNA induction could be observed in Sep 01 with values between 370 to 910 pg/ μ g total RNA in all fish. Control – tap water control ($n = 5$).

Am dritten Standort (Rhein) wurden juvenile Regenbogenforellen beiderlei Geschlechts über einen den beiden kommunalen Kläranlagen vergleichbaren Zeitraum gegenüber Rheinwasser der Lane 4 exponiert. Zu keinem Zeitpunkt der Exposition konnte in dem männlichen Anteil der Fische eine Induktion der VTG-mRNA festgestellt werden (Fig. 3.21). Bei den Weibchen konnte zwar eine Reduktion der VTG-mRNA beobachtet werden, welche jedoch nicht statistisch unterschiedlich zu den Kontrollen war (Fig. 3.21).

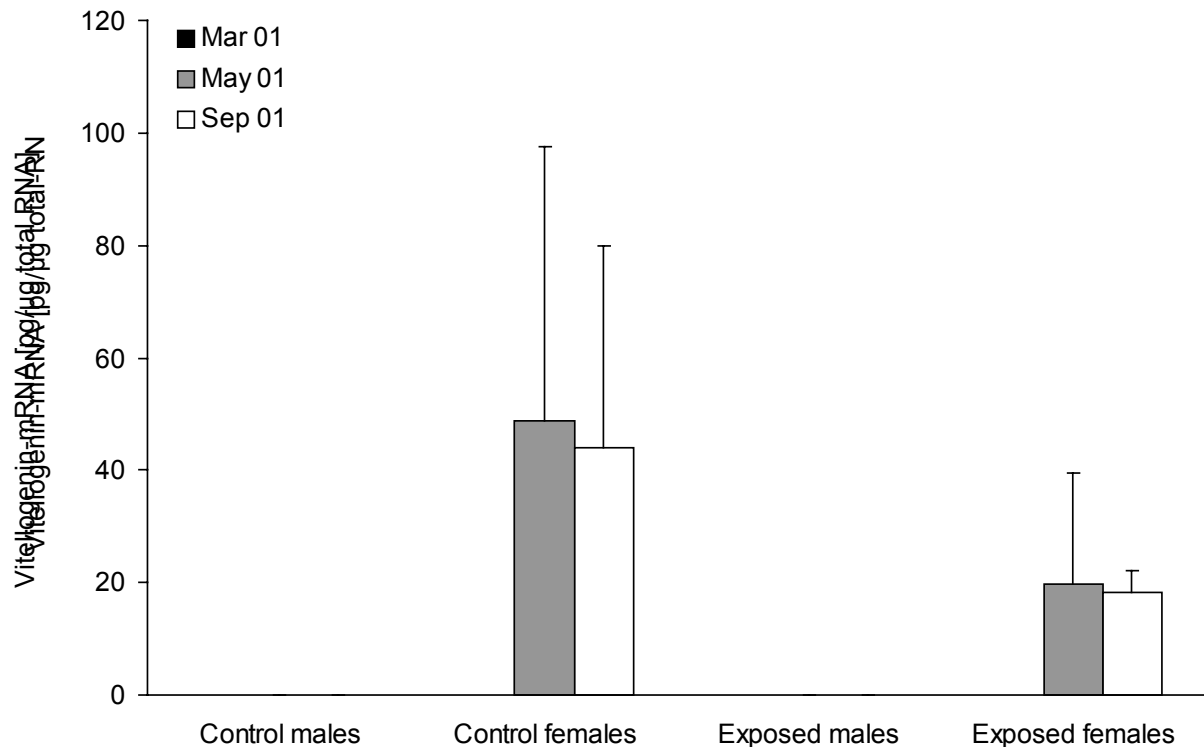


Fig. 3.21. Vitellogenin-mRNA induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after a three week exposure to Rhine water at Worms (site 3) during various seasons from March (Mar 01) to September 2001 (Sep 01). No induction of VTG-mRNA could be detected in juvenile male rainbow trout at any sampling period. Levels of induced VTG-mRNA in juvenile female rainbow trout were not different from the control. Control – tap water control ($n = 5$ for each sex).

3.3.6 Chemische Analyse von Östrogenen, Fecal- und Phytosteroiden, resorcyclischen Lactonen und Flavanoiden in repräsentativen Wasserproben der untersuchten Standorte

Anhand der chemischen Analyse konnten sowohl steroide Östrogene als auch Fecal- und Phytosteroide sowie ein resorcyclisches Lacton und ein Flavonoid in den repräsentativen Wasserproben der drei untersuchten Standorte nachgewiesen werden. Während die steroiden Östrogene lediglich in den filtrierten Wasserproben festgestellt werden konnten, waren die anderen Substanzen auch in den unfiltrierten Proben nachweisbar. Die Werte der identifizierten und quantifizierten Substanzen der unfiltrierten Wasserproben lagen hier deutlich über den Mengenangaben der filtrierten Proben. Grund für diese höheren Werte könnten sowohl Schwebstoffe als auch Mikroorganismen und Algen sein, an welche die nachgewiesenen Substanzen gebunden bzw. Bestandteile dieser Organismen waren und durch die Extraktion der Wasserprobe mit angereichert wurden. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden daher lediglich die Messwerte der filtrierten Probe als Referenzwerte herangezogen, d.h. alle weitere Angaben zu den Daten der chemischen Analyse beziehen sich auf die filtrierte Wasserprobe, da auch die Wasserproben für die Biotest zuvor filtriert wurden.

3. Ergebnisse und Diskussion

In der chemischen Analyse des Kläranlagenabwassers der kommunalen Kläranlage (STP) am Standort 1 konnten in der Summe 26,1 ng/L an steroiden Östrogenen, bestehend aus 19 ng/L Estron (E_1), 5,6 ng/L 17β -Estradiol (E_2) und 1,5 ng/L 17α -Ethinylestradiol (EE_2), nachgewiesen werden (Tab. 3.2). Die Gesamtsumme der Fecal- und Phytosteroide (Coprostanol, Cholesterol, Campesterol, Stigmasterol und β -Sitosterol) sowie der resorcyclischen Lactone (α -Zearalenol) und Flavanoide (Daidzein) in der Wasserprobe betrug 1.194 ng/L (Tab. 3.2). Am zweiten Standort lagen die gemessenen Östrogenkonzentrationen bei 2,2 ng/L, wovon 1,2 ng/L auf E_1 und 1,0 ng/L auf E_2 entfielen. EE_2 konnte in der Wasserprobe hingegen nicht nachgewiesen werden (Tab. 3.2). Die Gesamtkonzentration der Fecal- und Phytosteroide sowie der resorcyclischen Lactone, welche in der Abwasserprobe der kommunalen Kläranlage am Standort 2 gefunden wurden, lag bei 278 ng/L. Flavanoide konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Tab. 3.2. Concentrations (ng/L) of estrogens, fecal- and phytosteroids, resorcylic lactones and flavonoids in STP effluents and a Rhine water sample (detection by GC/ion trap-MS/MS, LC-ESI-tandem-MS and GC/quadrupol MS)

	Site 1		Site 2		Site 3	
	(effluent STP 1)		(effluent STP 2)		(river Rhine, line 4)	
	native	filtered	native	filtered	native	filtered
Estrogens						
17β -Estradiol	n.a.	5.6	n.a.	1	n.a.	3.9
Estrone	n.a.	19	n.a.	1.2	n.a.	< 1*
17α -Ethinylestradiol	n.a.	1.5	n.a.	< 1*	n.a.	< 1*
Fecal-, Phytosteroids						
Coprostanol	6800	560	6200	380	1500	< 50*
Cholesterol	1600	300	1200	< 50*	1400	120
Ergosterol	460	< 50*	< 50*	< 50*	< 50*	< 50*
Campesterol	260	94	170	80	280	< 50*
Stigmasterol	1200	110	580	80	340	130
β -Sitosterol	330	90	< 50	60	37	< 50*
Resorcylic lactone						
α -Zearalenol	< 10*	30	< 10*	20	< 10*	< 10*
Flavonoid						
Daidzein	10.0	10.0	< 10*	< 10*	< 10*	< 10*

* – detection limit; n.a. – not analysed; STP – sewage treatment plant.

In der chemischen Analyse der Wasserprobe von Leitung 4 des Rheinwassers bei Worms (welches den Abwasserstrom der STP am Standort 2 beinhaltet), konnte E₂ in einer Konzentration von 3,9 ng/L nachgewiesen werden, während E₁ und EE₂ nicht feststellbar waren (Tab. 3.2). Resorcyclische Lactone und Flavonoide konnten ebenfalls nicht in der Rheinwasserprobe von Leitung 4 nachgewiesen werden. Fecal- und Phytosteroide waren hingegen in einer Gesamtkonzentration von 250 ng/L feststellbar, wobei 120 ng/L auf Cholesterol und 130 ng/L auf Stigmasterol entfielen.

Die steroiden Östrogene Estradiol-17-valerat und Mestranol, die Fecal- und Phytosteroide Cholestan, Cholestanon, Lanosterol und Progesteron sowie die resorcyclischen Lactone und Flavonoide Biochanin A, Coumestrol, Enterodiol, Enterolacton, Equol, Formononetin, Genistein, Isoliquiritigenin, Matairesinol, Naringenin, Phloretin, α -Zearalanol, Zearalanon und Zearalenon konnten in keiner der untersuchten Wasserprobe nachgewiesen werden (in Tab. 3.2 nicht aufgeführt).

3.3.7 Diskussion

Mit Hilfe kombinierter *In vitro*- und *In situ*-Biotests konnte in den Abwässern zweier kommunaler Kläranlagen (Standort 1 und 2) im Rhein-Neckar-Kreis in allen Untersuchungszeiträumen vom November 2000 (Nov 00) bis September 2001 (Sep 01) ein östrogenes Potential festgestellt werden, wobei der Standort 1 im Vergleich zum Standort 2 ein höheres Potential aufwies. Die Beprobung des Rheins bei Worms (Standort 3) ergab lediglich in den *In vitro*-Biotests ein östrogenes Potential.

Insgesamt zeigte sich an allen drei untersuchten Standorten eine gute Korrelationen zwischen den Befunden aus den *In situ*- und *In vitro*-Biotests (YES, 293 HEK-Zellen, Primärhepatocyten) sowie den Messergebnissen der chemischen Analysen der repräsentativen Wasserproben.

Standort 1 (kommunale Kläranlage 1) wies im Vergleich zu den beiden anderen Standorten (2 und 3) bei allen *In vitro*- und *In situ*-Biotests zum Nachweis östrogenen Aktivität die höchsten Potentiale auf (Tab. 3.3). Insbesondere in den beiden Beprobungszeiträumen November 2000 und Mai 2001 waren bei den exponierten männlichen Regenbogenforellen deutliche VTG-mRNA-Induktionsraten nach zweiwöchiger Belastung festzustellen, welche sich auch in den Extrakten mittels YES und Primärhepatocyten der Regenbogenforelle nachweisen ließen. Bei vergleichbarer Aufkonzentrierung der Extrakte war das östrogene Potential der Probe in den Primärhepatocyten jedoch deutlich höher als im YES. Bei den 293-HEK-Zellen zeigten sich Unterschiede im Reaktionsverhalten beider Assay-Subtypen (ER α - und ER β): Beim ER α -Test, dessen Estrogenrezeptor-Typ dem des YES entspricht, konnten im November 2000 deutlich höhere Werte nachgewiesen werden, als dies für den ER β -Test bzw. zu anderen Probenahmezeitpunkten der Fall war, an dem das östrogene Potential, bezogen auf die E₂-Äquivalente, deutlich geringer als im YES und in den Primärhepatocyten war und im Bereich weniger pM E₂-Äquivalente lag.

Tab. 3.3. Relative sensitivities of *in vitro*- and *in situ*-biotests to detect estrogenic activity in environmental water samples

Investigated testing system	Site 1 (STP 1)			Site 2 (STP 2)			Site 3 (Rhine)		
	Nov 00	Mar 01	Sep 01	Mar 01	May 01	Sep 01	Mar 01	May 01	Sep 01
<i>In situ</i> -experiments (rainbow trout)	+++	+++	++	+	+	++	-	-	-
Primary rainbow trout hepatocytes	+++	+++	+	+++	+++	+	++	++	+
Yeast estrogen screen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-/+	+
ER luciferase assay									
ER α -type	+++	+	++	-/+	+	+	-/+	-	-
ER β -type	++	++	+	+	++	+++	-/+	-	-
Chemical analysis [ng/L]									
Steroidal estrogens		26.6			2.2			3.9	
Fecal- and phytosteroids		1,154			600			250	
Resorcyclic lactones		30			20			b.d.*	
Flavonoids		10			b.d.*			b.d.*	

Nov 00: November 2000; Mar 01: March 2001; May 01: May 2001; Sep 01: September 2001; -: no effect; +: little effect; ++: moderate effect; +++: strong effect; b.d. below detection limit (* < 10 ng/L).

Für das insgesamt höhere östrogene Potential am Standort 1 während der Untersuchungszeiträume im November 2000 und Mai 2001 könnten mehrere Faktoren verantwortlich sein. Der Einfluss der Wassertemperatur (15,3 °C im Nov gegenüber 18,3 °C im Mai) auf die biologischen Abbauprozesse scheint hier jedoch keine bedeutende Rolle zu spielen, da bereits in einer vorherigen Studie keine signifikanten jahreszeitliche Schwankungen in der Konzentration an den steroiden Östrogenen E₂ und EE₂ festgestellt werden konnte (Huang and Sedlak 2001). Auch sind die Temperaturunterschiede vom November 2000 und Mai bzw. September 2001 nicht besonders groß, so dass sich hiermit nur bedingt die niedrigeren Werte im September 2001 erklären lassen würden. Vielmehr könnte hier der aktuelle Wasserdurchfluss in der kommunalen Kläranlage eine weitere wichtigere Rolle spielen: Die geringere biologische Abbaurate östrogen wirksamer Substanzen könnte durch den geringfügig höheren Wasserdurchfluss in der Kläranlage im November (65.474 im Nov bzw. 63.116 m³/Tag im Mai, siehe Tab. 2.2) wieder kompensiert worden sein. Die Durchflussrate im September 2001 lag um rund 20 % über den Werten vom November und Mai (vgl. Tab 2.2). Auch an der zweiten Kläranlage zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Vitellogenin-mRNA-Expressionsrate exponierter Regenbogenforellen gegenüber der aktuellen Durchflussrate, wobei die Maximalwerte dennoch deutlich unter denen des ersten Standortes lagen.

In den *In vitro*-Biotests waren die Unterschiede beider Standorte im Vergleich zu den *In situ*-Experimenten geringer, dennoch konnte insbesondere beim YES und den Primärhepatocyten für den ersten Standort ein höheres östrogenes Potential nachgewiesen werden (Tab. 3.3).

Beim Luciferase-Assay waren Unterschiede im Reaktionsverhalten beider Estrogenrezeptoren in Abhängigkeit von dem Standort festzustellen. So konnten beim ER α (mit dem ER des YES vergleichbar) für den ersten Standort im Vergleich zu dem zweiten deutlich höhere Induktionsraten festgestellt werden, während beim ER β beim zweiten Standort höhere Werte gemessen wurden. Bisherige Erkenntnisse belegen, dass sich beide Estrogenrezeptoren sowohl hinsichtlich ihrer Verteilung im Gewebe (Couse et al. 1997, Socorro et al. 2000) als auch bezüglich ihrer Wirkungsweise unterscheiden (Kuiper et al. 1998), wodurch sich die Unterschiede in den Befunden aus dem Luciferase-Assay erklären lassen. Die Unterschiede im Reaktionsverhalten beider Estrogenrezeptor-Typen lassen auf verschiedenartige Wirkungsmechanismen der östrogen aktiven Substanzen beider Standorte schließen, welche sich möglicherweise außerhalb des analysierten Stoffspektrums (z.B. An- bzw. Abwesenheit von Nonylphenolen, Bisphenolen, o.ä.) befanden.

Die Untersuchung des Rheinwassers der Leitung 4 am dritten Standort ergab gegenüber den beiden Kläranlagenabläufen eine insgesamt geringere östrogene Aktivität in den Biotests. Während bei der *In situ*-Exposition juveniler Regenbogenforellen nach 15-tägiger Belastung keine Effekte auf die Vitellogenin-mRNA-Synthese nachgewiesen werden konnten, zeigte sich bei den *In vitro*-Biotests mit Hefezellen und Primärhepatocyten bei entsprechender Aufkonzentrierung der untersuchten Wasserproben ein deutliches östrogenes Potential. Auffällig waren hier jedoch die z.T. deutlichen Unterschiede im Reaktionsverhalten der beiden Biotests (relativ konstante östrogene Aktivität der drei Proben in den Primärhepatocyten gegenüber starken Schwankungen in der Aktivität im Yeast Estrogen Screen, vgl. Tab. 3.3). Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise auf unterschiedliche stoffwechselphysiologische Eigenheiten der beiden Zelltypen (Hefezelle – Leberzelle) zurückführen. Insbesondere Aspekte der Biotransformation (vgl. Kolanczyk et al. 1999, Lester et al. 1993, Scholz et al. 1998) könnten zu höherer östrogenen Aktivität in den Primärhepatocyten geführt haben. Im Luciferase-Assay mit 293 HEK-Zellen konnten bei zweifacher Aufkonzentrierung der Wasserproben vom dritten Standort keine nennenswerten Induktionsraten von ER α und ER β festgestellt werden. Da der Luciferase-Assay jedoch bei beiden Extraktproben der beiden kommunalen Kläranlagen im Vergleich zu YES und Primärhepatocyten bereits relativ geringe E₂-Äquivalente aufzeigte, ist hier eine zu geringe Konzentration an östrogen wirksamen Substanzen in den Rheinwasserextrakten anzunehmen.

Vergleicht man die Befunde aus den kombinierten *In situ*- und *In vitro*-Biotests der drei Probenstandorte mit den Ergebnissen der chemischen Analyse, so lassen sich diese gut mit den Konzentrationen nachgewiesener östrogen aktiver Substanzen korrelieren (Tab. 3.3). So wurden am ersten Standort die höchsten Konzentrationen an steroiden Östrogenen (insgesamt 26,6 ng/L) und Fecal- und Phytosteroiden sowie resorcyclische Lactone und Flavonoide (insgesamt 1,194 μ g/L) in einer repräsentativen Wasserprobe nachgewiesen, während am zweiten Standort 2,2 ng/L an steroiden Östrogenen und 0,62 μ g/L an resorcyclischen Lactonen, Fecal- und Phytosteroiden feststellbar waren (Tab. 3.3.). Zwar lag am dritten Standort (Rhein) die Konzentration an steroiden Östrogenen mit 3,9 ng/L (E₂) über dem Wert der zweiten Kläranlage (in dessen Einflussbereich sich die dritte Probestelle befand), jedoch war die gemessene Konzentration an Fecal- und Phytosteroiden mit 0,25 μ g/L deutlich niedriger.

Hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit der nachgewiesenen östrogen wirksamen Substanzen lässt sich insbesondere bei den exponierten Regenbogenforellen die Induktion der Vitellogenin-mRNA nicht zwangsläufig auf die Anwesenheit steroider Östrogene beschränken, da bei vergleichbaren Konzentrationen dieser Substanzgruppe (hier E₁ bzw. E₂) im Auslauf der zweiten Kläranlage sowie in der Leitung 4 des Rheins auch hinsichtlich der Fische vergleichbare Reaktionen anzunehmen gewesen wären. Möglicherweise spielen hier die gemessenen Konzentrationen an Fecal- und Phytosteroiden sowie der resorcyclischen Lactone in den jeweiligen Wasserproben ebenfalls eine bedeutende Rolle. So werden den Phytoöstrogenen östrogene Potentiale zugesprochen, welche um den Faktor 10³ – 10⁴ schwächer sind, als das des natürlichen Östrogens E₂, jedoch lassen die gemessenen Konzentrationen im µg/L-Bereich auf biologisch wirksame Konzentrationen insbesondere im Kläranlagenabwasser schließen (Dubé and MacLatchy 2001, Spengler et al. 2001, Stumpf et al. 1996, Tremblay and Van der Kraak 1998, 1999). Ob weitere Stoffgruppen wie Alkylphenole und Bisphenole (s.o.) an der östrogenen Aktivität der untersuchten Wasserproben beteiligt sind, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Jedoch zeigten vorangegangene Studien, dass sich die östrogene Wirkung insbesondere von Kläranlagenabwässern weitgehend (bis zu 90 %) auf die Anwesenheit steroider Östrogene zurückführen lässt (vgl. Desbrow et al. 1998). Bei Wasserproben aus Oberflächengewässern ist diese Zuordnung jedoch nicht ohne weiteres möglich (vgl. Field and Reed 1996, Hale et al. 2000, Nimrod and Benson 1996, Senthilkumar et al. 1999, Thomas et al. 2001).

Grundsätzlich sollte man sowohl bei biologischen als auch bei chemischen Nachweisverfahren zu östrogen wirksamen Substanzen in Umweltproben annehmen, dass die Konzentration dieser Substanzen im Vorfluter im Vergleich zum Kläranlagenauslauf aufgrund von Verdünnungseffekten abnimmt. Gerade im Bezug auf die zweite Kläranlage und dem sich anschließenden Rheinabschnitt (Leitung 4) wäre demnach mit starken Verdünnungen (ca. 5.000 m³/Tag für Kläranlage gegenüber ca. 1.500 – 2.000 m³/s für Leitung 4 des Rheins bei Worms) der östrogen wirksamen Substanzen bis unterhalb der Nachweisgrenze zu erwarten gewesen. Dem widersprechen jedoch die vorliegenden Befunde aus den *In vitro*-Biotests und der chemischer Analytik. Es ist daher anzunehmen, dass für die relativ hohen östrogenen Aktivitäten bzw. Konzentrationen an östrogen wirksamen Substanzen im Rhein weitere Quellen verantwortlich sind, welche weiter stromaufwärts liegen. So befinden sich z.B. eine weitere kommunale Kläranlage (mögliche Quelle für sterioide Östrogene) etwa 10 km sowie eine papierverarbeitende Industrie (mögliche Quelle für Phytoöstrogene) etwa 15 km stromaufwärts von der Probenstelle am Rhein. Dies würde jedoch bedeuten, dass unter Berücksichtigung der sinkenden östrogenen Aktivität im Oberflächengewässer mit zunehmender Entfernung vom Einleiter (vgl. Jürgens et al. 2002) entweder die Abbauraten relativ gering wären bzw. weiter stromaufwärts deutlich höhere Konzentrationen an steroiden Östrogenen und Fecal- und Phytosteroiden im Rheinwasser enthalten sein müssten. Auch in vorherigen Studien konnten sterioide Östrogene im Rheinwasser im Konzentrationsbereich von wenigen ng/L festgestellt werden (E₁ bis 2,9; E₂ bis 2,9 und EE₂ bis 4,3 ng/L; Belfroid et al. 1999, Stumpf et al. 1996). Versuche mit männlichen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), wie sie in Großbritannien durchgeführt wurden, zeigten, dass sich die östrogenen Einflüsse von Kläranlagen noch mehrere km stromabwärts auf die exponierten Fische im Fließgewässer auswirken können

(Harries et al. 1996). Allerdings wurden hier Alkylphenole als Ursache für die östrogene Aktivität verantwortlich gemacht (Harries et al. 1996).

Aufgrund der vorliegenden Befunde findet zwar eine sehr starke Verdünnung des Abwassers am Standort 2 mit dem Rheinwasser statt. Es ist jedoch anzunehmen, dass das Rheinwasser selbst bereits eine östrogene Fracht trägt, welche sich sowohl chemisch als auch biologisch (YES, Primärhepatocyten, 293 ER-Luciferase Assay) nachweisen lässt. Aufgrund der weitaus komplexeren Zusammensetzung von Oberflächengewässern wie dem Rhein (vgl. Gülden et al. 1997) kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass sich im Rhein ein weitaus größeres Spektrum an östrogen wirksamen Substanzen befindet. Dies würde erklären, warum bei den *In vitro*-Biotests (insbesondere YES und Primärhepatocyten) mit unterschiedlichen stoffwechselphysiologischen Eigenschaften z.T. deutliche Unterschiede im Reaktionsverhalten nach Belastung mit den Rheinwasserextrakten auftraten. Zwar konnten in der vorliegenden Studie keine östrogenen Einflüsse des Rheinwassers der Leitung 4 auf die exponierten juvenilen Regenbogenforellen festgestellt werden, das Vorhandensein steroider Östrogene im ng/L-Bereich deutet jedoch auf ein umweltrelevantes Gefährdungspotential hin. Es muss hierbei beachtet werden, dass während der Expositionszeiträume z.T. deutlich erhöhte Wasserstände im Rhein zu verzeichnen waren, während die chemische Analyse zu einem Zeitpunkt mit relativem Normalwasserstand durchgeführt wurde, so dass durchaus starke Unterschiede in den Belastungsgraden existieren können. Weiterhin zeigten *In situ*-Experimente mit Rotaugen (*Rutilus rutilus*), dass die minimale Abwasserkonzentrationen, welche zu einer Plasma-VTG-Induktion in den Fische führt, mit zunehmender Expositionszeit (1 gegenüber 4 Monate) von 37,9 auf 9,4 % gesenkt werden konnte (Rodgers-Gray et al. 2000). Da die Konzentrationen an östrogen wirksamen Substanzen im Abwasser zwar kurzfristig schwanken, jedoch über längerer Zeiträume relativ konstant sein sollten, ist demzufolge von niedrigeren Wirkungsschwellen östrogen aktiver Substanzen bei längerer Expositionszeit auszugehen. Daher kann auch bei wildlebenden Fischpopulationen des Rheins eine hormonelle Beeinflussung durch östrogen wirksame Substanzen derzeit nicht ausgeschlossen werden.

Insbesondere bei kleineren Fließgewässern mit weitaus geringeren Verdünnungsfaktoren des Abwassers kommunaler Kläranlagen lassen die im Abwasser gemessenen Konzentrationen an steroiden Östrogenen (0,4 bis 220 ng/L für E₁, 0,5 bis 19 ng/L für E₂, 0,5 bis 7,5 ng/L für EE₂, Belfroid et al. 1999, Desbrow et al. 1998, Johnson et al. 2000, Rodgers-Gray et al. 2000, Ternes et al. 1999, 2001) auf biologisch wirksame Konzentrationen im Gewässer schließen. So gaben Johnson and Sumpter (2001) durchschnittliche Östrogenkonzentrationen von 5 (E₁), 1,5 (E₂), 20 (Estriol, E₃) bzw. 0,5 ng/L (EE₂) im Kläranlagenabwasser an, wobei neben E₁ und E₂ insbesondere EE₂ besondere Bedeutung hinsichtlich des Einflusses auf die Umwelt zugeschrieben wurde, wobei EE₂ *in vivo* wesentlich aktiver als E₂ (ca. 12-fach) erscheint (Johnson and Sumpter 2001). Estriol wurde hingegen nur geringe ökologische Relevanz zugesprochen. Dies zeigt, dass die vorliegenden Befunde aus den Biotests mit den relativ niedrigen gemessenen Östrogenkonzentrationen (vgl. Tab. 3.3) durchaus an anderen Standorten aufgrund der östrogenen Fracht von Kläranlagenabwässern reproduzierbar sein sollten, und dass die mögliche Gefährdung einheimischer Fischpopulationen durch östrogen aktive Substanzen durchaus kein lokales Problem darstellt. Gerade im Bezug auf die Abschätzung einer Gefährdung von

Fischpopulationen in kleineren Fließgewässern fehlt es bisher an entsprechenden Daten, so dass hier noch ein erheblicher Forschungsbedarf besteht.

Bei der Beurteilung von Fließgewässern hinsichtlich östrogenen Substanzen mittels chemischer Analytik muss darüber hinaus möglicherweise ein weitaus größeres Substanzspektrum in Betracht gezogen werden, weil noch weitere Substanzen neben den mittlerweile routinemäßig erfassten steroiden Östrogenen eine wichtige Rolle spielen. Ansatzweise konnte dies bereits durch verschiedene *In vitro*- und *in vivo*-Studien mit aquatischen und semiaquatischen Organismen nach Belastung mit Pestiziden (Christiansen et al. 2000, Donohoe and Curtis 1996, Garner et al. 1999, Knudsen and Pottinger 1999, Leblond et al. 2001, Tavera-Mendoza et al. 2002, Tyler et al. 2000, Willingham and Crews 1999) sowie Phyto- und Mykoöstrogenen (Kuiper et al. 1998, Makarevich et al. 1997, Mäkelä et al. 1995, Mellanen et al. 1996, Spengler et al. 2001, Tremblay and Van der Kraak 1999) festgestellt werden. So konnten viele dieser Substanzen in Konzentrationen bis zu wenigen $\mu\text{g/L}$ in Oberflächengewässern nachgewiesen werden (Bätscher et al. 1999, Gülden et al. 1997, Senthilkumar et al. 1999). Bei den hier untersuchten *In vitro*-Biotests erwiesen sich insbesondere die Primärhepatocyten der Regenbogenforelle aufgrund ihrer stoffwechsel-physiologischen Besonderheiten (Braunbeck et al. 1995a, Hauck et al. 1993) in verschiedenen Umweltwasserproben als relativ empfindlich gegenüber östrogen wirksamen Substanzen (vgl. Tab. 3.3). Weiterhin zeigte sich hier eine gute Korrelation zu den *In situ*-Befunden, so dass insbesondere Fischprimärhepatocyten einen wichtigen Beitrag zur Erfassung östrogenen Aktivitäten in Umweltwasserproben und deren mögliche Auswirkungen auf Fische leisten können.

3.3.8 Ausblick

Anhand verschiedener Biomarker konnte sowohl *In vitro* als auch *In situ* gezeigt werden, dass selbst Kurzzeitexposition männlicher Regenbogenforellen im Abwasser kommunaler Kläranlagen zu hormonellen Störungen führen kann. Selbst im großen Oberflächengewässern wie dem Rhein lassen sich sowohl östrogene Gesamtaktivitäten mittels *In vitro*-Biotests als auch östrogen aktive Substanzen mittels chemischer Analyse nachweisen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch im Rhein hormonelle Einflüsse auf Fische bei lebenslanger Exposition auftreten können. Im übertragenen Sinne sind insbesondere Fische in kleineren Fließgewässern, in welche Abwässer kommunaler Kläranlagen eingeleitet werden, möglicherweise extremen hormonellen Einflüssen durch östrogen aktive Substanzen ausgesetzt. Hierzu sind allerdings weitere Studien notwendig, um ein genaueres Bild über die östrogene Belastung von einheimischen Fischen durch östrogen aktive Substanzen aus kommunalen Kläranlagen zu erhalten. Ferner wurden in der gegenwärtigen Studie lediglich Biomarker zum Nachweis östrogenen Aktivität in den Wasserproben verwendet. Daher wäre eine weiterführende Studie zur Relevanz solcher Biomarker insbesondere auf Fische und deren Reproduktionsvermögen notwendig.

3.4 Effekte von 17 α -Ethinylestradiol im Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*)

Zusammenfassung

Mit Blick auf die Entwicklung und Validierung eines praktikablen und kostengünstigen *In vivo*-Testsystem zur Erfassung von hormonellen Störungen (speziell durch sogenannte Umweltöstrogene) wurden die Effekte von 17 α -Ethinylestradiol im Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) untersucht. Geschlechtsreife männliche und weibliche Dickkopfelritzen wurden zunächst bei 15 °C und einem Tag:Nacht-Rhythmus von 8:16 h gehältert, bevor sie bei 25 °C und einem Tag:Nacht-Rhythmus von 16:8 h im Gonadal Recrudescence Assay mit verschiedenen Konzentrationen des synthetischen Östrogens 17 α -Ethinylestradiol (0, 0,1, 1, 3, 10, 100 ng/L EE₂) belastet wurden. Nach dreiwöchiger Belastung wurden Effekte auf Plasmavitellogenin (VTG), sekundäre Geschlechtsmerkmale, Gonadenwachstum (gonadosomatischer Index, GSI) und Konditionsfaktor untersucht. Zusätzlich wurden Effekte auf Leber- und Gonadengewebe mit Hilfe von Licht- und Elektronenmikroskopie untersucht. Für Reproduktionsanalysen (Eiproduktion, Befruchtungsrate) wurden die zuvor exponierten Dickkopfelritzen für weitere drei Wochen in sauberem Wasser gehalten. Die Exposition gegenüber EE₂ resultierte in einer signifikanten Abnahme des Gonadenwachstums (GSI), des Konditionsfaktors, sowie der Gelegezahl und ihrer Befruchtungsrate ab Konzentrationen von 10 und 100 ng/L EE₂. Bei den Weibchen konnte eine Reduktion des parenchymatischen Gewebes in den Ovarien sowie ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber ab einer EE₂-Konzentration von ≥ 3 ng/L festgestellt werden. Die niedrigste effektive Konzentration (LOEC – lowest observed effective concentration) für Plasmavitellogenin-Induktion in beiden Geschlechtern sowie für ultrastrukturelle Veränderungen in den Hoden und der Leber von Männchen lag bei 1 ng/L EE₂. Zudem konnte ein signifikanter Anstieg in der durchschnittlichen Eizahl/Pair nach Belastung mit 0,1 und 1 ng/L EE₂ beobachtet werden. Parallel hierzu konnte bei 0,1 und 1 ng/L EE₂ eine tendenzielle Zunahme der Primärfollikel in den Ovarien beobachtet werden. Bei höheren EE₂-Konzentrationen zeigte sich jedoch eine dosisabhängige Abnahme in der durchschnittlichen Anzahl der Eier/Pair.

3.4.1 Einleitung

Mit Blick auf die Entwicklung und Validierung eines praktikablen und kostengünstigen *In vivo*-Testsystem zur Erfassung von hormonellen Störungen in Fischen (speziell durch sogenannte Umweltöstrogene) wurden die Effekte von 17 α -Ethinylestradiol im Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) untersucht.

3.4.2 Konditionsfaktor und Gonadenwachstum

Nach dreiwöchiger Exposition konnte weder in den Kontrollen noch nach Belastung mit 0,1, 1, 3 und 10 ng/L 17 α -Ethinylestradiol (EE₂) ein signifikanter Unterschied im Konditionsfaktor der Weibchen festgestellt werden (Fig. 3.22). Bei einer Konzentration von 100 ng/L EE₂ zeigte sich jedoch ein negativer Effekt auf die Kondition der Weibchen. In Männchen konnte ein signifikanter Rückgang im Konditionsfaktor nach dreiwöchiger Belastung mit ≥ 10 ng/L EE₂ festgestellt werden ($R^2 = 0,9974$; $p < 0,05$; Fig. 3.22).

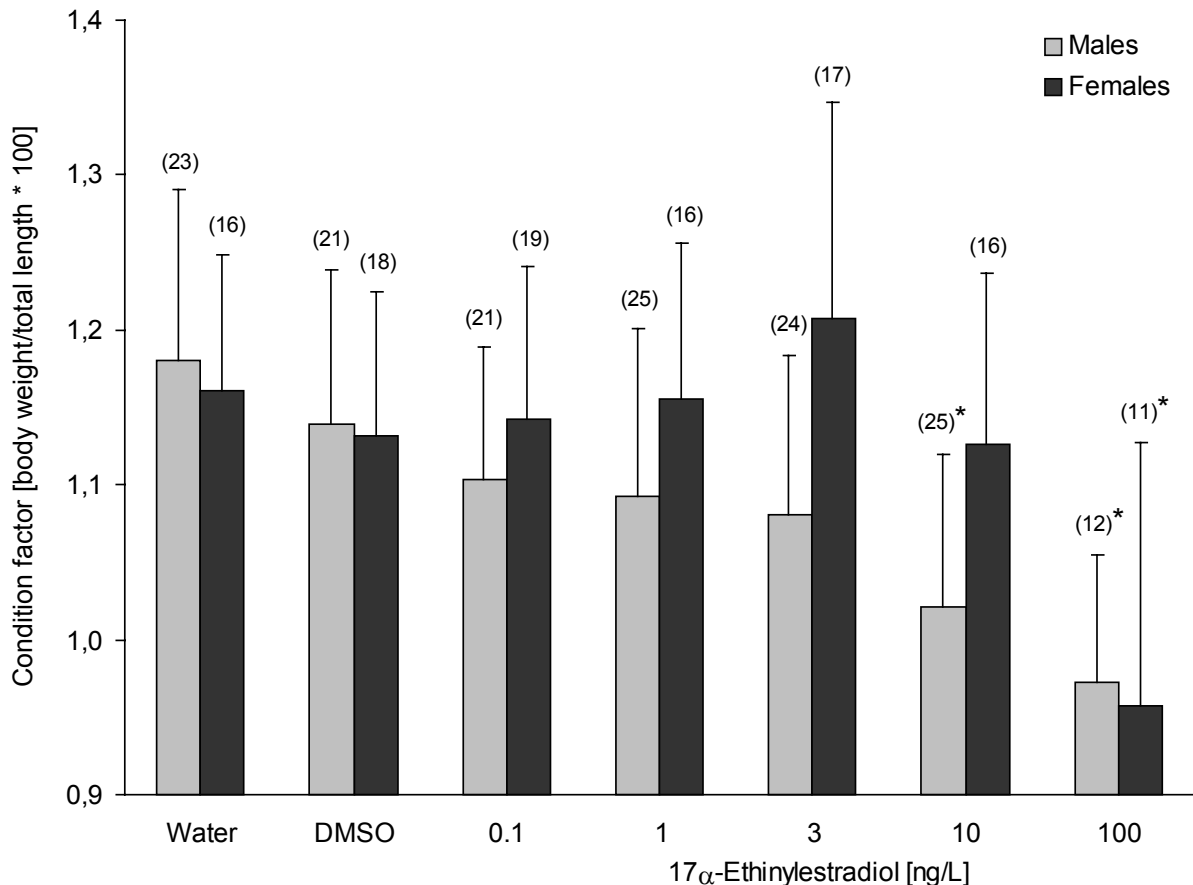


Fig. 3.22. Condition factor (CF) of male and female fathead minnow after exposure to 17 α -ethinylestradiol (EE₂) in the gonadal recrudescence assay. At EE₂ concentrations ≥ 10 ng/L ($R^2 = 0.9974$), the condition factor in males decreased, whereas in females, the CF was only reduced at 100 ng/L EE₂. Numbers of fish are given in brackets. DMSO – 0.01 % DMSO. * $p < 0.05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunn's post-hoc test).

Bei den Weibchen konnte eine Hemmung des Gonadenwachstums (reduzierter gonadosomatischer Index, GSI) nach Belastung mit 100 ng/L EE₂ beobachtet werden; der GSI lag hier bei nur noch ca. 20 % im Vergleich zu den Kontrollen (Fig. 3.23). Bei den Männchen konnten negative Einflüsse von EE₂ auf das Gonadenwachstum ab einer Konzentration von 10 ng/L EE₂ festgestellt werden: Der GSI lag bei den Männchen, welche mit 10 und 100 ng/L EE₂ belastet wurden bei lediglich 33 %, im Vergleich zu den Kontrollen (Fig. 3.23; $R^2 = 0,8583$, $p < 0,05$).

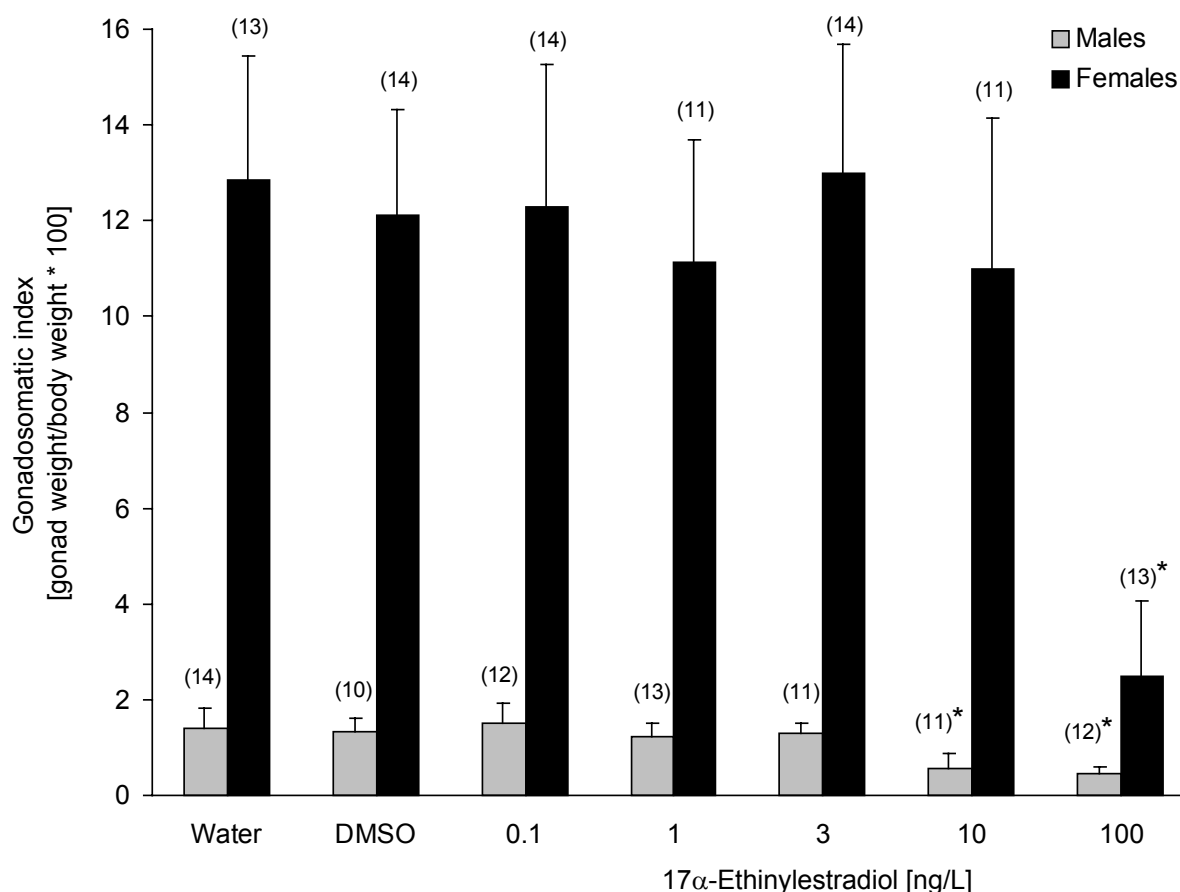


Fig. 3.23. Gonadosomatic index (GSI) of male and female fathead minnow after exposure to 17 α -ethinylestradiol (EE₂) in the gonadal recrudescence assay. At EE₂ concentrations ≥ 10 ng/L, the GSI in males was decreased ($R^2 = 0.8583$), whereas in females a reduced GSI could only be observed at 100 ng/L EE₂. Numbers of fish are given in brackets. DMSO – 0.01 % DMSO. * $p < 0.05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunn's post-hoc test).

3.4.3 Sekundäre Geschlechtsmerkmale

In der vorliegenden Studie mit EE₂ traten Tuberkel ausschließlich im männlichen Geschlecht exponierter Fische auf. Innerhalb der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Tuberkel auf dem Kopf männlicher Dickkopfelritzen festgestellt werden. In Männchen, welche mit 0,1 ng/L EE₂ belastet wurden, zeigte sich eine tendenzielle Reduktion der Tuberkelzahl, welche jedoch nicht signifikant war (Fig. 3.24). Im Gegensatz hierzu zeigten Männchen, welche mit EE₂-Konzentrationen ≥ 1 ng/L belastet wurden, eine dosisabhängige Reduktion der Tuberkelzahl ($R^2 = 0,9811$, $p < 0,05$). Bei einer Belastung mit 3 ng/L EE₂, lag die Tuberkelzahl bei 50 % und bei 10 ng/L bei 10 % der Kontrollen. In der höchsten Schadstoffkonzentration konnten keine Tuberkel mehr auf dem Köpfen der männlichen Dickkopfelritzen beobachtet werden. Dieser Befund deckt sich mit denen der Männchen, welche unter Winterbedingungen gehalten wurden, wo ebenfalls keine Tuberkel feststellbar sind.

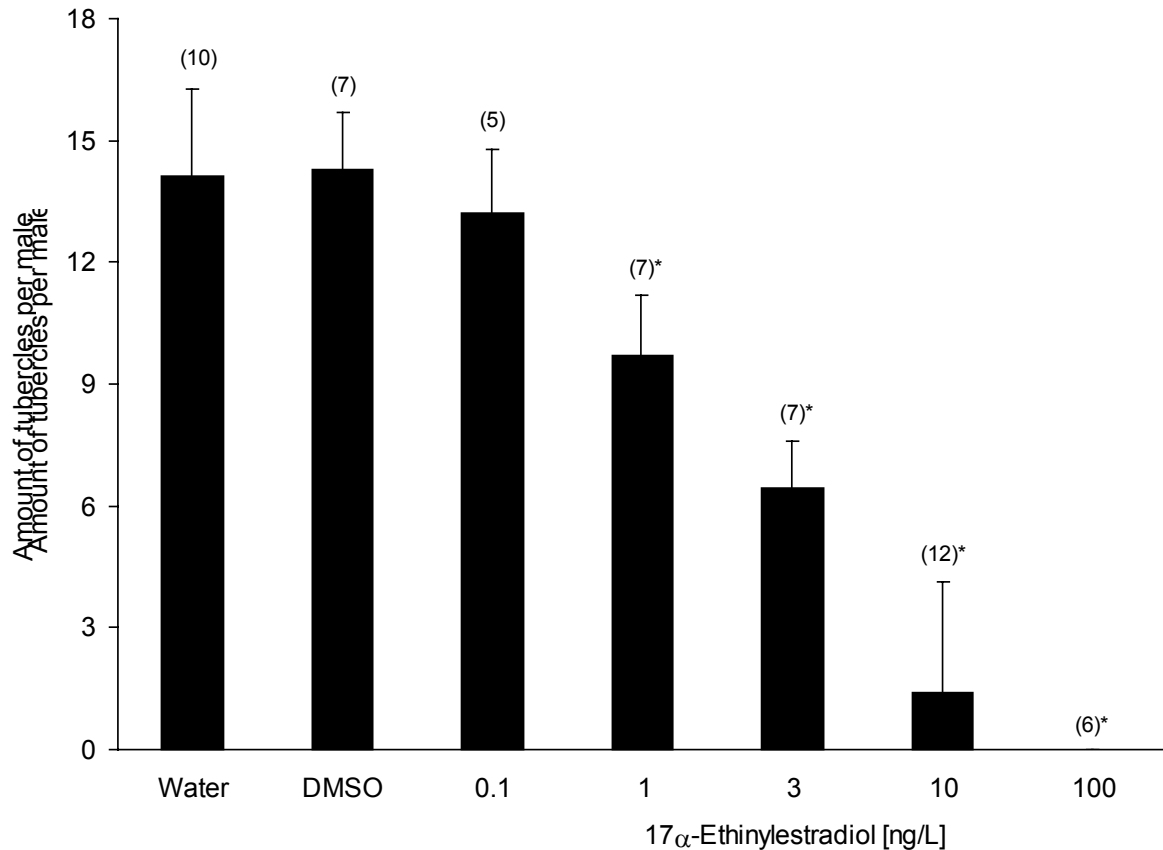


Fig. 3.24. Number of tubercles per male fathead minnow after exposure to 17 α -ethinylestradiol (EE₂) in the gonadal recrudescence assay. At > 1 ng/L EE₂ concentrations, there was a dose-dependent decrease in the number of tubercles ($R^2 = 0.9811$). At 100 ng/L EE₂, there were no tubercles on male fathead minnow heads. Numbers of fish are given in brackets. DMSO – 0.01 % DMSO. * $p < 0.05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunn's post-hoc test).

3.4.4 Plasmavitellogenin

In beiden Geschlechtern führte die Belastung mit EE₂ zu einem dosisabhängigen Anstieg des Plasmavitellogenin-Gehaltes ab ≥ 1 ng/L (Männchen: $R^2 = 0,9596$; Weibchen: $R^2 = 0,9619$, $p < 0,05$; Fig. 3.25). In der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle sowie in den Männchen, welche mit $\geq 0,1$ ng/L EE₂ belastet wurden, lagen die Plasma-VTG-Konzentrationen unter 160 ng/ml. Im Gegensatz hierzu zeigte sich in den Männchen, welche mit > 0,1 ng/L EE₂ belastet wurden ein dosisabhängiger Anstieg des Plasmavitellogenins von 1.155 bei 1 ng/ml auf 77.500 ng/ml bei 100 ng/L EE₂. Die Weibchen der Kontrollgruppen (Wasser, Lösungsmittel) sowie der niedrigsten EE₂-Konzentration wiesen Plasmavitellogenin-Gehalte von etwa 10.000 ng/ml auf. Im Konzentrationsbereich von 1 bis 100 ng/L EE₂ konnte ähnlich wie bei den Männchen ein dosisabhängiger Anstieg von Vitellogenin festgestellt werden, welcher über den normalen Blutwerten lag. Bei einer Belastung von 100 ng/L EE₂ lag die Plasmavitellogenin-Konzentration in den Weibchen bei mehr als 330.000 ng/ml (Fig. 3.25).

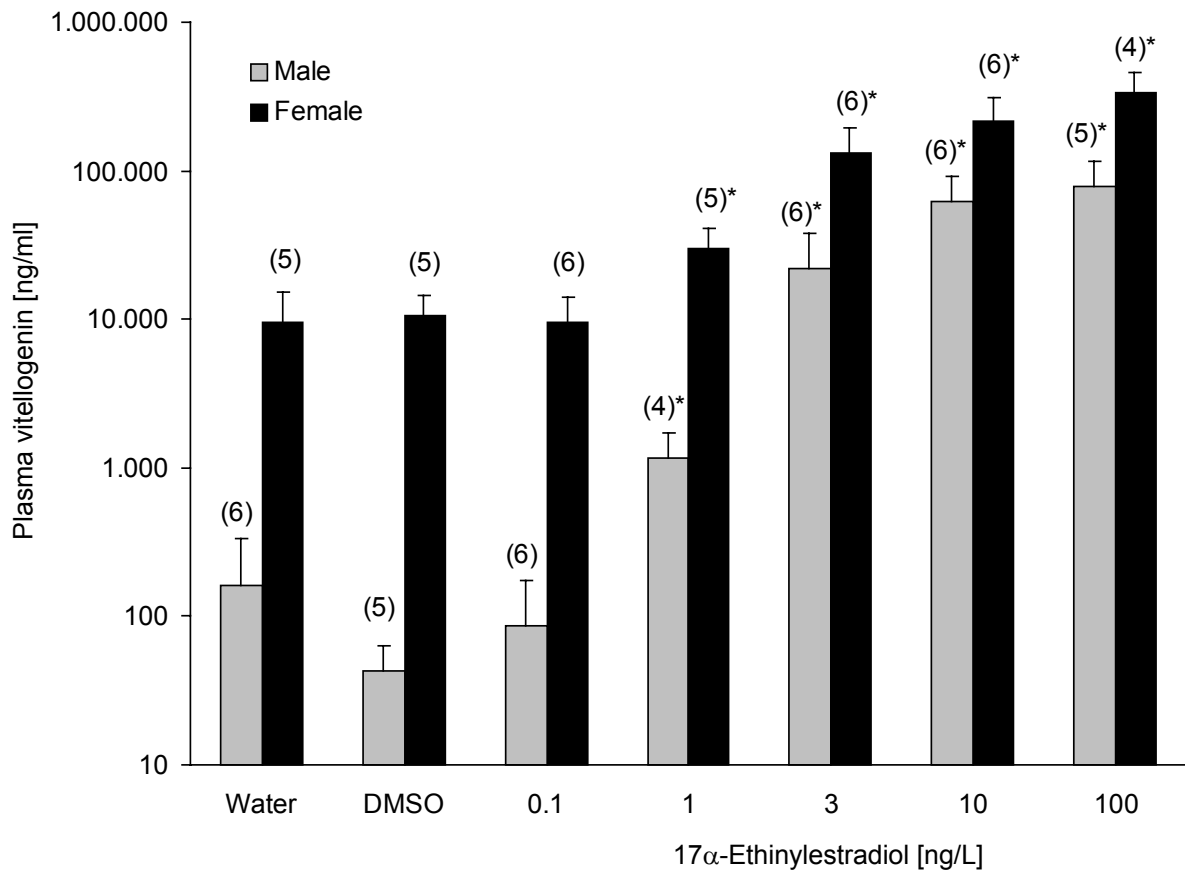


Fig. 3.25. Plasma vitellogenin concentrations in male and female fathead minnow after exposure to 17α-ethinylestradiol (EE₂) in the gonadal recrudescence assay. In both sexes there was a dose-dependent increase in plasma vitellogenin concentration (at EE₂ exposure concentrations ≥ 1 ng/L; males: R² = 0.9596; females: R² = 0.9619). Numbers of fish are given in brackets. DMSO – 0.01 % DMSO. **p* < 0.05 from solvent control (one way ANOVA, Dunn's post-hoc test).

3.4.5 Eiproduktion und Befruchtungsrate

Nach Abschluss der dreiwöchigen Schadstoffexposition mit 0, 0,1, 1, 3 10 und 100 ng/L EE₂ wurden Eiproduktion und Befruchtungsrate in den zuvor belasteten Dickkopfelritzen über weitere drei Wochen hinweg in sogenannten Fortpflanzungsgruppen aus je drei Männchen und Weibchen untersucht. In den höchsten beiden Schadstoffkonzentrationen (10 und 100 ng/L EE₂) wurden drei weitere Paare für Reproduktionsstudien eingesetzt, um die negativen Befunde bezüglich des Reproduktionserfolges zu bekräftigen.

In den Gruppen der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle lag die mittlere Anzahl abgelaichter Eier/Pair unter 150. In den EE₂-Konzentrationen von 0,1 bis 1 ng/L, konnte ein dosisabhängiger Anstieg in der durchschnittlichen Eizahl/Pair festgestellt werden (R² = 0,9271, *p* < 0,05; Fig. 3.26). Bei höheren EE₂-Konzentrationen (> 1 ng/L) zeigte sich jedoch eine Reduktion in der mittleren Eizahl/Pair auf unter 100 bei 10 ng/L bzw. auf 0 bei 100 ng/L EE₂ (R² = 0,9814, *p* < 0,05).

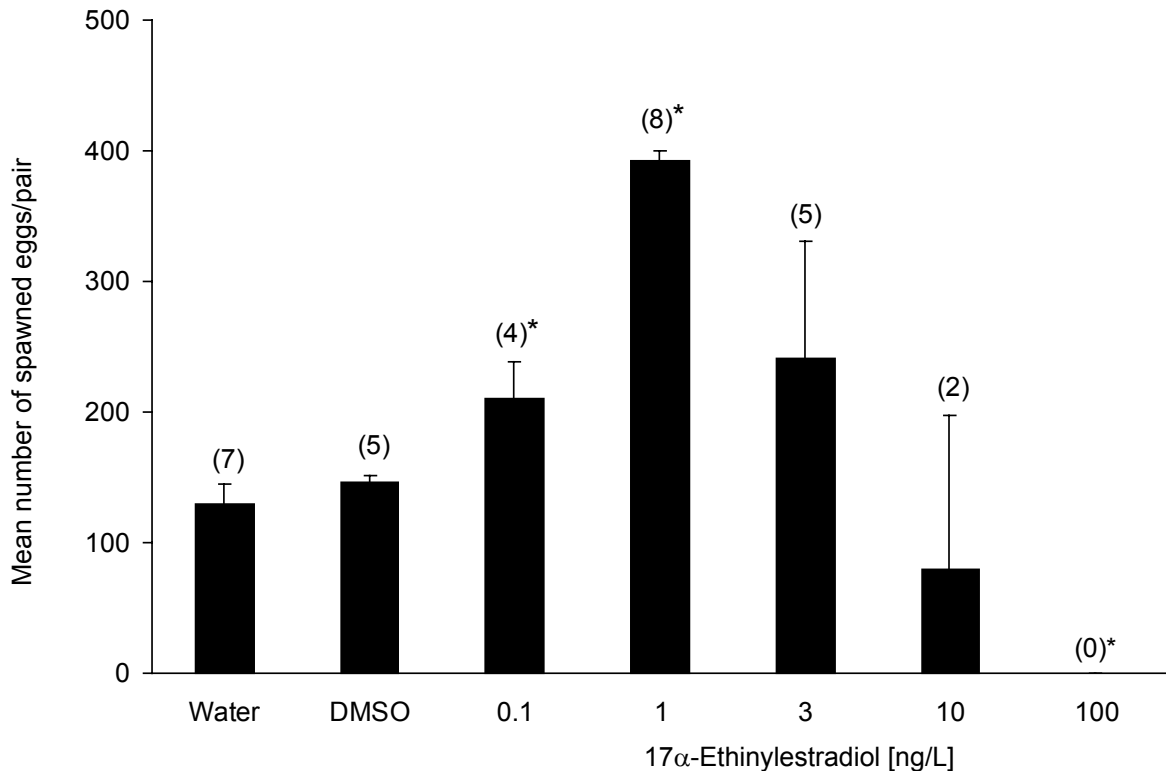


Fig. 3.26. Mean number of spawned eggs/pair in fathead minnow during a three-week period after exposure to 17 α -ethinylestradiol in the gonadal recrudescence assay. At 0.1 and 1 ng/L EE₂, a dose-dependent increase in the mean number of spawned eggs/pair could be observed ($R^2 = 0.9271$), whereas at higher EE₂ concentrations a dose-dependent decrease was apparent ($R^2 = 0.9814$). Numbers of spawning acts are given in brackets. DMSO – 0.01 % DMSO. * $p < 0.05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunn's post-hoc test).

Die Befruchtungsrate variierte in Abhängigkeit von der EE₂-Belastung. In der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle sowie in der 1 ng/L EE₂-Gruppe lag die Befruchtungsrate bei über 90 % (Fig. 3.27). In den Gruppen, welche mit 0,1 und 3 ng/L EE₂ belastet wurden, lag die Befruchtungsrate noch über 84 %. Im Gegensatz hierzu zeigten die Fische, welche mit 10 ng/L EE₂ belastet wurden, eine Befruchtungsrate von etwa 30 %. Bei 100 ng/L EE₂ Belastung konnte in keinem der Fische eine Reproduktion festgestellt werden ($R^2 = 0,9625$, $p < 0,05$; Fig. 3.27).

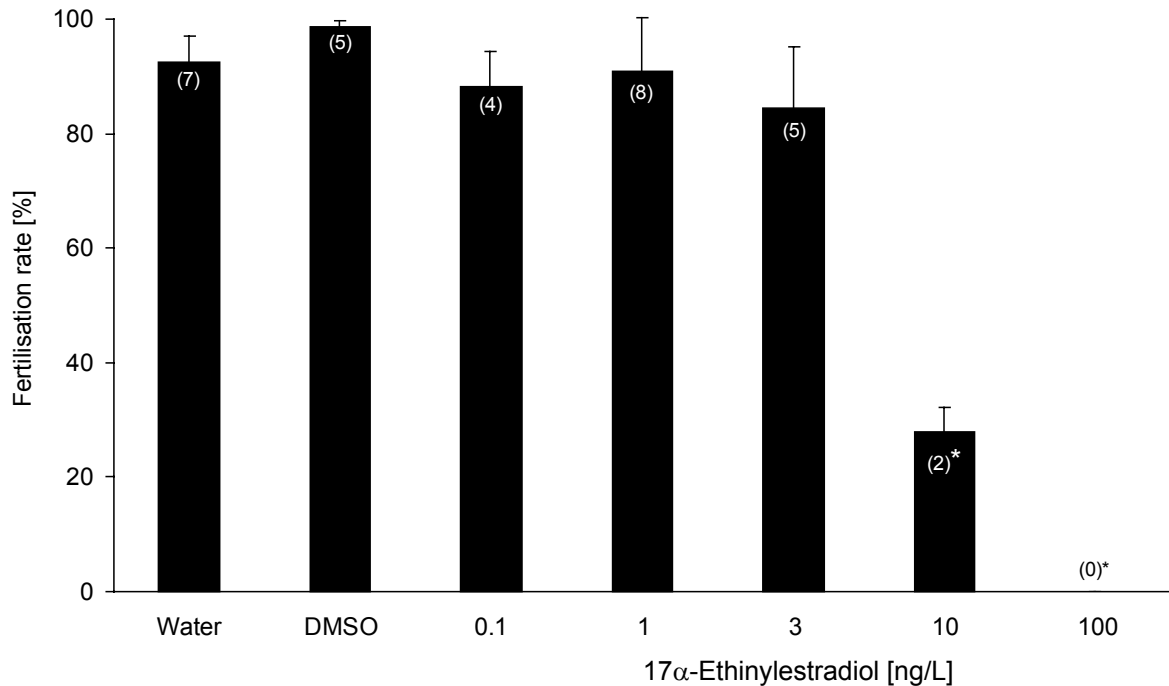


Fig. 3.27. Fertilisation rate of eggs laid by fathead minnow after exposure to 17α-ethinylestradiol (EE₂) in the gonadal recrudescence assay. Fertilisation rate in the controls and in the treatment groups up to EE₂ concentrations of 3 ng/L was between 85 % and 90 %. At exposure concentrations of 10 and 100 ng/L EE₂, fertilisation rate was reduced to 30 % and 0 % ($R^2 = 0.9625$), respectively. Number of spawning acts are given in brackets. DMSO – 0.01 % DMSO. * $p < 0.05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunn's post-hoc test).

3.4.6 Histopathologie der Gonaden

Lichtmikroskopische Untersuchungen der Gonaden

Anhand histologischer Untersuchungen der Ovarien nach dreiwöchiger Belastung mit EE₂ konnten alle Stadien der Oocytenentwicklung (primäre, sekundäre und tertiäre [Graafsche] Follikel) bei allen Schadstoffkonzentrationen festgestellt werden (Fig. 3.28). Bei 0,1 und 1 ng/L EE₂ konnte ein leichter Anstieg in der Anzahl primärer Follikel von $53,6 \pm 7,8$ % in der Lösungsmittelkontrolle auf $69 \pm 5,8$ % in der 1 ng/L EE₂ Belastung festgestellt werden. Bei höheren Konzentrationen zeigte sich hingegen keine dosisabhängige Veränderung in der relativen Häufigkeit der verschiedenen Follikelstadien. Atretische Follikel konnten bei keiner EE₂-Konzentration festgestellt werden. Jedoch konnte in den Ovarien nach Belastung mit 3 und 10 ng/L EE₂ eine dosisabhängige Reduktion in der Menge des parenchymatischen Gewebes festgestellt werden. Bei 100 ng/L konnten diese Bereiche nicht mehr nachgewiesen werden (Figs. 3.29a, b).

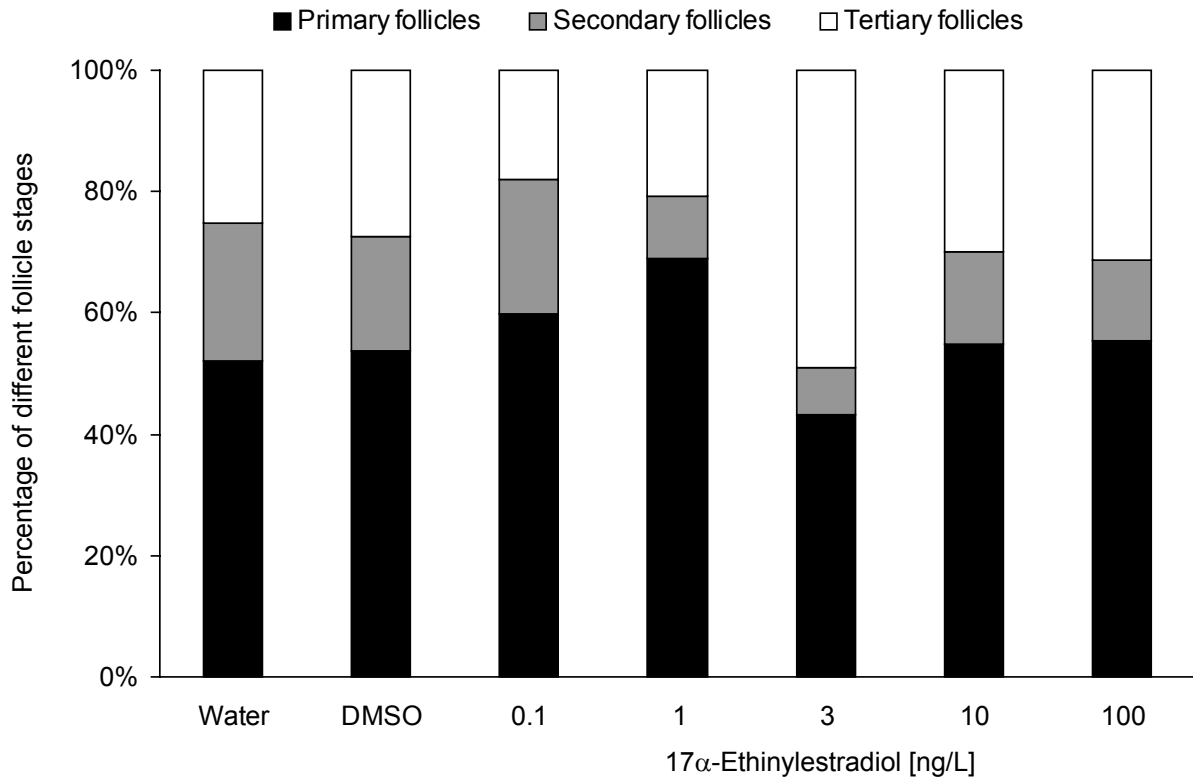
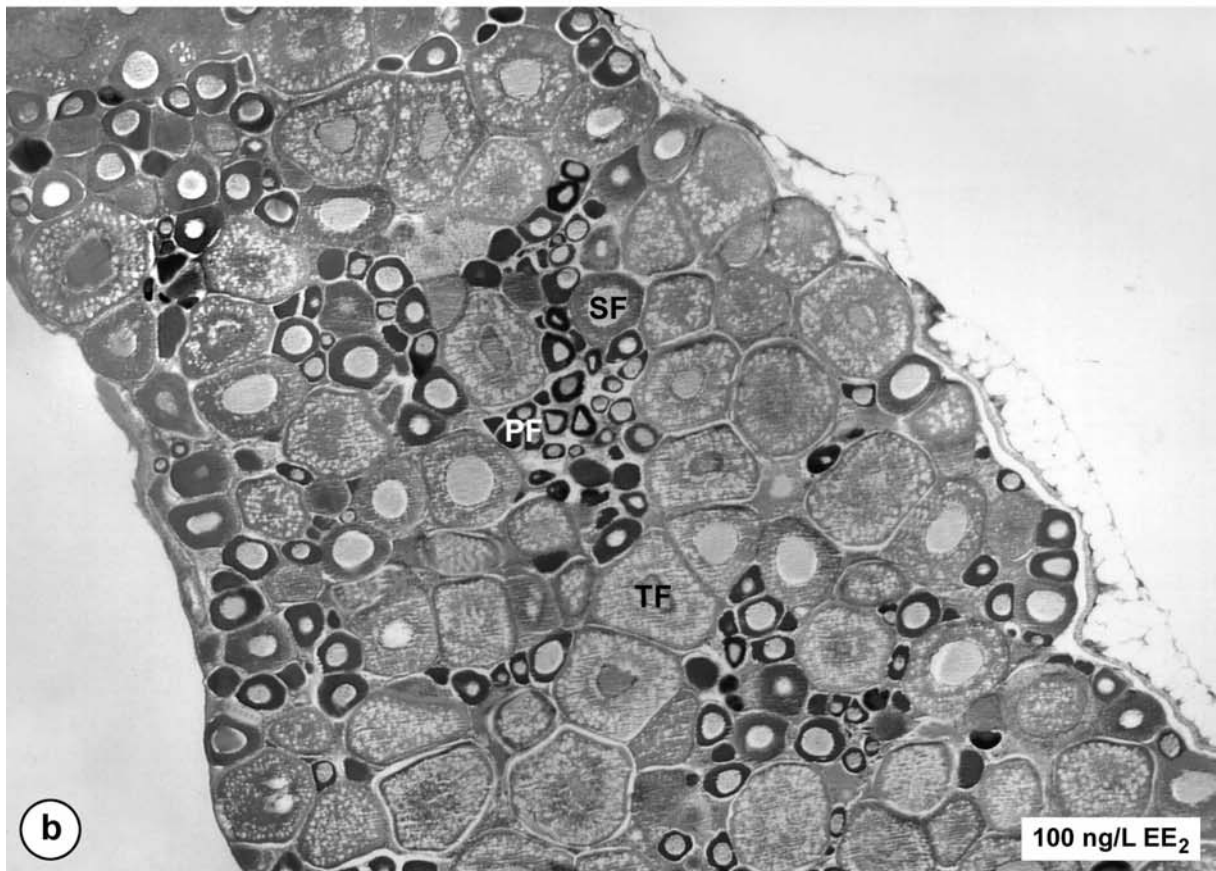
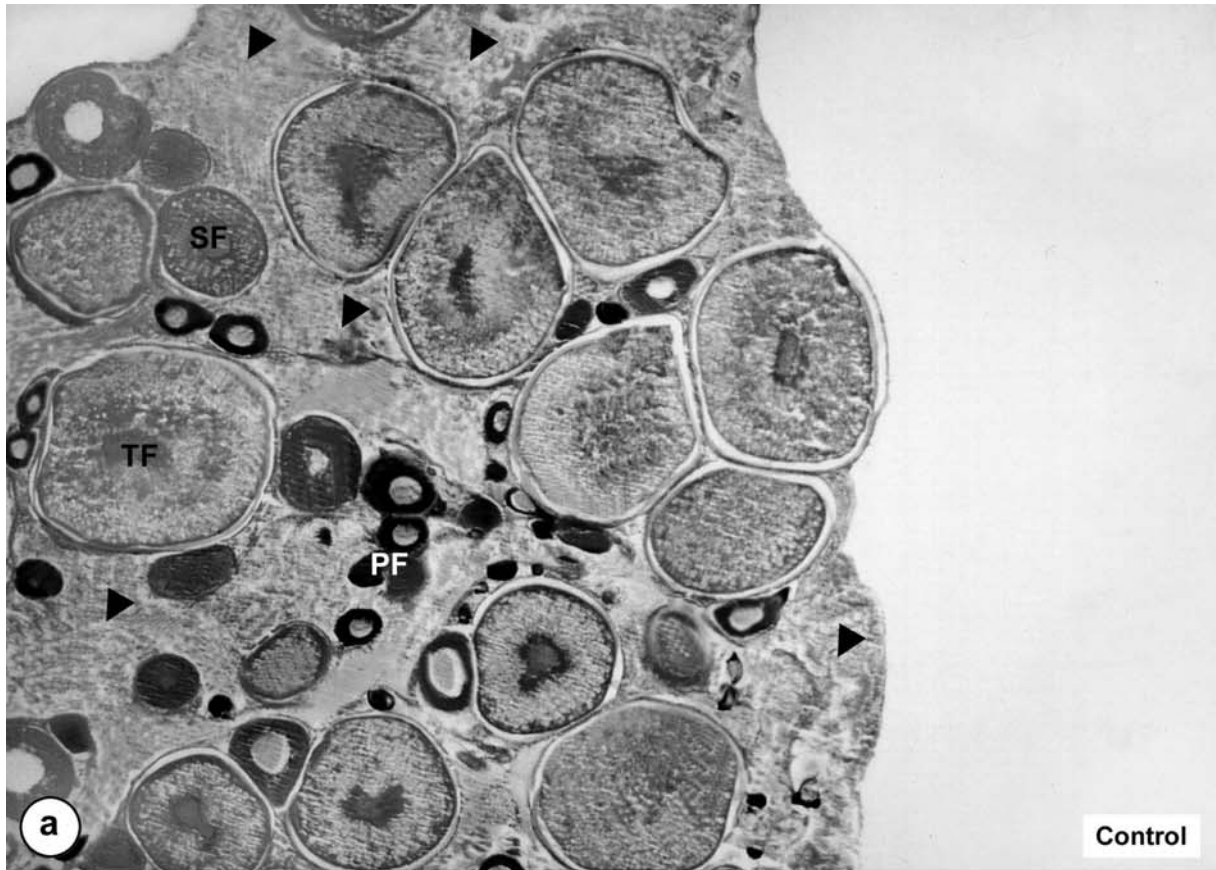


Fig. 3.28. Proportion of developing oocytes at the different classified stages of development in female fathead minnow after exposure to 17 α -ethinylestradiol in the gonadal recrudescence assay. At 0.1 and 1 ng/L EE₂, a slight increase in the abundance of primary follicles could be observed. At higher EE₂ concentrations, however, no dose-dependent change in the relative appearance of different follicle stages was observed. Atretic follicles were not observed. DMSO – 0.01 % DMSO. (one way ANOVA, Dunn's post-hoc test).

Fig. 3.29. Ovaries of female fathead minnow after treatment with 17 α -ethinylestradiol (EE₂) stained with haematoxylin/eosin. Control ovaries (water, solvent) contained various stages of follicular development (PF – primary follicle; TF – tertiary follicle) and large areas of parenchymatic tissues (arrows), x 100 (a). After exposure to 100 ng/L EE₂, ovaries similarly contained oocytes at various stages of development (PF – primary follicle; SF – secondary follicle; TF – tertiary follicle). However, in contrast to controls, parenchymatic areas were not observed, x 40 (b).



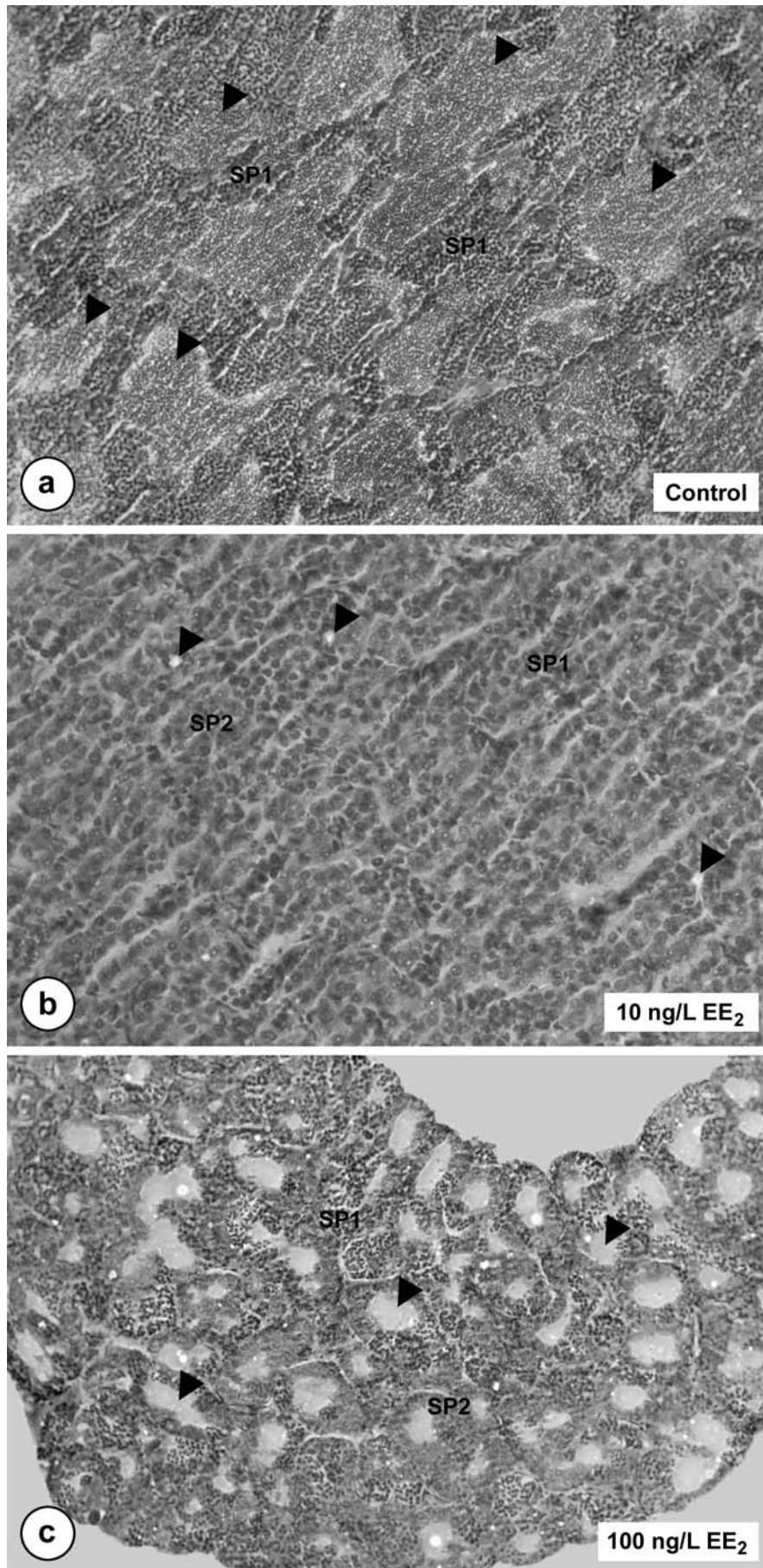


Fig. 3.30. Light microscopy of testes from fathead minnow after a three week exposure to 17α -ethinylestradiol (EE_2) in the gonadal recrudescence assay. In testes of water and solvent controls, seminiferous tubules were filled with fertile sperm, (arrowheads, a). At 10 and 100 ng/L EE_2 , only primary and secondary spermatogonia could be observed, and no more fertile sperm were present in the seminiferous tubules (arrowheads, b and c). SP1 – primary spermatogonia, SP2 – secondary spermatogonia. a: x 200, b: x 400, c: x 400.

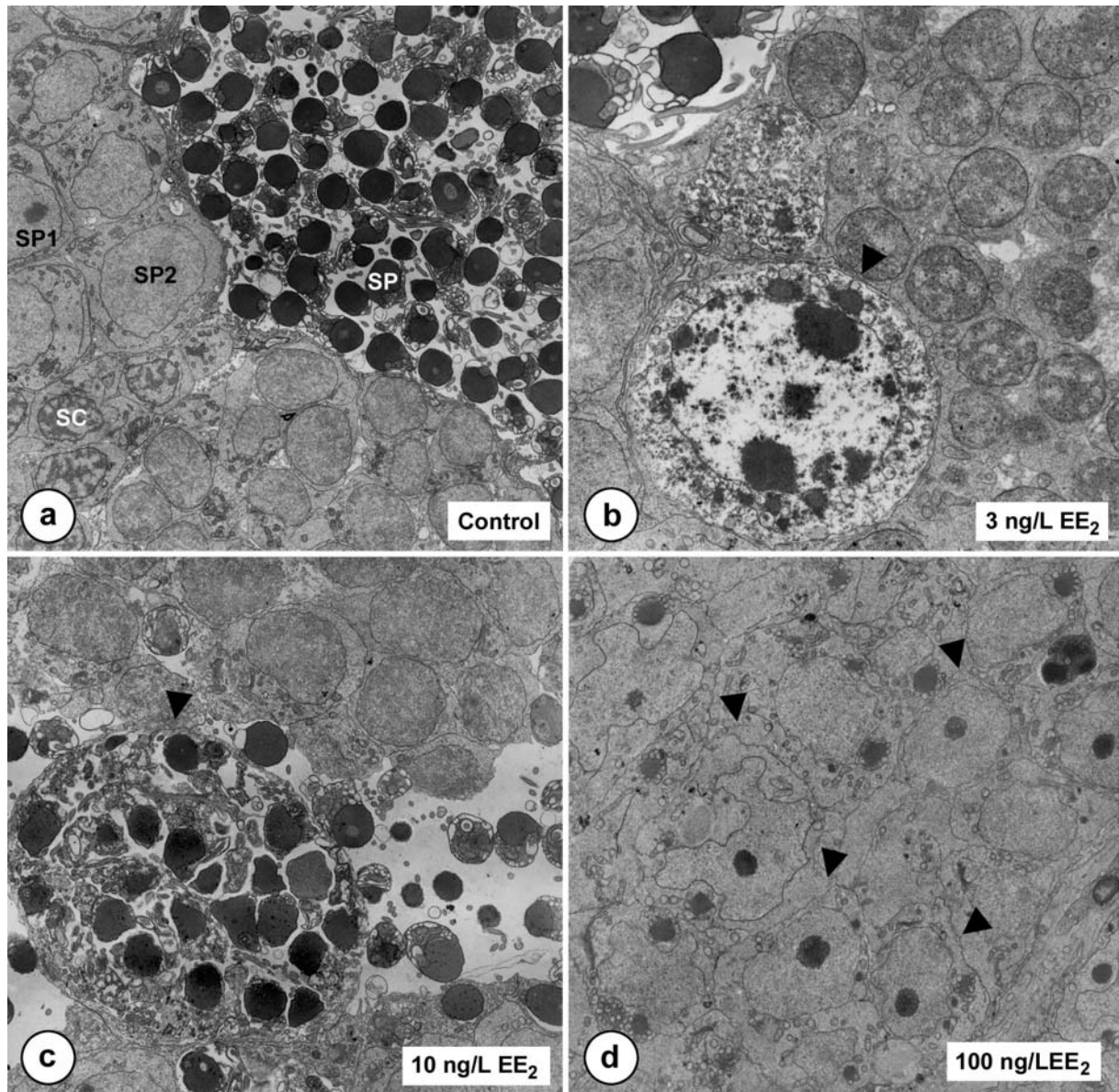
In den Hoden der Kontrollmännchen (Wasser, Lösungsmittel) sowie in den EE₂-Konzentrationen bis 3 ng/L waren die Samenkanälchen dicht mit reifen Spermien gefüllt (Fig. 3.30a). Bei dieser Untersuchungsmethode konnten jedoch keine degenerative Spermien festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu konnten im Lichtmikroskop bei 10 und 100 ng/L EE₂ keine reifen Spermien mehr festgestellt werden (Fig. 3.30a, b). Bei diesen Konzentrationen ließen sich nur noch primäre und sekundäre Spermatogonien nachweisen.

Ultrastrukturelle Untersuchungen der Hoden

Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen der Hoden von Wasser- und Lösungsmittelkontrolle konnte eine aktive Spermatogenese sowie große Mengen an reifen Spermien festgestellt werden (Fig. 3.31a). Weiterhin konnten weder nekrotische oder inkorporierte Spermien in der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle sowie in der niedrigsten EE₂-Konzentration nachgewiesen werden. Während in den lichtmikroskopischen Untersuchungen des Hoden nach Belastung der Fische mit 0,1, 1 und 3 ng/L EE₂ keine strukturellen Veränderungen festgestellt werden konnten, zeigten die elektronenmikroskopischen Untersuchungen vereinzelte nekrotische Spermatogonien in der 1 ng/L EE₂-Gruppe (Fig. 3.31b).

In Männchen, welche mit 10 ng/L EE₂ belastet wurden, konnten nur noch einige wenige Spermien in den Hoden festgestellt werden, wovon die meisten bereits in Sertolizellen inkorporiert waren (Fig. 3.31c). Bei Belastung mit 100 ng/L EE₂ konnten nur noch primäre und sekundäre Spermatogonien in den Hoden nachgewiesen werden (Fig. 3.31d).

Figs 3.31. Ultrastructural changes in testes of male fathead minnow after treatment with 17 α -ethinylestradiol (EE₂) in the gonadal recrudescence assay. In testes of control fish (water, solvent), sperm were present at various stages in development (SP1 – primary spermatogonia; SP2 secondary spermatogonia; SC – spermatocytes) with large amounts of mature sperm (SP) x 2,300 (a). After exposure to only 1 ng/L EE₂, necrotic spermatogonia (arrowheads) could be observed, x 4,300 (b). At 10 ng/L EE₂, few mature sperm were detected, most of which were incorporated into Sertoli cells, x2,700 (c). At the highest EE₂ concentration (100 ng/L EE₂), no mature sperm were apparent, i.e., only spermatogonia (predominantly primary spermatogonia, arrowheads) were visible, x 3,000 (d).



3.4.7 Histopathologische Untersuchungen der Leber

Lichtmikroskopie

In der Leber weiblicher Dickkopflritzen von Wasser- und Lösungsmittelkontrolle sowie nach Belastung mit 0,1 und 1 ng/L EE₂ konnten große Mengen an Glykogenfeldern festgestellt werden (Fig. 3.32a). Bei 3 ng/L EE₂ kam es zu einer Abnahme des Glykogens, und bei 10 ng/L EE₂ konnte im Lichtmikroskop kein Glykogen mehr festgestellt werden (Fig. 3.32b). Hingegen konnten keine Veränderung im Lipidgehalt der Zellen bei allen EE₂-Konzentrationen nachgewiesen werden.

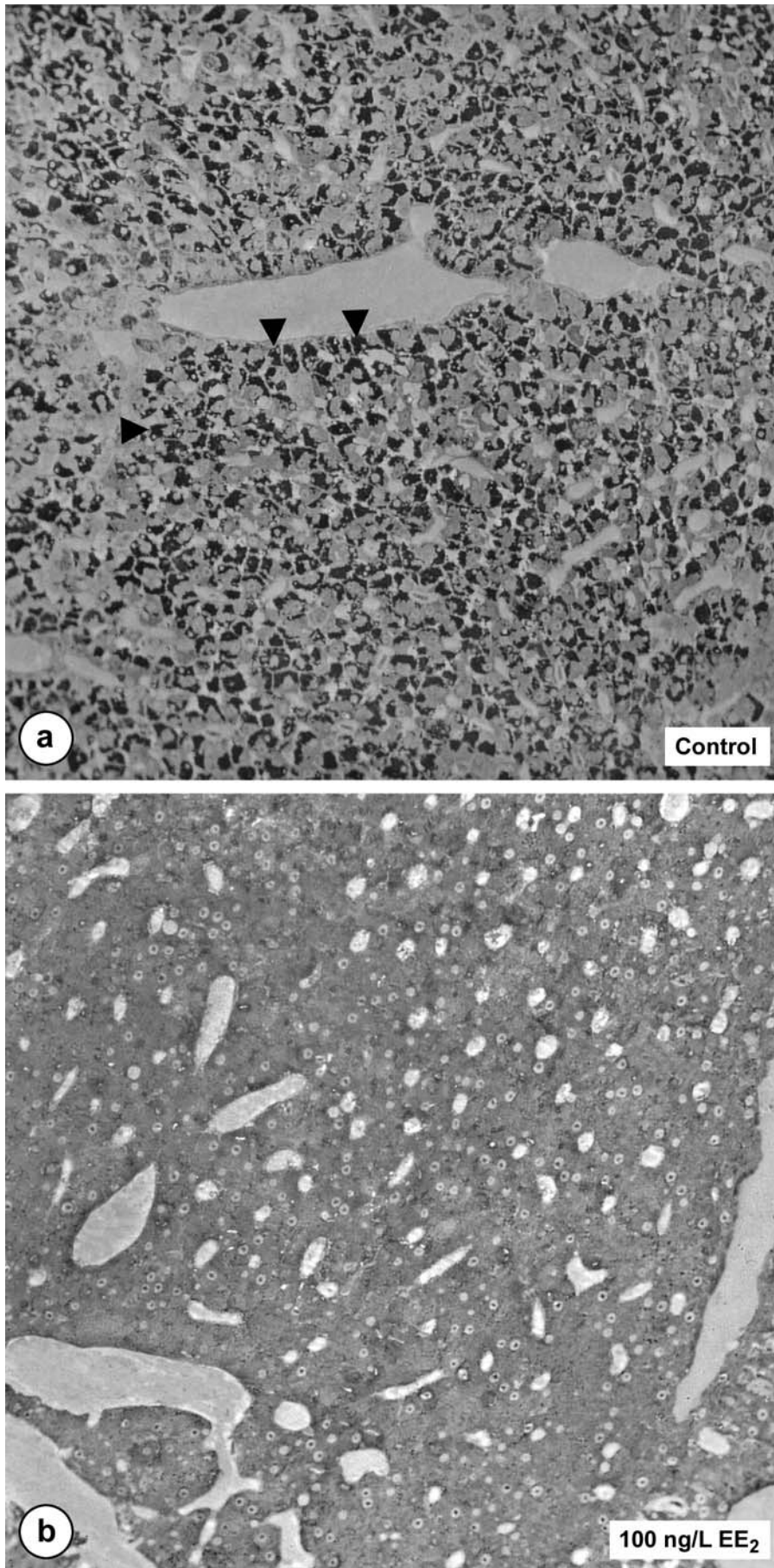


Fig. 3.32. Light microscopy of liver from female fathead minnow after exposure to 17 α -ethinylestradiol (EE₂) in the gonadal recrudescence assay. In the control (water, solvent) large amount of glycogen fields (dark areas, arrowheads) could be observed, x 200 (a). At 100 ng/L EE₂, no more glycogen was detectable, x 200 (b).

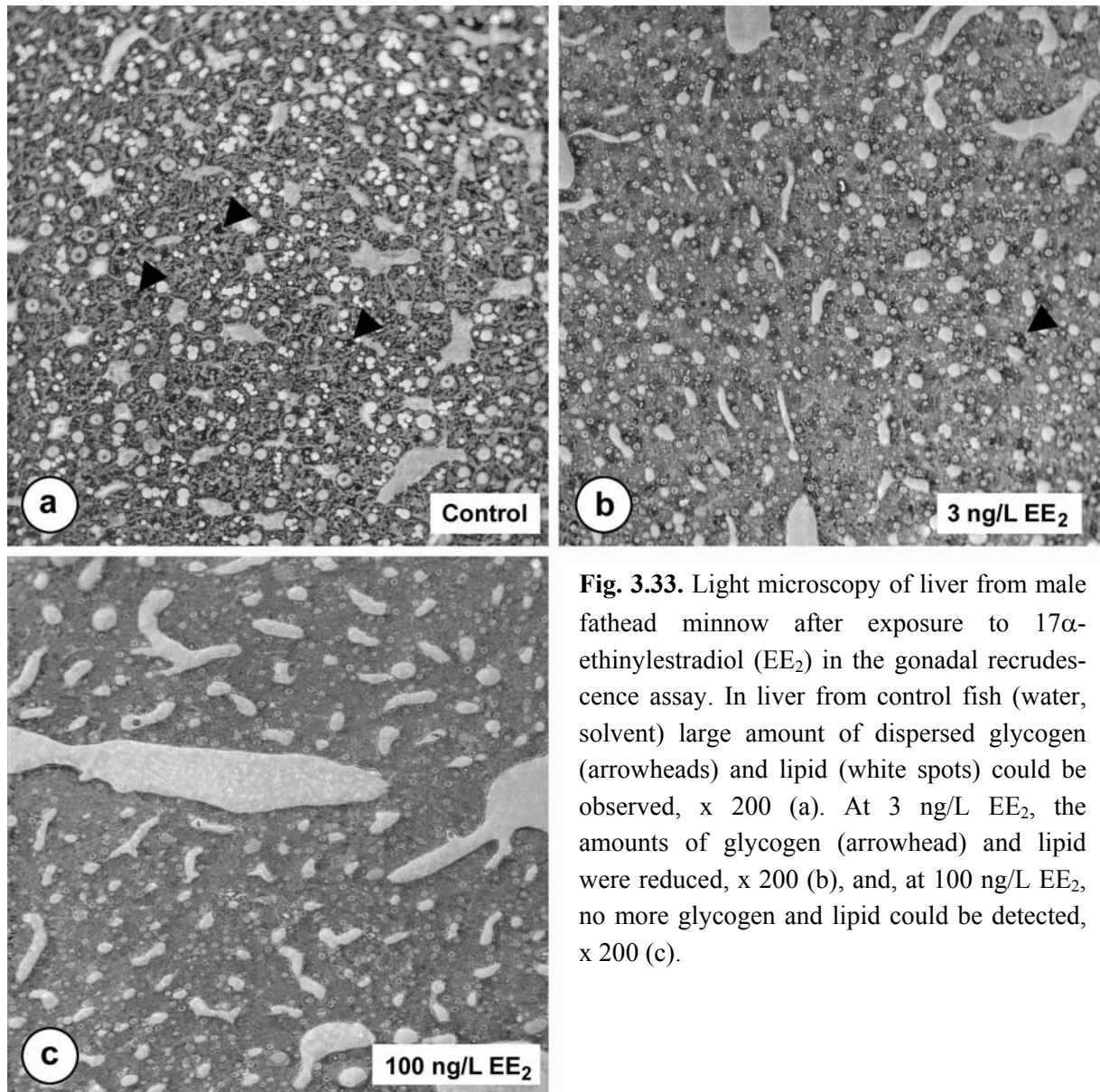


Fig. 3.33. Light microscopy of liver from male fathead minnow after exposure to 17 α -ethinylestradiol (EE₂) in the gonadal recrudescence assay. In liver from control fish (water, solvent) large amount of dispersed glycogen (arrowheads) and lipid (white spots) could be observed, x 200 (a). At 3 ng/L EE₂, the amounts of glycogen (arrowhead) and lipid were reduced, x 200 (b), and, at 100 ng/L EE₂, no more glycogen and lipid could be detected, x 200 (c).

In der Leber männlicher Dickkopfelritzen zeigten sich große Mengen an Glykogen und Lipid in den Wasser- und Lösungsmittelkontrollen sowie nach Belastung mit 0,1 und 1 ng/L EE₂ (Fig. 3.33a). Bei 3 ng/L EE₂ konnte eine Abnahme von Glykogen und Lipid in der Leber männlicher Fische festgestellt werden (Fig. 3.33b), und bei 100 ng/L EE₂ war keine Glykogen und Lipid im Lichtmikroskop mehr nachweisbar (Fig. 3.33c). Es konnten jedoch im Lichtmikroskop keine Veränderungen in der Menge des rauhen endoplasmatischen Retikulums oder sonstige ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber festgestellt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

Table 3.4. Semiquantitative analysis of ultrastructural changes in the liver of female fathead minnow after 3 weeks of exposure to 17 α -ethinylestradiol in the gonadal recrudescence assay

Exposure	17 α -Ethinylestradiol [ng/L]						
	Water	DMSO	0.1	1	3	10	100
Nucleus							
Deformation of nuclear envelope	-	-	-	-	-	-	+
Increase of heterochromatin	±	±	±	±	+	+	+
Deformation of nuclei	-	-	-	-	-	-	-
Mitochondria							
Increased heterogeneity	±	±	±	±	±	±	+
Disintegration of cristae	-	-	-	-	-	-	+
Rough endoplasmatic reticulum							
Overall amount	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Formation of stacks	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Smooth endoplasmatic reticulum							
Overall amount	±	±	±	±	±	+	++
Golgi fields							
Overall amount	±	±	±	±	±	±	+
Lysosomes							
Overall amount	±	±	±	±	±	+	++
Myelinic bodies	±	±	±	±	±	±	+
Peroxisomes							
Overall amount	±	±	±	±	±	±	±
Formation of clusters	-	-	-	-	-	-	-
Lipid							
Overall amount	++	++	++	++	±	±	±
Glycogen							
Overall amount	+++	+++	+++	++	+	+	+
Glycogen fields	++	++	++	++	+	+	+
Macrophages							
	±	±	±	±	±	±	±

-: absent; ±: weakly developed; +: moderately developed; ++: strongly developed; +++: very strongly developed

3. Ergebnisse und Diskussion

Table 3.5. Semiquantitative analysis of ultrastructural changes in the liver of male fathead minnow after 3 weeks of exposure to 17 α -ethinylestradiol in the gonadal recrudescence assay

Exposure	17 α -Ethinylestradiol [ng/L]						
	Water	DMSO	0.1	1	3	10	100
Nucleus							
Deformation of nuclear envelope	-	-	-	-	-	-	-
Increase of heterochromatin	±	±	±	±	+	++	++
Deformation of nuclei	-	-	-	+	+	+	++
Mitochondria							
Increased heterogeneity	±	±	±	+	+	+	+
Disintegration of cristae	-	-	-	+	+	+	++
Rough endoplasmatic reticulum							
Overall amount	+	+	+	++	++	+++	+++
Formation of stacks	+	+	+	++	++	+++	+++
Smooth endoplasmatic reticulum							
Overall amount	±	±	±	±	±	±	±
Golgi fields							
Overall amount	++	++	+	+	+	+	+
Lysosomes							
Overall amount	±	±	±	±	+	++	++
Myelinic bodies	±	±	±	±	+	++	++
Peroxisomes							
Overall amount	±	±	±	±	+	++	++
Formation of clusters	-	-	-	-	-	+	+
Lipid							
Overall amount	++	++	++	+	±	±	±
Glycogen							
Overall amount	++	++	++	++	++	++	+
Glycogen fields	+	+	+	+	+	++	+
Macrophages							
	±	±	±	±	±	±	++

-: absent; ±: weakly developed; +: moderately developed; ++: strongly developed; +++: very strongly developed

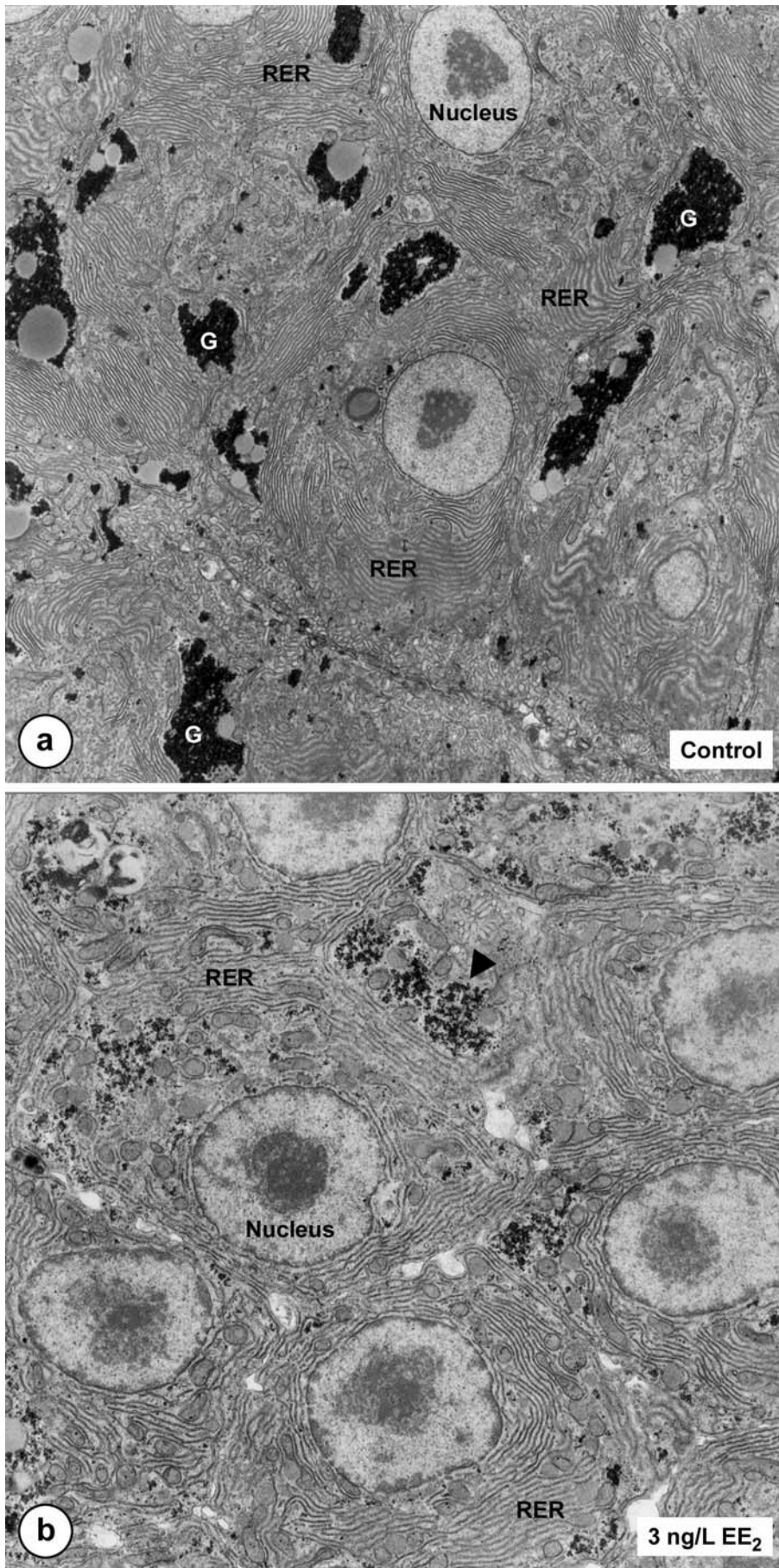


Fig. 3.34. Ultrastructural changes in livers from female fathead minnow after exposure to 17 α -ethinylestradiol (EE₂) in the gonadal recrudescence assay. Livers of female fathead minnow contained large amounts of glycogen fields (G) and RER, x 2,300 (a). After exposure to 3 ng/L EE₂, glycogen fields (arrowhead) and lipid were markedly reduced in female liver cells, x 5,500 (b).

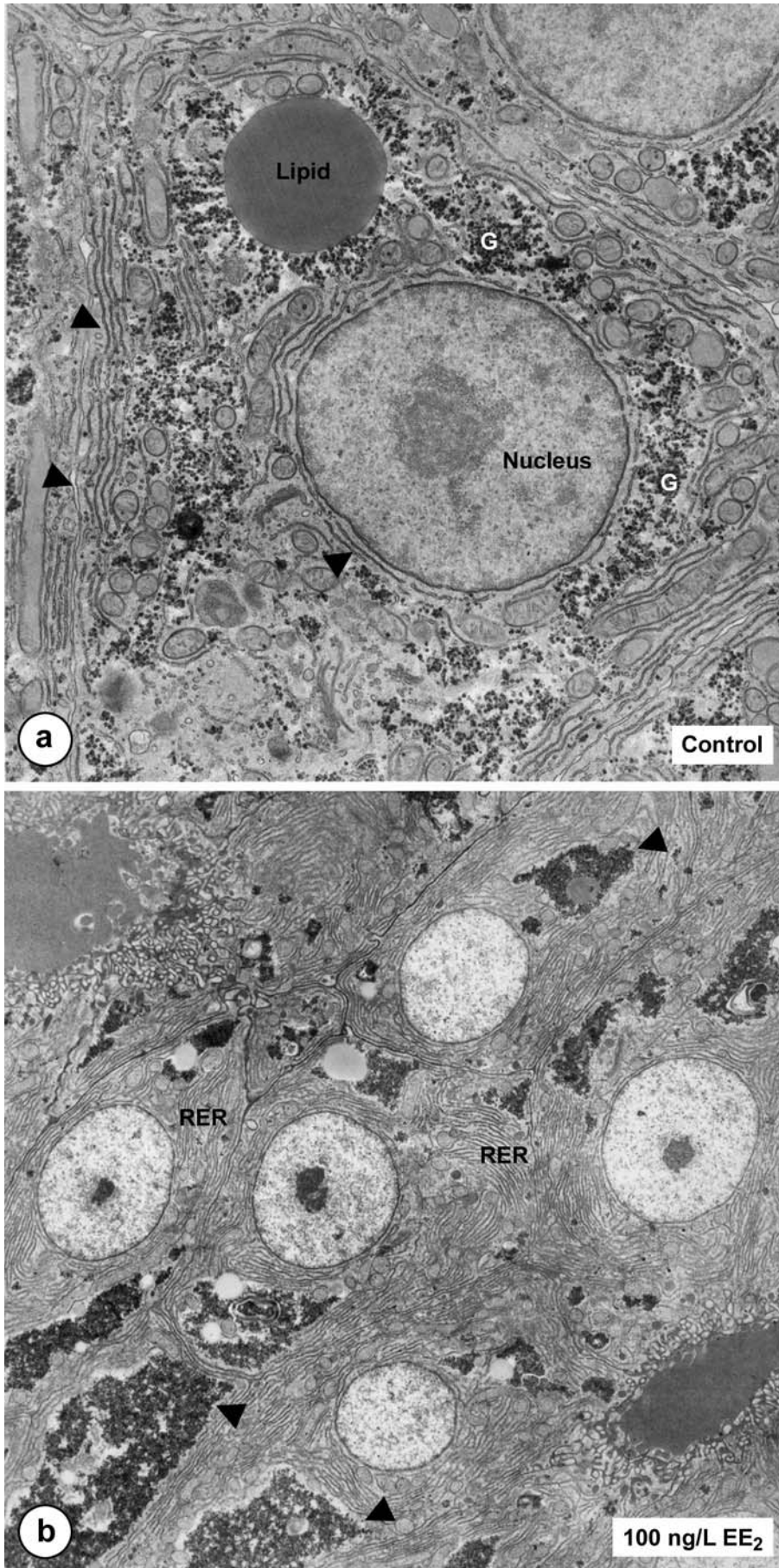


Fig. 3.35. Ultrastructural changes in livers from male fathead minnow after exposure to 17 α -ethinylestradiol (EE₂) in the gonadal recrudescence assay. Livers from solvent control males displayed very low amounts of rough endoplasmic reticulum (RER, arrowheads), but considerable amounts of dispersed glycogen (G) as well as lipid, x 7,000 (a). After exposure to 100 ng/L EE₂, large glycogen fields (arrowheads) and widely distributed areas of RER were seen in male liver cells, x 3,000 (b).

Elektronenmikroskopie

Während der natürlichen Vitellogenese besitzen weibliche Dickkopfeleritzten große Mengen an rauem endoplasmatischem Retikulum, ausgedehnte Areale von Glykogenfeldern und große Lipidreserven (Fig. 3.34a, Table 3.4). Ultrastrukturelle Veränderungen in der weiblichen Leber als Konsequenz der EE₂-Belastung umfassten einen leichten Anstieg des Heterochromatins sowie eine Abnahme im Lipid- und Glykogengehalt der Zellen ein (Nachweisbar ab EE₂-Konzentrationen ≥ 3 ng/L, Fig. 3.34b). Bei 10 ng/L EE₂ war zudem der Gehalt an glattem endoplasmatischem Retikulum erhöht. Im Gegensatz zu der Leber männlicher Dickkopfeleritzten zeigte sich kein Anstieg der Makrophagenzahl in der höchsten EE₂-Belastung. Weiterhin war die Anzahl der Myelinkörper bei höheren EE₂-Konzentrationen erhöht und die Mitochondrien wiesen eine erhöhte Heterogenität sowie eine Auflösung der Cristae auf (Tab. 3.4). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Leber männlicher Dickkopfeleritzten zeigten verschiedene ultrastrukturelle Veränderungen nach Belastung mit ≥ 1 ng/L EE₂ auf (Tab. 3.5). Während die Lebern der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle sowie der niedrigsten EE₂-Belastung sehr geringe Mengen an rauem endoplasmatischem Retikulum (RER) aufwiesen, konnte bei höheren EE₂-Konzentrationen ein dosisabhängiger Anstieg im RER-Gehalt festgestellt werden (Fig. 3.35). Die Veränderungen in den Mitochondrien glichen denen der Weibchen. Bei 100 ng/L EE₂ konnten größere Mengen an Makrophagen zwischen den Leberzellen festgestellt werden.

3.4.8 Diskussion

Die Entwicklung eines empfindlichen und kostengünstigen *In vivo*-Screeningtests mit Fischen zum Nachweis von hormonaktiven Chemikalien, sowohl natürlicher als auch anthropogener Herkunft, ist eine unerlässliche Voraussetzung zur Risikoabschätzung. Mit diesem Hintergrundgedanken wurde das synthetische Östrogen 17 α -Ethinylestradiol (EE₂), welches in Kontrazeptiva weit verbreitet ist, in der gegenwärtigen Studie ausgewählt, um den Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfeleritze zum Nachweis hormoneller Störungen durch Östrogene zu etablieren und bewerten.

Im Bezug auf die untersuchten Endpunkte konnte gezeigt werden, dass der Gonadal Recrudescence Assay sehr empfindlich gegenüber östrogenen Effekten von EE₂ ist. Mit Ausnahme der optionalen Messung der Plasmakonzentrationen der Sexualhormone wurden alle von der EDSTAC vorgeschlagenen Endpunkte in dieser Studie berücksichtigt.

Die empfindlichsten Endpunkte waren die Anzahl der Tuberkel bei den Männchen, Plasma-vitellogenin in beiden Geschlechtern sowie ultrastrukturelle Veränderungen in Leber und Hoden der Männchen (Table 3.6). Die Anzahl der Tuberkel auf den Köpfen männlicher Dickkopfeleritzten war mit der ansteigenden EE₂-Konzentration (≥ 1 ng/L) negativ korreliert. Vergleichbare Ergebnisse zeigten die Studien in Dickkopfeleritzten nach Belastung mit 1 ng/L 17 β -Estradiol (Atrophie der Tuberkel; Miles-Richardson et al. 1999a) sowie mit 100 μ g/L 4-

Nonylphenol (geringer Grad an Tuberkelatrophie, Harries et al. 2000) nach einer Belastungszeit von 14 bzw. 21 Tagen. Die Anzahl der Tuberkel in Männchen ist aufgrund ihrer leichten und schnellen Messbarkeit möglicherweise ein hilfreiches Merkmal, um östrogene Effekte verschiedener potentieller Xenoöstrogene nachzuweisen.

Table 3.6. Lowest observed effective concentrations (LOEC) for the biological endpoints measured in male and female fathead minnow after a three weeks' exposure to 17 α -ethinylestradiol in the gonadal recrudescence assay

Investigated endpoints	LOECs of 17 α -ethinylestradiol [ng/L]	
	Males	Females
Condition factor	100	100
Gonadosomatic index	10	100
Plasma vitellogenin	1	1
Testes (histology)	10	-
Testes (ultrastructure)	1	-
Liver (histology)	3	3
Liver (ultrastructure)	1	3
Amount of tubercles	1	-
Fertilisation rate	10	-
Mean number of spawned eggs/pair	-	0.1

Die durchschnittliche Plasmavitellogenin-Konzentration bei Männchen in der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle, sowie der 0,1 ng/L EE₂-Belastung lag bei etwa 100 ng/ml, während sie in den entsprechenden Belastung der Weibchen bei etwa 10.000 ng/ml lag. In beiden Geschlechtern konnte ein dosisabhängiger Anstieg des Plasma-VTG-Gehaltes nach drei Wochen Belastung mit 1 ng/L EE₂ festgestellt werden (Table 3.4). In der höchsten Belastung (100 ng/L EE₂), lagen der Plasma-VTG-Konzentrationen in den Männchen bei etwa 77.000 ng/ml und bei den Weibchen bei über 330.000 ng/ml. Ergebnisse einer vergleichbaren Studie mit juvenilen Dickkopfelritzen (gemischte Geschlechter) wiesen erhöhte Plasma-VTG-Gehalte nach dreiwöchiger Belastung mit 5 ng/L EE₂ auf (nominelle Konzentration; Panter et al. 2001). Eine dreiwöchige Belastung männlicher Dickkopfelritzen mit 100 ng/L des natürlichen Östrogens 17 β -Estradiol (E₂, Panter et al. 1998) induzierte Plasma-VTG-Konzentrationen, welche mit denen der Männchen vergleichbar waren, die in der vorliegenden Studie mit 100 ng/L EE₂ belastet worden waren. Eine vergleichbare Belastung der Fische mit \leq 32 ng/L E₂ führte jedoch im Vergleich zur Kontrolle zu keinem Anstieg des Plasma-VTG-Gehaltes (Panter et al. 1998). In einem Full Life Cycle mit EE₂ belasteten Dickkopfelritzen konnten erhöhte Plasma-VTG-Gehalte in Männchen ab einer Konzentration von \geq 4 ng/L EE₂ beobachtet werden (Länge et al. 2001). Studien mit dem Japanischen Reiskärpfling sowie mit dem Zebraäbrbling wiesen erhöhte VTG-mRNA-Gehalte ab \geq 85 ng/L bzw. \geq 2,5 ng/L EE₂ nach dreiwöchiger Belastung auf (Islinger et al. 2002a, b).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Leber weiblicher Fische zeigten eine Reduktion der zellulären Energiereserven wie Glykogenfelder und Lipid an, welche mit den erhöhten Plasma-VTG-Konzentrationen korreliert werden konnten. Ähnliche Befunde konnten in Zebraabräblingen nach Belastung mit E₂ festgestellt werden: Der Glykogengehalt war erniedrigt, jedoch war, im Gegensatz zur vorliegenden Studie, der Lipidgehalt erhöht (Peute et al. 1985). Der Abfall im Glykogengehalt der Leber der Zebraabräblinge konnte ebenfalls mit der Vitellogeninsynthese korreliert werden (Peute et al. 1978). In den Lebern der Männchen zeigten sich nach Belastung mit ≥ 1 ng/L EE₂ erhöhte Mengen an rauem endoplasmatischem Retikulum (RER), und auch hier war dies mit den ansteigenden Plasma-VTG-Konzentrationen korreliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass ultrastrukturelle Veränderungen in der Leber ein nützliches Werkzeug zur Erfassung östrogenener Effekte, insbesondere in Männchen, darstellen können.

Ultrastrukturelle Untersuchungen der Hoden zeigten hormonelle Störungen ab 1 ng/L EE₂. Verschiedene Stadien der Degeneration konnte mit Hilfe ultrastruktureller Untersuchungsmethoden auch in Hoden von geschlechtsreifen Dickkopfelritzen festgestellt werden, welche mit 0,5 nM E₂ belastet wurden (Miles-Richardson et al. 1999a). In der gegenwärtigen Studie konnten keine Zwittergonaden (Ovotestes) nachgewiesen werden, wie sie jedoch in verschiedenen Langzeitstudien (ab befruchtetem Eistadium) mit Dickkopfelritzen und Reiskärpfling (Gray 1999, Gray and Metcalfe 1997, Länge et al. 2001, Metcalfe et al. 2001) festgestellt werden konnten. In diesen Studien konnten Zwittergonaden in Dickkopfelritzen nach 305-tägiger Belastung mit 4 ng/L EE₂ (Länge et al. 2001) sowie im Reiskärpfling nach 100-tägiger Belastung mit 0,1 ng/L EE₂ (Metcalfe et al. 2001) bzw. 300-tägiger Belastung mit 100 µg/L Octylphenol (Gray 1999) und 50 µg/L *p*-Nonylphenol (Gray and Metcalfe 1997) gezeigt werden. Das Fehlen von Zwittergonaden in der gegenwärtigen Studie mit Dickkopfelritzen könnte an der relativ kurzen Belastungszeit adulter Dickkopfelritzen im Gonadal Recrudescence Assay begründet sein. Möglicherweise treten Zwittergonaden nur nach Belastung bestimmter Lebensstadien (z.B. Frühentwicklung) auf.

Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit gegenüber EE₂ können die Anzahl der Tuberkel, der Plasma-VTG-Gehalt sowie die Ultrastruktur von Leber und Hoden als Biomarker zum Nachweis östrogenener Effekte in der Dickkopfelritze angesehen werden. Während die Ermittlung der Tuberkelzahl und des Plasma-VTG-Gehaltes einen relativ schnellen Nachweis einer Belastung mit hormonaktiven Substanzen darstellt, können ultrastrukturelle Untersuchungen von Leber und Hoden möglicherweise einen genaueren Einblick in die Mechanismen der hormonellen Fehlstörung von EE₂ (z.B. Blockierung der Spermienproduktion) und anderen möglichen Xenooöstrogenen geben.

Die bisher diskutierten Endpunkte sind somit Biomarker für die Belastung mit EE₂, aber nicht notwendigerweise Anzeichen für nachteilige Effekte bei der Reproduktion. Weitaus mehr relevant für populationsbezogene Effekte von hormonaktiven Substanzen stellen Reproduktionserfolg und Befruchtungsraten der Eier dar. Es scheint, als ob EE₂ (0,1 und 1 ng/L) im Recrudescence Assay zunächst einen stimulierenden Effekt auf das Reproduktionsvermögen der weiblichen Dickkopfelritzen hat. Dies wird zudem durch den leichten Anstieg in der Anzahl der sich entwickelnden Primärfollikel der Ovarien nach 0,1 und 1 ng/L EE₂-Belastung ge-

stützt. Im Gegensatz hierzu, konnte bei höheren EE₂-Konzentrationen ein Abfall in der durchschnittlichen Gelegegröße festgestellt werden. Während bei niedrigeren EE₂-Konzentrationen (0,1 – 1 ng/L) das Abbläuen der Weibchen stimuliert wurde, wurde das Abbläuen ab ≥ 3 ng/L durch EE₂ gehemmt. In einer Full Life Cycle-Studie (305 Tage) mit Dickkopfelritzen konnte ein Abfall der durchschnittlichen Einzahl/Paar ab 0,2 und 1 ng/L EE₂ beobachtet werden (Länge et al. 2001). Im Japanischen Reiskarpfing zeigte sich eine Abnahme im GSI und der abgelegten Eizahl nach zweimonatiger Belastung mit ≥ 10 ng/L EE₂ (Scholz and Gutzeit 2000).

In der vorliegenden Studie konnte eine Abnahme im GSI männlicher Dickkopfelritzen nach Belastung mit 10 ng/L EE₂ in Korrelation mit einer Reduktion der Spermienzahl und der Befruchtungsrate der abgelaichten Eier festgestellt werden. Die Produktion der Spermien sowie die Anzahl der Tuberkel sind androgengesteuerte Prozesse und sind mit Östrogenen wie EE₂ und E₂ negativ korreliert (Jensen et al. 2001, Miles-Richardson et al. 1999a, Smith 1978). Deshalb scheinen diese Endpunkte zum Nachweis östrogenen Effekte geeignet.

Im Bezug auf die VTG-Induktion als eines der am weitesten verbreiteten Biomarker zum Nachweis östrogenen Einflüsse erwies sich der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze mit einem LOEC von 1 ng/L EE₂ nach 21 Tagen Belastung als genau so empfindlich wie ein Full Life Zyklus mit einem LOEC von 4 ng/L EE₂ nach 305 Tagen Belastung (Länge et al. 2001).

In der gegenwärtigen Studie konnte eine Abnahme der Befruchtungsrate ab ≥ 10 ng/L EE₂ beobachtet werden, während in dem Full Life Zyklus alle Männchen nach Belastung mit ≥ 4 ng/L EE₂ äußerlich verweiblicht waren, was zu einer kompletten Hemmung der Fortpflanzung führte (Länge et al. 2001). Aufgrund der relativ kurzen Belastungszeit der Dickkopfelritzen im Gonadal Recrudescence Assay scheint eine Geschlechtsumkehr nicht sehr wahrscheinlich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen die Annahme, dass die Belastung mit umweltrelevanten Konzentrationen von EE₂ mit Maximalwerten von 7 bis 62 ng/L im Kläranlagenabwasser (Belfroid et al. 1999, Desbrow et al. 1998, Körner et al. 1999, Kuch and Ballschmiter 2000, Spengler et al. 2001, Ternes et al. 1999) und bis zu 5 ng/L in Oberflächengewässern Europas (Schweinfurt et al. 1997, Stumpf et al. 1996) zu hormonellen Fehlstörungen im Fisch führen kann (z.B. VTG-Induktion im männlichen Fisch). Weitere negative Effekte von EE₂ auf populationsbezogene Parameter wie die Induktion von Zwittergonaden und ein Ausbleiben der Reproduktion scheinen daher wahrscheinlich.

3.4.9 Ausblick

Im Bezug auf die Biomarker wie Plasma-VTG-Gehalt und Tuberkelzahl bei männlichen Dickkopfelritzen, sowie die mehr populationsrelevanten Parameter wie Ei- und Spermienproduktion scheint der Gonadal Recrudescence Assay geeignet zu sein, um Veränderungen, welche durch Östrogene oder östrogenähnliche Stimulatoren wie EE₂ hervorgerufen werden, in umweltrelevanten Konzentrationen nachzuweisen. Der Gonadal Recrudescence Assay mit der

Dickkopfelritze sollte daher weiter bezüglich seiner potentiellen Anwendung im praktischen Monitoring für andere hormonaktive Substanzen wie schwache und starke Androgene, schwache Östrogene und Aromatase-Inhibitoren sowie in Feldstudien getestet werden. Die vorliegende Studie liefert schließlich einen weiteren Beweis dafür, dass EE₂ ein Problem für die Fische in den Gewässern darstellt.

3.5 Effekte von 17 α -Methyltestosteron im Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*)

Zusammenfassung

Für eine weiterführende Studie zur Anwendbarkeit des Gonadal Recrudescence Assays mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) wurde das synthetische Androgen 17 α -Methyltestosteron (MT) ausgewählt. Geschlechtsreife männliche und weibliche Dickkopfelritzen wurden unter Sommerbedingungen (16:8 h Tag:Nacht-Rhythmus; 25 °C Wassertemperatur) mit verschiedenen Konzentrationen des Androgens (0, 0,1, 1, 5 50 $\mu\text{g/L}$) belastet. Nach dreiwöchiger Belastung wurden Effekte auf Plasmavitellogenin, sekundäre Geschlechtsmerkmale, Gonadenwachstum (gonadosomatischer Index, GSI) und Konditionsfaktor untersucht. Weiterhin wurden lichtmikroskopische Untersuchungen der Gonaden beiderlei Geschlechts durchgeführt. Für Reproduktionsanalysen (Eiproduktion, Befruchtungsrate) wurden die zuvor exponierten Dickkopfelritzen für weitere drei Wochen in reinem Wasser gehalten. Die Belastung mit MT führte in beiden Geschlechtern zu keinen Veränderungen im Konditionsfaktor. Während bei den Männchen keine Effekte auf Tuberkelzahl, GSI und Hodenhistologie festgestellt werden konnten, war jedoch ab 1 $\mu\text{g/L}$ MT ein signifikanter Anstieg im Plasmavitellogenin-Gehalt feststellbar. Bei den Weibchen waren bereits ab 0,1 $\mu\text{g/L}$ MT signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrolltieren nachzuweisen. So konnten hier atretische Follikel ($\geq 0,1$ $\mu\text{g/L}$), das Auftreten von Tuberkeln sowie eine Dunkelfärbung (≥ 1 $\mu\text{g/L}$), abnormales männchentypisches Verhalten (≥ 5 $\mu\text{g/L}$) und ein Rückgang im GSI (≥ 50 $\mu\text{g/L}$) festgestellt werden. Weiterhin konnte bei ≥ 5 $\mu\text{g/L}$ MT ein Rückgang der Befruchtungsrate sowie eine Reduktion in der durchschnittlichen Eizahl/Paar nachgewiesen werden.

Anhand der untersuchten Endpunkte konnte gezeigt werden, dass der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze auch zum Nachweis androgener Effekte geeignet ist. Ferner zeigte sich, dass die Wirkungsgrenze von MT möglicherweise unter 0,1 $\mu\text{g/L}$ liegt, und somit den Wirkungsschwellen der steroiden Östrogenen nahe kommt.

3.5.1 Einleitung

Für eine weiterführende Studie zur Anwendbarkeit des Gonadal Recrudescence Assays mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) wurde das synthetische Androgen 17 α -Methyltestosteron (MT) ausgewählt, um die Auswirkung vermännlichender Hormone auf das Fischtestesystem zu überprüfen.

3.5.2 Konditionsfaktor und Gonadenwachstum

Nach dreiwöchiger Belastung adulter Dickkopfelritzen mit 17α -Methyltestosteron konnte in keinem Geschlecht eine signifikante Veränderung im Konditionsfaktor festgestellt werden (Fig. 3.36).

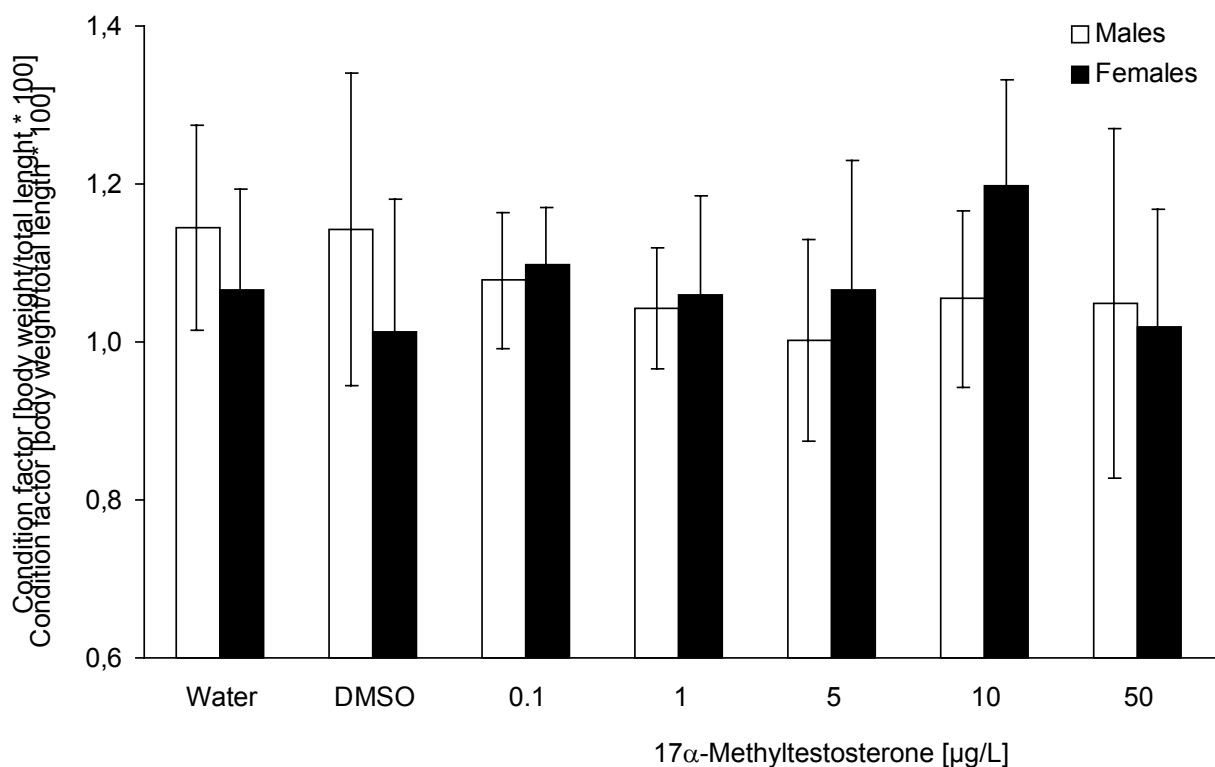


Fig. 3.36. Condition factor (CF) of male and female fathead minnow after exposure to 17α -methyltestosterone (MT) in the gonadal recrudescence assay. No significant decrease in CF could be observed at any toxicant concentration. DMSO – 0.01 % DMSO. $n = 20$ males and females for each toxicant concentration and controls, respectively. (one way ANOVA, Dunnett's post-hoc test).

Während die mit 17α -Methyltestosteron (MT) belasteten Männchen keine Veränderungen im Gonadenwachstum (gonadosomatischer Index, GSI) aufwiesen, konnte bei den Weibchen bereits ab $5 \mu\text{g/L}$ MT ein tendenzielle Abnahme im GSI festgestellt werden (Fig. 3.37; $R^2 = 0,928$). Diese Abnahme war jedoch nur in der höchsten eingesetzten MT-Konzentration signifikant (Abnahme um ca. 30 % bei $50 \mu\text{g/L}$; $p < 0.05$).

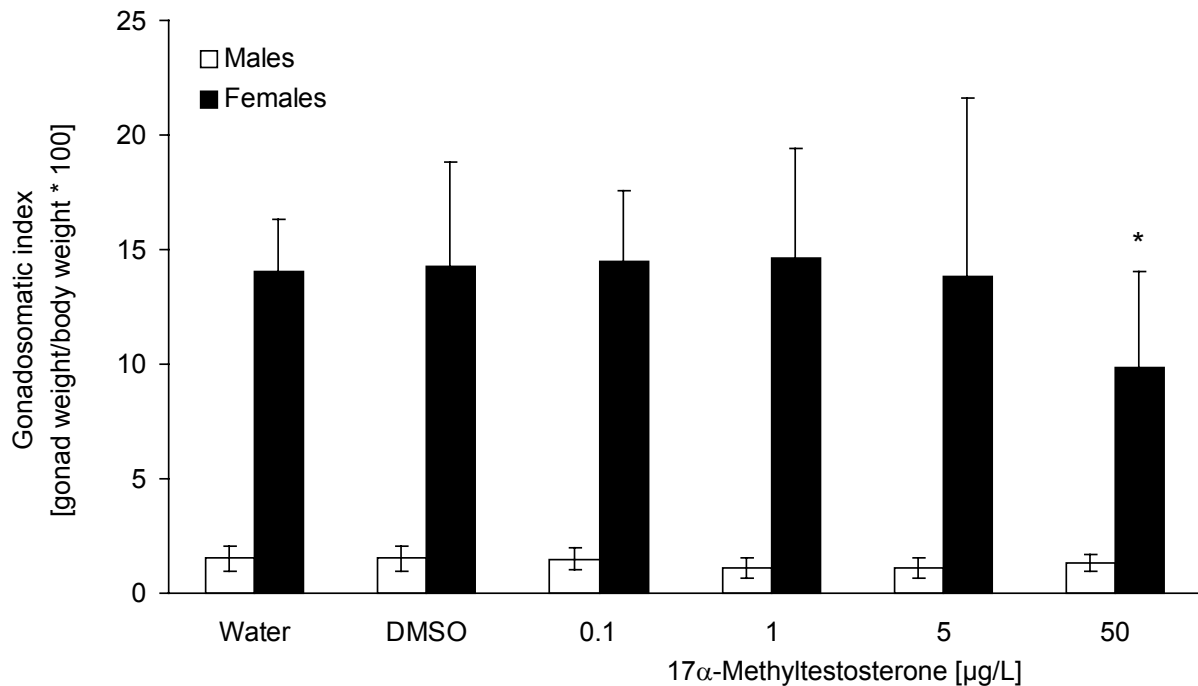


Fig. 3.37. Gonadosomatic index (GSI) of male and female fathead minnow after exposure to 17 α -methyltestosterone (MT) in the gonadal recrudescence assay. No significant decrease in GSI could be observed in males at any toxicant concentration. In females, however, a significant reduction in GSI occurred only at the highest MT concentration of 50 $\mu\text{g/L}$. DMSO – 0.01 % DMSO. $n = 20$ males and females for each toxicant concentration and controls, respectively. * $p < 0.05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunnett’s post-hoc test).

3.5.3 Sekundäre Geschlechtsmerkmale

Bei den mit 17 α -Methyltestosteron belasteten männlichen Dickkopfelritzen konnte keine signifikante Veränderung in der Tuberkelzahl gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden (Fig. 3.38). Die durchschnittliche Tuberkelzahl in den verschiedenen Schadstoffkonzentrationen schwankte zwischen rund 20 (0,1 $\mu\text{g/L}$ MT) und 24 (Wasserkontrolle).

Bei den weiblichen Dickkopfelritzen der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle sowie der niedrigsten MT-Konzentration (0,1 $\mu\text{g/L}$ MT) konnten keine Tuberkel nachgewiesen werden. Die Weibchen der höheren Schadstoffkonzentrationen konnte jedoch eine dosisabhängige Ausbildung von Tuberkeln im Kopfbereich festgestellt werden (logarithmische Regressionsanalyse: $R^2 = 0.9366$; Fig. 3.38, 3.39). Die maximale Anzahl der Tuberkel bei den Weibchen lag nach dreiwöchiger Belastung mit 50 $\mu\text{g/L}$ MT bei rund 11, während sie bei den Männchen gleicher Belastung bei rund 24 lag.

Weiterhin konnte mit zunehmender MT-Konzentration ab 1 $\mu\text{g/L}$ eine deutliche Dunkelfärbung der Weibchen festgestellt werden, wie sie typischerweise bei den Männchen während der Laichzeit auftritt (Fig. 3.39). Eine genaue Quantifizierung der Färbung war jedoch nicht möglich.

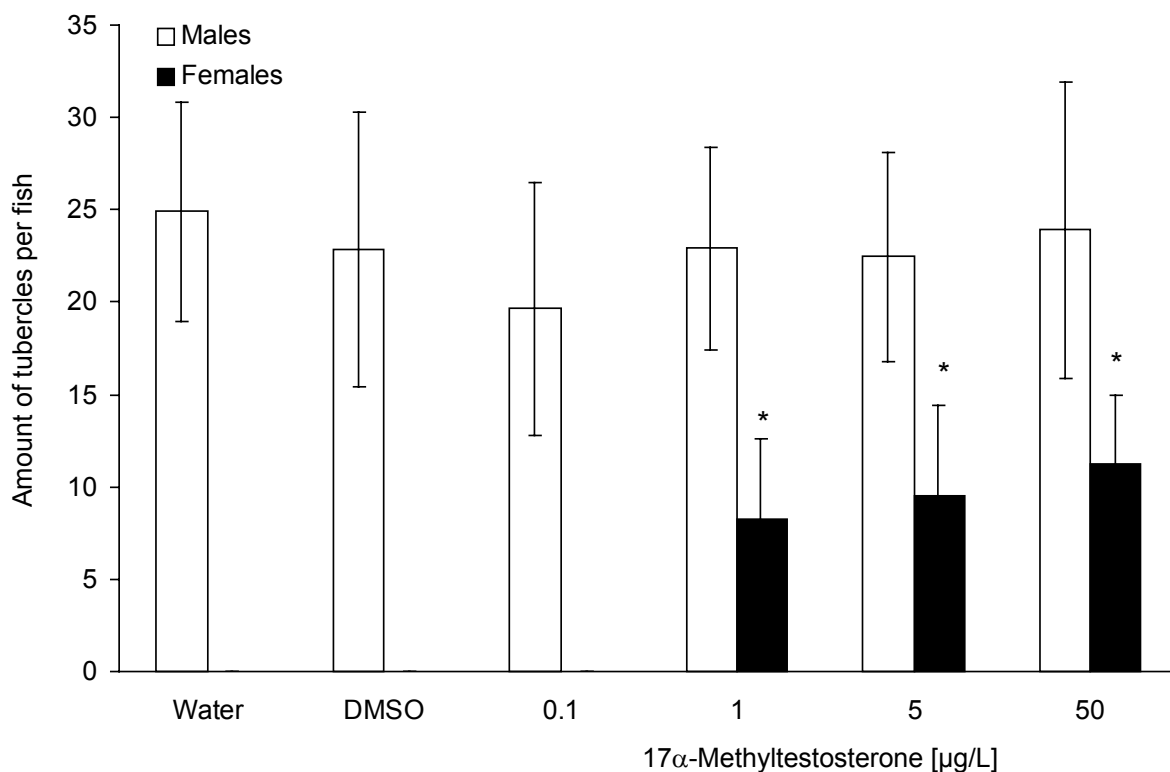


Fig. 3.38. Number of tubercles in fathead minnow after exposure to 17 α -methyltestosterone (MT) in the gonadal recrudescence assay. No significant change in the amount of tubercles on male heads could be observed at any MT concentration. In females, from the controls (water, DMSO) and the lowest MT concentration, no tubercles were apparent. At MT concentrations from 1 to 50 $\mu\text{g/L}$ MT, however, a dose-dependent increase in the number of tubercles could be observed (logarithmic regression analysis; $R^2 = 0.9094$). DMSO – 0.01 % DMSO. $n = 20$ males and females for each toxicant concentration and controls, respectively. * $p < 0.05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunnett's post-hoc test).

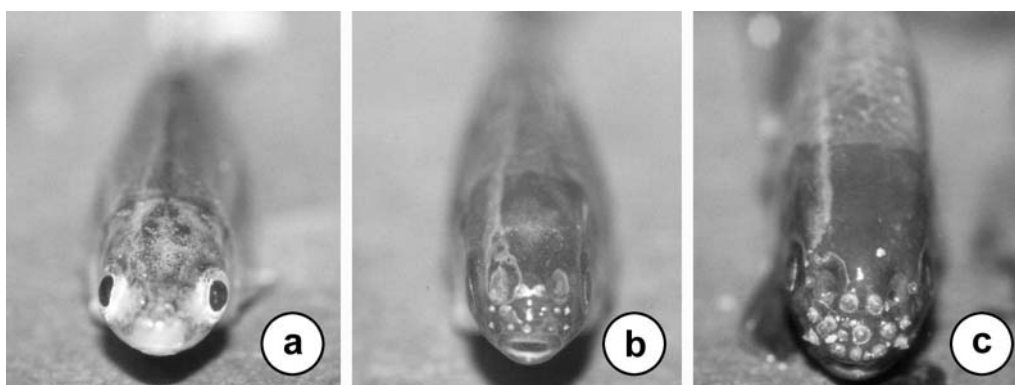


Fig. 3.39. Secondary sex characteristics on fathead minnow head after a three week exposure to 17 α -methyltestosterone (MT) in the gonadal recrudescence assay. Adult female of the control groups and the lowest MT-exposure (0.1 $\mu\text{g/L}$) displayed no tubercle and are brightly coloured (a). In contrast, females exposed to MT concentrations of 1 $\mu\text{g/L}$ revealed a dose-dependent appearance in male specific tubercles and dark colour (b, female from 50 $\mu\text{g/L}$ MT exposure group), similar to those observed in males from all treatment groups (c, control male).

3.5.4 Plasmavitellogenin

Während bei der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle männlicher Dickkopfelritzen die Plasmavitellogenin(VTG)-Konzentrationen unter 56 ng/ml lagen, konnte bereits ab 0,1 µg/L MT-Belastung ein leichter Anstieg auf rund 133 ng VTG/ml Plasma festgestellt werden. Dieser Anstieg war jedoch erst ab 1 µg/L MT Belastung signifikant und zeigte eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung ($R^2 = 0,9409$; $p < 0,05$; Fig. 3.40). Die maximalen Plasma-VTG-Konzentrationen lagen hier bei 5 und 50 µg/L MT-Belastung mit rund 534.000 bzw. 506.000 ng/ml. Bei den Weibchen konnten mit Ausnahme der höchsten MT-Konzentration (50 µg/L) keine signifikanten Veränderungen im Plasma-VTG-Gehalt festgestellt werden. Lediglich bei 50 µg/L MT zeigte sich ein leichter, jedoch signifikanter Anstieg gegenüber der Wasser- und Lösungsmittelkontrolle von rund 56.000 (DMSO) auf rund 133.400 ng VTG/ml ($p < 0,05$; Fig. 3.40).

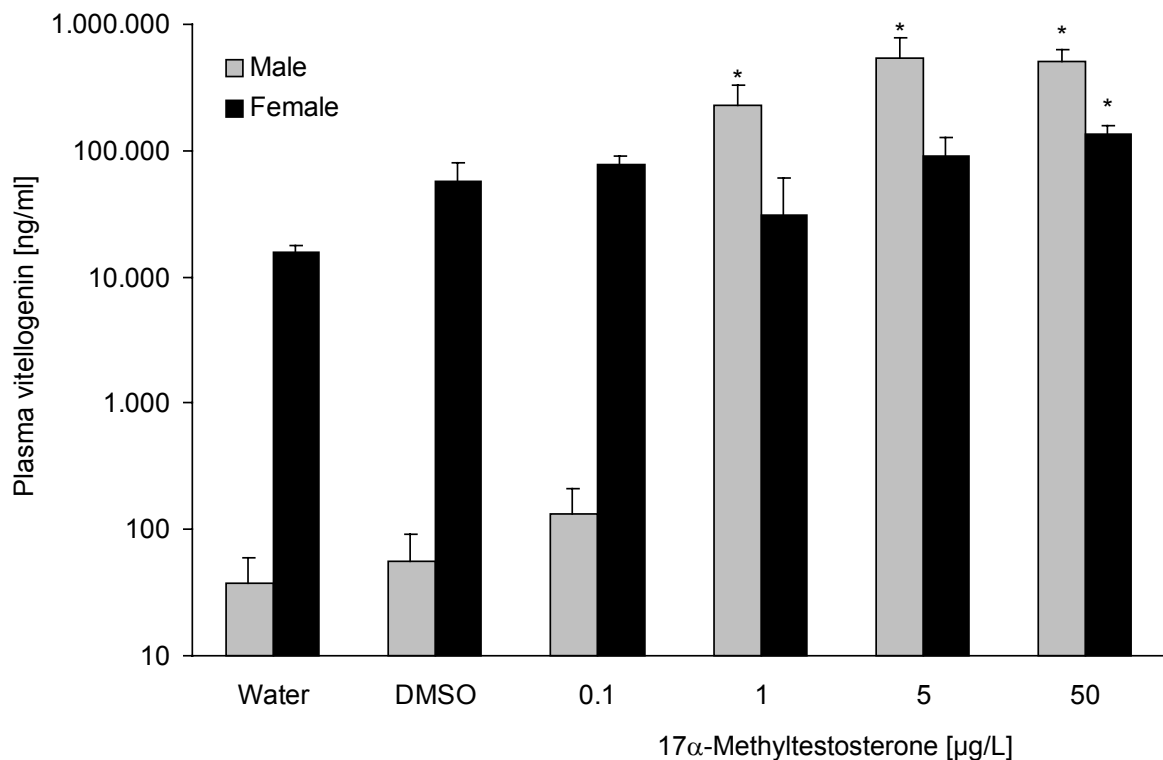


Fig. 3.40. Plasma vitellogenin concentrations in male and female fathead minnow after exposure to 17α-methyltestosterone (MT) in the gonadal recrudescence assay. In males, a statistical significant dose-dependent increase in plasma vitellogenin concentration could be observed after exposure to MT concentrations from ≥ 1 up to 50 µg/L ($R^2 = 0.9409$). In females, no significant change in plasma vitellogenin was apparent up to 5 µg/L MT. At 50 µg/L, however, a statistical significant increase in mean plasma vitellogenin concentration could be detected. DMSO – 0.01 % DMSO. $n = 6$ males and females for each toxicant concentration and controls, respectively. * $p < 0.05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunnett's post-hoc test).

3.5.5 Eiproduktion und Befruchtungsrate

Im Anschluss an die dreiwöchige Belastungsphase der adulten Dickkopfelritzen mit 17α -Methyltestosteron (MT) wurden pro Konzentration jeweils 4 Paar für eine dreiwöchige Reproduktionsphase herangezogen. Hierbei wurden Eiproduktion und Befruchtungsrate nach der Belastung mit MT untersucht. In den Kontrollen (Wasser, DMSO) sowie nach Belastung mit 0,1 und 1 $\mu\text{g/L}$ MT lag die durchschnittliche Eizahl/Pair bei ≥ 100 (Fig. 3.41). Die Anzahl der Gelege schwankte von 9 in der Wasserkontrolle bis hin zu 3 in der Lösungsmittelkontrolle ebenso wie in der 0,1 $\mu\text{g/L}$ MT-Belastung. Bei 5 $\mu\text{g/L}$ MT konnten nur noch zwei Gelege beobachtet werden, wobei die durchschnittliche Eizahl/Pair auf rund 43 abfiel ($p < 0,05$, $R^2 = 0,9964$). Bei 50 $\mu\text{g/L}$ MT konnte keine Eiablage mehr festgestellt werden. Aufgrund der Bildung von Paarungsgruppen sowie aufgrund der ausreichend vorhandenen Abblanchmöglichkeiten in Form halbierter Tonschalen bildete sich bei den Weibchen ab einer MT-Konzentration von 5 $\mu\text{g/L}$ ein deutliches Territorialverhalten im Bereich des Laichsubstrates heraus. Hingegen konnte bei den Männchen keine Veränderung im Balzverhalten festgestellt werden.

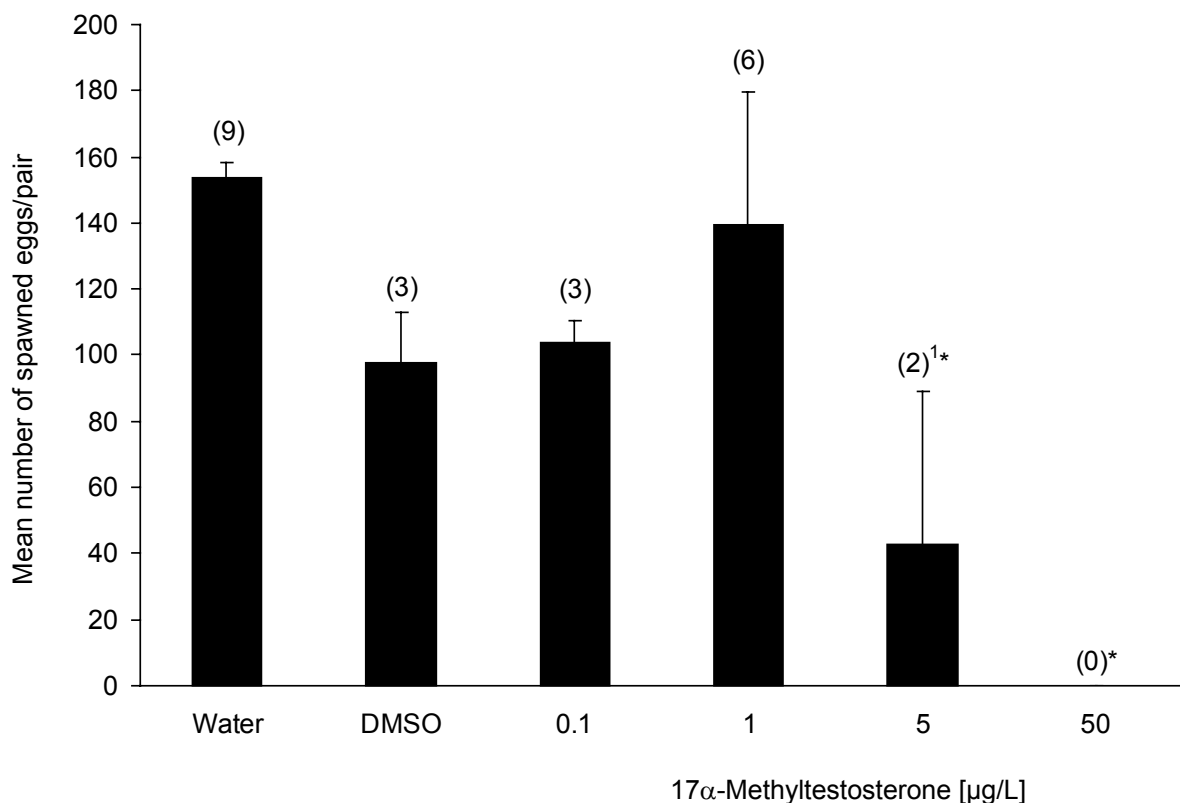


Fig. 3.41. Mean number of spawned eggs/pair in fathead minnow during a three-week period after exposure to 17α -methyltestosterone (MT) in the gonadal recrudescence assay. Up to a MT concentration of 1 $\mu\text{g/L}$, no significant changes in the mean number of spawned eggs/pair could be observed, if compared to the controls (water, DMSO). At MT concentrations of 5 $\mu\text{g/L}$, a dose dependent decrease in the mean number of spawned eggs/pair was apparent ($R^2 = 0,9964$). Numbers of spawning acts in brackets. DMSO – 0.01 % DMSO. * $p < 0,05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunn's post-hoc test).

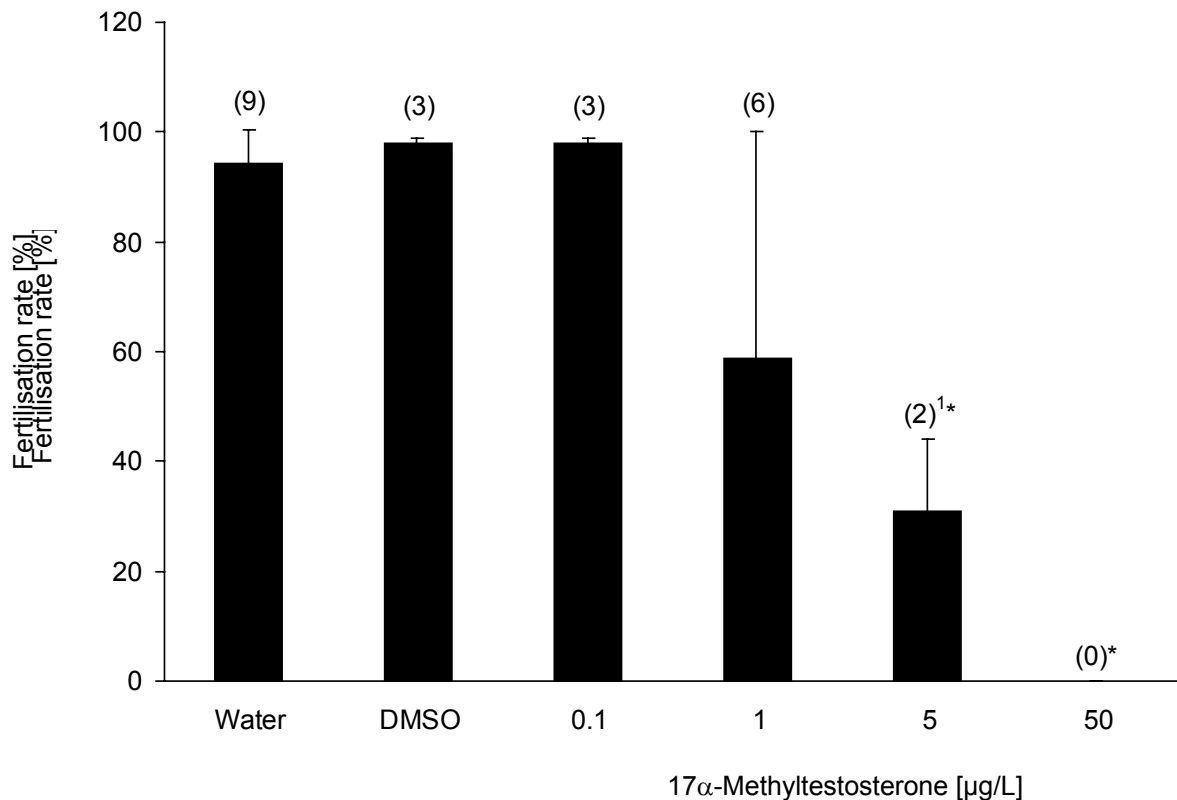


Fig. 3.42. Fertilisation rate of eggs laid by fathead minnow after exposure to 17 α -methyltestosterone (MT) in the gonadal recrudescence assay. Fertilisation rate in the controls and in the treatment groups up to MT concentrations of 0.1 $\mu\text{g/L}$ was between 94 % and 95 %. At exposure concentrations of 1 $\mu\text{g/L}$, a slight decrease in the fertilisation rate was apparent; however, this was not significant at this level. At 5 and 50 $\mu\text{g/L}$ MT, fertilisation rate was reduced significantly to 31 % and 0 % ($R^2 = 0.9964$), respectively. Numbers of spawning acts are given in brackets. DMSO – 0.05 % DMSO. * $p < 0.05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunn's post hoc test).

Die Befruchtungsrate lag in den Kontrollen (Wasser, DMSO) sowie in der niedrigsten MT-Konzentration bei über 94 % (Fig. 3.42). Ab 1 $\mu\text{g/L}$ MT konnte eine dosisabhängige Abnahme in der Befruchtungsrate auf von 59 auf 0 % (bei 50 $\mu\text{g/L}$) nachgewiesen werden ($R^2 = 0,9964$). Statistisch signifikant war jedoch lediglich der Abfall ab 5 $\mu\text{g/L}$ MT ($p < 0,05$).

3.5.6 Histopathologie der Gonaden

Histologische Untersuchungen der Ovarien belasteter Dickkopfelritzen wiesen alle Stadien der Oocytenentwicklung (primäre, sekundäre und tertiäre [Graafsche] Follikel) auf (Fig. 3.43). Hierbei konnten keine signifikanten Veränderungen im prozentualen Verhältnis von primären, sekundären und tertiären Follikeln der verschiedenen 17 α -Methyltestosteron-Konzentrationen gegenüber den Kontrollen (Wasser, DMSO) festgestellt werden (Tab. 3.7). Ebenso lag keine Veränderung im Anteil des parenchymatischen Gewebes vor. Jedoch konnte bereits ab $\geq 0,1$ $\mu\text{g/L}$ MT ein dosisabhängiges Auftreten an atretischen Follikel (von 5 % bei

0,1 auf 11,4 % bei 50 µg/L MT) in den Ovarien von vier der fünf untersuchten Weibchen nachgewiesen werden ($R^2 = 0,8929$; Tab. 3.6; Fig. 3.43, 3.44). Bei höheren MT-Konzentrationen konnten in allen untersuchten Ovarien atretische Follikel festgestellt werden (Tab. 3.7).

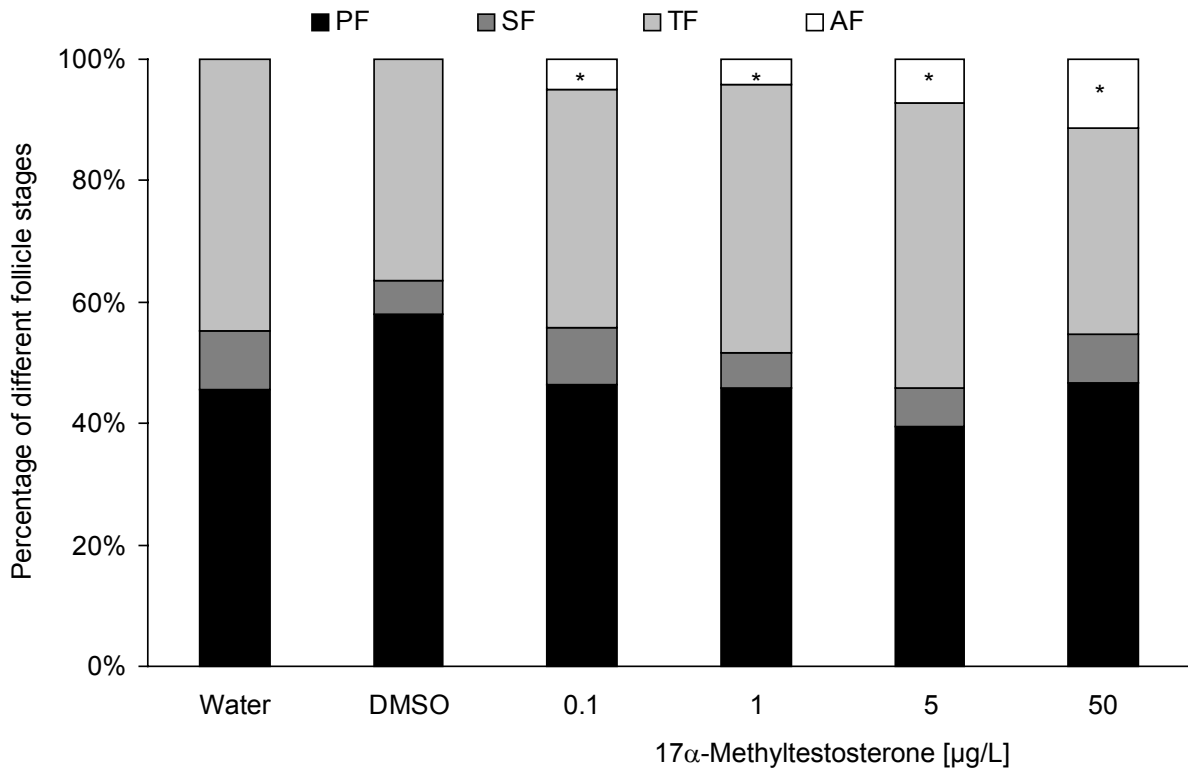
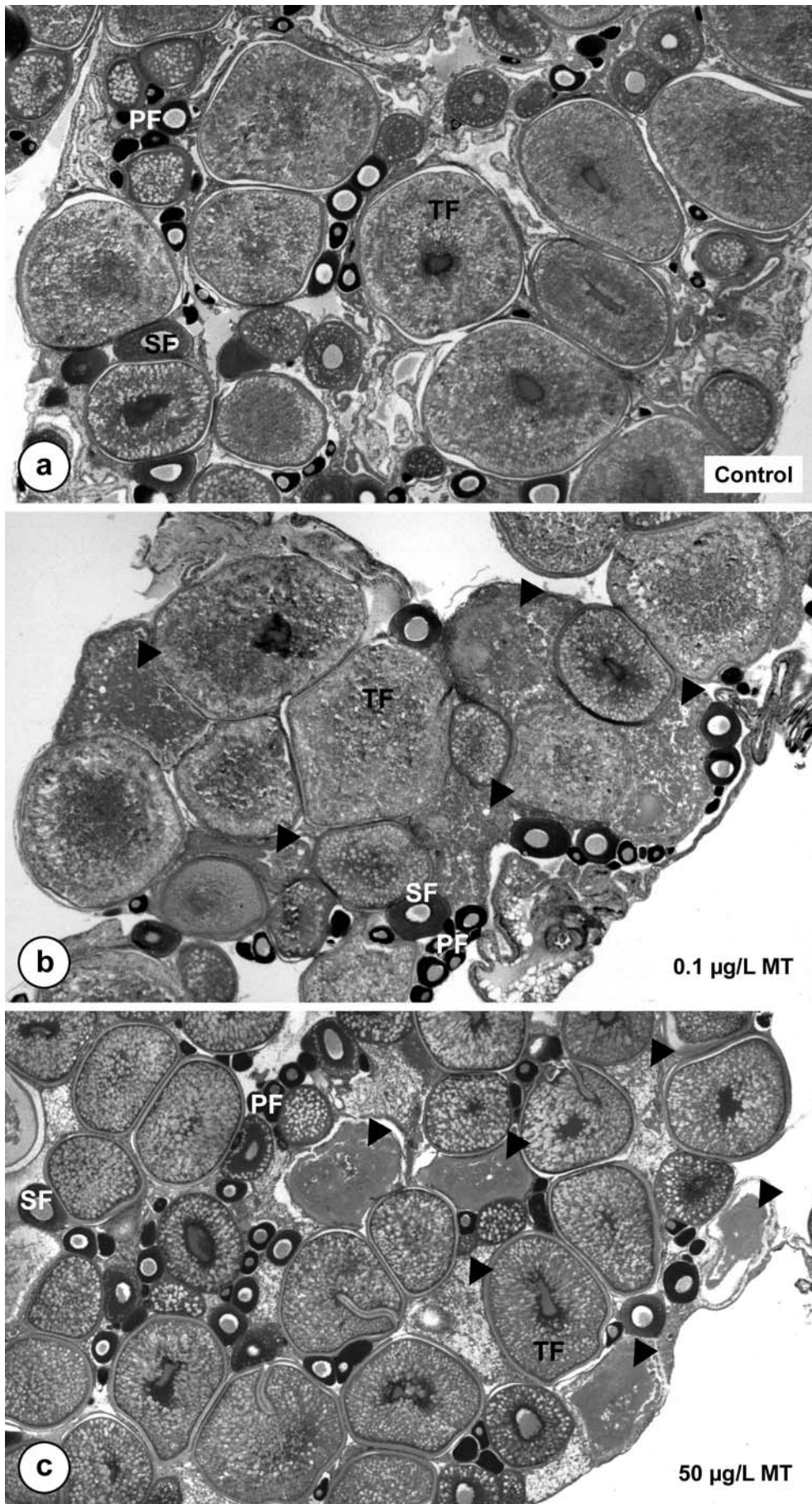
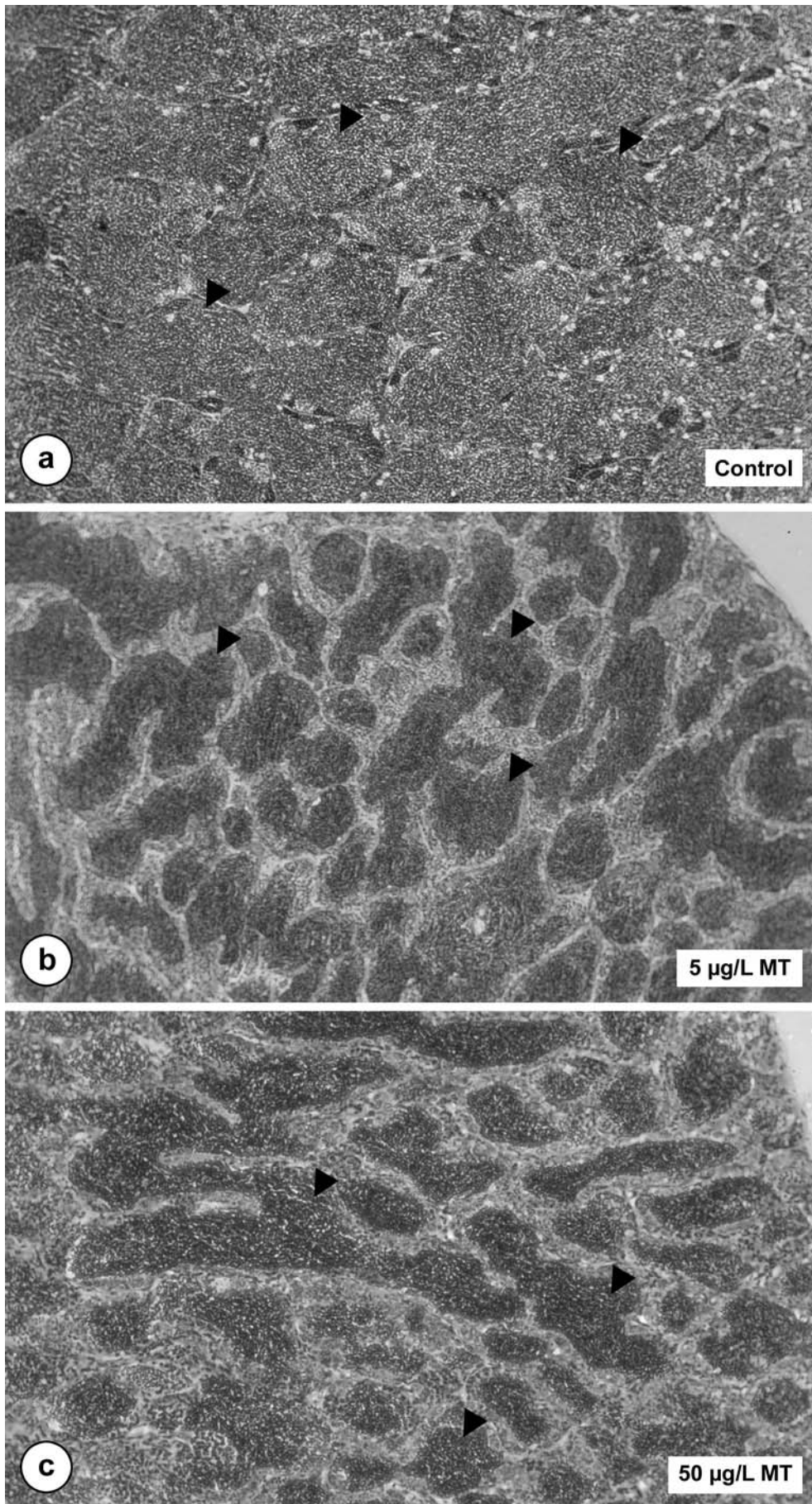


Fig. 3.43. Proportion of developing oocytes at the different classified stages of development in female fathead minnow after exposure to 17 α -methyltestosterone in the gonadal recrudescence assay. No significant different in the abundance of the different follicles stages could be observed at any MT-concentration, if compared to the controls (water, DMSO). At MT-concentrations ≥ 0.1 µg/L, however, a dose-dependent increase in atretic follicles was apparent in female ovaries ($R^2 = 0.8929$). $n = 5$ for each MT concentration and controls, respectively. DMSO – 0.01 % DMSO. * $p < 0.05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunnett’s post hoc test).

Fig. 3.44. Ovaries from female fathead minnow after treatment with 17 α -methyltestosterone (MT) stained with haematoxylin/eosin. In all ovaries from the controls (water, DMSO) and the MT-exposure groups, all stages of follicular development (PF – primary follicle; SF – secondary follicle; TF – tertiary follicle) could be observed. In contrast to the controls, where no atretic follicles could be detected (a), a dose-dependent increase in atretic follicles (arrowheads) was apparent at any investigated MT concentration, ranging from 5 % at 0.1 µg/L (b) to 11.4 % at 50 µg/L MT (c), respectively. x 40.

Fig. 3.45. Light microscopical appearance of testes from male fathead minnow after a three week exposure to 17 α -methyltestosterone (MT) in the gonadal recrudescence assay stained with haematoxylin/eosin. No decrease in sperm production could be observed at any investigated MT concentration, if compared to the controls (water, solvent). Seminiferous tubules were filled up with fertile sperm (arrowheads). x 100.





Tab. 3.7. Range of different follicle stages and atretic follicles in ovaries from female fathead minnow exposed to various concentrations of the synthetic androgen 17 α -methyltestosterone [in %]

17 α -Methyltestosterone concentration [μ g/L]	No. of scores ¹	Primary follicles	Secondary follicles	Tertiary follicles	Atretic follicles
Water control	0	24.6 – 73.1	2.3 – 25.2	24.6 – 63.9	0
DMSO control	0	41.3 – 71.8	3.3 – 8.7	23.5 – 51.5	0
0.1	4	34.1 – 54.4	5.8 – 13.8	27.1 – 52.0	0 – 17.3*
1	5	37.9 – 55.1	2.0 – 10.8	28.4 – 56.4	0.9 – 10.1*
5	5	17.7 – 59.7	1.9 – 12.2	30.1 – 65.6	3.1 – 12.5*
10	5	37.8 – 59.1	4.4 – 13.9	25.0 – 41.9	5.0 – 24.0*

¹Number of ovaries containing atretic follicles. * $p < 0.05$ from solvent control (one way ANOVA, Dunnetts's post hoc test).

In den Hoden der belasteten männlichen Dickkopfelritzen konnte kein Unterschied in der Spermienproduktion bei allen untersuchten MT-Belastungsgruppen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Fig. 3.45). Sowohl in den Hoden der Kontrolltiere, als auch bei den belasteten Fischen konnten große Mengen an reifen Spermien im Lichtmikroskop festgestellt werden (Fig. 3.45). Zudem konnten weder in den Kontrollen noch in den exponierten männlichen Dickkopfelritzen degenerierte Stadien der Spermienentwicklung festgestellt werden (Fig. 3.45).

3.5.7 Diskussion

Im vorangegangenen Kapitel 3.4 konnte gezeigt werden, dass der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze zum Nachweis von östrogenen Effekten im Fisch in umweltrelevanten Konzentrationsbereichen geeignet ist. In der vorliegenden Studie wurden nun androgene Effekte, ausgelöst durch die Belastung mit 17 α -Methyltestosteron, im Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze untersucht. Anhand der untersuchten Endpunkte konnte gezeigt werden, dass der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze zum Nachweis androgener Effekte (hier durch 17 α -Methyltestosteron) geeignet ist.

Als empfindlicher Endpunkt ist hierbei das Auftreten von atretischen Follikeln in den Ovarien weiblicher Dickkopfelritzen zu nennen (Tab. 3.8). Während bei den Kontrolltieren keine atretischen Follikel festgestellt wurden, konnten bereits ab der geringsten untersuchten MT-Konzentration von 0,1 μ g/L ein dosisabhängiger Anstieg atretischer Follikel nachgewiesen werden. Zuvor konnten Ankley et al. (2001) auch bei höheren MT-Konzentrationen atretische Follikel in den Ovarien belasteter Dickkopfelritzen feststellen. Auch in Weibchen des Japanischen Reiskärpflings (*Oryzias latipes*) konnte nach lebenslanger Belastung mit dem Androgen Dehydroepiandrosteron (100 μ g/L DHEA) ein Auftreten von hypertrophen bzw. atretischen Follikeln festgestellt werden (Knörr and Braunbeck 2000). Es ist daher anzunehmen, dass

androgene bzw. androgen wirksame Substanzen die Eientwicklung in Fischen schädigend beeinflussen können, bzw. das Auftreten atretischer Follikel auf mögliche androgene Effekte zurückgeführt werden kann.

Während bei den Männchen keine MT-abhängige Veränderung in der Tuberkelzahl festgestellt werden konnte, zeigte sich bei den Weibchen doch eine deutliche dosisabhängige Ausprägung von Tuberkeln ab 1 µg/L. Zwar konnten hier nicht die absoluten Tuberkelzahlen erreicht werden, wie sie bei den Männchen vorliegen (siehe auch Ankley et al. 2001, Miles-Richardson et al. 1999a Smith 1978, sowie Kapitel 3.4), jedoch weist allein das Auftreten der Tuberkel in den Weibchen einen androgenen Einfluss durch MT nach. In einer ähnlichen Studie mit 0,25 mg/L MT pro Woche und weiblichen Dickkopfeleritzten konnte eine vergleichbare Anzahl an Tuberkel (ca. 10) festgestellt werden (Smith 1974), während sie in einer anderen Studie nach Belastung mit 0,2 mg/L für 12 Tage ca. doppelt so hoch war (Ankley et al. 2001). Obwohl bereits ab 0,1 µg/L MT atretische Follikel in den Ovarien der Weibchen auftraten, konnte bei den mehr populationsrelevanten Parametern wie Befruchtungsrate und durchschnittliche Eizahl/Pair erst ab 5 µg/L MT ein signifikanter Rückgang festgestellt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei längerer bzw. kontinuierlicher Belastung der Fische, auch bei niedrigeren MT-Konzentrationen der Fortpflanzungserfolg negativ beeinträchtigt werden könnte (siehe LOEC für atretische Follikel, Tab. 3.8).

Tab. 3.8. Lowest observed effective concentrations (LOEC) for the biological endpoints measured in male and female fathead minnow after three week exposure to 17 α -methyltestosterone in the gonadal recrudescence assay

Investigated endpoints	LOECs of 17 α -methyltestosterone [µg/L]	
	Males	Females
Condition factor	-	-
Gonadosomatic index	-	50
Plasma vitellogenin	1	50
Testes (histology)	-	-
Ovaries (histology)	-	0.1
Amount of tubercles	-	1
Abnormal body colour	-	-
Fertilisation rate	-	5
Mean number of spawned eggs/pair	-	5
Abnormal sex specific behaviour	-	5

Eine signifikante Abnahme im gonadosomatischen Index (GSI) konnte lediglich nach Belastung mit 50 µg/L MT beobachtet werden. Jedoch zeigte sich bereits ab 5 µg/L MT eine tendenzielle Abnahme im GSI. Da aber auch noch in der höchsten MT-Konzentration tertiäre Follikel in den Ovarien der Weibchen nachweisbar waren, scheint die Oogenese zumindest in ihren Grundzügen noch stattzufinden, was mit der Konstanz im GSI zumindest bis 1 µg/L

korreliert. Bei höheren MT-Konzentrationen (ab 0,2 mg/L) scheint die Ausbildung von Tertiärfollikeln in weiblichen Dickkopfelritzen jedoch vollständig zum Erliegen zu kommen (Ankley et al. 2001). Somit konnten in der vorangegangenen Studie auch keine atretischen Follikel mehr nachgewiesen werden.

Bei den Männchen konnten im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderungen im Verhalten, Konditionsfaktor, GSI, Hodenhistologie, Tuberkelzahl sowie Färbung festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu konnte durch eine mehrmalige Injektion von 8 µg/g 17α-Methyltestosteron in adulte männliche Aale (*Anguilla anguilla*; sogenannte Blankaale) die Bildung von Spermien induziert werden (Olivereau and Olivereau 1985). Im vergleichbarer Weise konnten bei männlichen Dreistachligen Stichlingen (*Gasterosteus aculeatus*), welche unter Kurztagbedingungen (8:16 h Tag:Nacht-Rhythmus) bei 20 °C mit 35 µg/L 17α-Methyltestosteron belastet wurden, u.a. die Ausbildung des Brutkleides festgestellt werden (Borg et al. 1986). In beiden Fällen wurden androgene Wirkungen von 17α-Methyltestosteron für die auftretenden Effekte verantwortlich gemacht. Möglicherweise werden stimulatorischen androgenen Effekte wie sie durch 17α-Methyltestosteron in männlichen Fischen außerhalb der Laichzeit hervorgerufen werden konnten, dadurch überlagert, dass im Gonadal Recrudescence Assays mit der Dickkopfelritze sowohl belastete, als auch Kontrolltiere zur Fortpflanzung angeregt werden.

Weiterhin beschrieben Ankley et al. (2001) eine Hypertrophie des Hodengewebes sowie ein Auftreten von degenerierten bzw. nekrotischen Keimzellen in adulten Dickkopfelritzen nach Belastung mit 0,2 bzw. 2 mg/L 17α-Methyltestosteron, über einen Zeitraum von bis zu 21 Tagen. Diese Effekte konnte in der gegenwärtigen Studie jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Ursache liegt hier möglicherweise ist den niedrigeren Schadstoffkonzentrationen-Konzentrationen in der gegenwärtigen Studie (bis 50 µg/L MT) im Vergleich zur Studie von (Ankley et al. 2001). Negative Einflüsse auf Spermatogenese bzw. Spermiogenese lassen sich im Gonadal Recrudescence Assay deutlich nachweisen, da während der Winterruhephase (simulierter Kurztag und 15 °C Wassertemperatur) keine Spermienproduktion stattfindet (Smith 1978) und diese erst mit Beginn der Belastung durch simulierten Langtag (16:8 h Tag:Nacht und 25 °C Wassertemperatur) angeregt wird.

Aufgrund der nicht nachweisbaren Veränderungen im Verhalten, Konditionsfaktor, GSI, Hodenhistologie sowie der Anzahl der Tuberkel und der Färbung bei den exponierten Männchen lassen sich der Rückgang der Befruchtungsrate sowie der abgelegten Eizahl/Pair auf negative Effekte von MT auf die Weibchen zurückführen. Diese Annahme kann durch das Auftreten von männlichem Territorialverhalten und männlicher Balz- bzw. Brutfärbung ab 5 µg/L MT gestützt werden: Weibchen mit diesen Fortpflanzungseigenschaften erscheinen als potentielle Geschlechtspartner für fortpflanzungsbereite Männchen nicht geeignet bzw. weisen auch keine weibchenspezifischen Verhaltenweisen auf, welche zu einer erfolgreichen Eiablage führen könnten. Ferner könnte die zunehmende Anzahl atretischer Follikel eine erfolgreiche Eiablage verhindern (vgl. Knörr and Braunbeck 2000).

Die Belastung von juvenilen Dickkopfelritzen mit bis zu 100 µg/L MT über einen vergleichbaren Zeitraum führte hingegen nicht zur Ausprägung von männlichen Sekundärgeschlechtsmerkmalen sowie männlichem Territorialverhalten bei den belasteten Weibchen (Zerulla et al. 2002). Die Autoren gingen in dieser Studie von östrogenen Effekten aus, welche durch MT

verursacht wurden, was in der gegenwärtigen Studie nicht belegt werden konnte. Auch Ankley et al. (1998) und Smith (1974) konnten deutlich androgene Effekte (Tuberkel, Dunkelfärbung) in adulten weiblichen Dickkopfelritzen nach MT-Belastung nachweisen. Im Vergleich hierzu konnte nach 60-tägiger Belastung juveniler Muskellungen (*Esox masquinongy*) mit 15 mg/kg MT über das Futter, eine Geschlechterschiebung zugunsten der Weibchen festgestellt werden (Rinhard et al. 1999). Aufgrund dieser Erkenntnisse aus den bisherigen Daten bestehen möglicherweise Unterschiede in den Auswirkungen von MT auf juvenile und adulte Fische, obwohl verschiedene Studien zeigten, dass eine Belastung von Fischen zur Vermännlichung weiblicher Tiere führt (Nakamura 1994, Schmelzing and Gall 1991).

Die Messung des Plasmavitellogenin-Gehaltes MT-exponierter Dickkopfelritzen zeigte, dass jedoch insbesondere bei den männlichen Fischen ein deutlicher Anstieg ab 1 µg/L MT nachzuweisen ist, während bei den Weibchen erst ab 50 µg/L MT signifikante Unterschiede feststellbar sind. Dieser Befund erscheint zunächst verwirrend, da man aufgrund früherer Studien annahm, dass die Synthese von Vitellogenin ein rein Östrogen-gesteuerter Prozess ist, welcher durch zahlreiche Substanzen mit östrogenen Wirkung in vergleichbarer Weise ausgelöst werden kann (Harries et al. 1997b, Purdom et al. 1994, Sumpter and Jobling 1995, Tyler et al. 1996). Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass im Fisch eine Biotransformation von MT in eine östrogen wirksame Molekülstruktur stattfindet (Ankley et al. 2001). Das P450-Enzym Aromatase scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen, da es natürlicherweise das Verhältnis von Androgenen zu Östrogenen steuert, bzw. für die Synthese des Östrogens 17β-Estradiol aus dem Androgen Testosteron verantwortlich ist (vgl. Desvages and Pieau 1991). Durch die externe Zugabe von MT wird das Verhältnis dieser beiden Hormongruppen, insbesondere bei den Männchen, zugunsten der Androgene verschoben. Die Induktion der Aromatase-Aktivität (Erhöhung der Genexpression) führt zu einer erhöhten Rückreaktion, wodurch die Konzentration an Östrogenen im Blut ansteigt (Ankley et al. 2001). Dieser Anstieg führt dann bei den Männchen zur Synthese von Vitellogenin (Ankley et al. 2001). Zwar beeinflusst MT durch negative Rückkopplungsmechanismen die natürliche Synthese der Androgene (Testosteron bzw. 11-Ketotestosteron, vgl. Ankley et al. 2001), jedoch erscheinen die eingesetzten MT-Konzentrationen ab 1 µg/L außerhalb des für die männlichen Dickkopfelritzen steuerbaren Konzentrationsbereiches zu liegen. Bei den Weibchen liegen hingegen bereits aufgrund der gegebenen hohen Aromatase-Aktivität natürlicherweise relativ hohe Östrogenkonzentrationen vor (vgl. Belaid et al. 2001, Crews et al. 1989, Desvages and Pieau 1991). Deren Synthese wird nach MT-Belastung stark reduziert, so dass erhöhte Aromatisierung von MT erst bei weitaus höheren MT-Konzentrationen (ab 50 µg/L) außerhalb des regulierbaren Bereiches liegt (Ankley et al. 2001).

Da bei beiden Geschlechtern kein Einfluss auf die Kondition nach Belastung mit MT im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 50 µg/L festgestellt werden konnte und auch in Vergleichsstudien mit adulten und juvenilen Dickkopfelritzen (Ankley et al. 1998, Smith 1974, Zerulla et al. 2002) keine akute Toxizität beobachtet wurde, liegen die in der vorliegenden Studie nachgewiesenen Effekte deutlich im subletalen Bereich und können somit durch konventionelle Toxizitätsstudien nicht erfasst werden.

Auch wenn bisher keine Daten zum Auftreten von 17α -Methyltestosteron im Kläranlagenabwasser bzw. in Oberflächengewässern vorliegen, kann durch den Einsatz von MT in zahlreichen Hormonpräparaten im mg-Bereich (Adamson et al. 2001, Barrett-Connor et al. 1999, Hickok et al. 1993, Raisz et al. 1996, Simon et al. 1999) ein Auftreten in Umweltwasserproben zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Anhand der vorliegenden Studie mit adulten Dickkopfelritzen konnte gezeigt werden, dass hier vor allem weibliche Fische durch die androgenen Effekte von MT betroffen sind. Da das Auftreten von atretischen Follikeln nach dreiwöchiger Belastung mit MT in den Ovarien geschlechtsreifer Dickkopfelritzen bereits in der geringsten MT-Konzentration von $0,1 \mu\text{g/L}$ festgestellt werden konnte, ist an dieser Stelle nicht auszuschließen, dass MT auch noch in niedrigeren Konzentrationen zur Ausbildung von atretischen Follikeln in weiblichen Dickkopfelritzen führen kann. Bisher liegen jedoch noch keine Daten zur Wirkung niedrigerer MT-Konzentrationen mit der Ausnahme vor (vgl. Ankley et al. 2001, Zerulla et al. 2002), dass bereits nach achtwöchiger Belastung frisch geschlüpfter Regenbogenforellen mit $3 \mu\text{g/L}$ MT ein Anteil an sterilen Fischen von 15 % festgestellt werden konnte (van den Hurk and Slof 1981).

Somit besteht durchaus die Möglichkeit, dass das Wirkungspotential von MT in seiner Potenz dem der steroiden Östrogene 17β -Estradiol und 17α -Ethinylestradiol nahe kommt (Länge et al. 2001, Miles-Richardson et al. 1999a, Panter et al. 2000, 2001). Es ist daher nicht auszuschließen, dass durchaus auch androgene Effekte durch Kläranlagenabwasser hervorgerufen werden, welche jedoch durch *In vitro*-Biotests zum Nachweis östrogenen Effekte (YES, MCF-7-Zellen, 293 HEK-Zellen, Vitellogenin-Nachweis) nicht bzw. nur sehr eingeschränkt nachgewiesen werden können. Dass neben östrogenen auch androgene Effekte durch kommunale und industrielle Abwässer hervorgerufen werden können, wurde bereits durch verschiedene unabhängige Studien dargelegt (Jenkins et al. 2001, Larsson et al. 2000, Larsson et al. 2002). Zudem konnten Thomas et al. (2001) Androsteron als Abbauprodukt des männlichen Sexualhormons Testosteron im Abwasser einer kommunalen Kläranlage in Großbritannien in Konzentrationen von 800 ng/L (abgeschätzt) nachweisen. Gerade im Bezug auf die Messung von Plasmavitellogenin bzw. VTG-mRNA in männlichen Fischen ist jedoch zu beachten, dass es auch durch die mögliche Biotransformation von Androgenen (hier MT) in Östrogene Vitellogeninsynthese in männlichen Fischen kommen kann, was zur vermeintlichen „Östrogenisierung“ von Umweltproben (z.B. Kläranlagenabwässer) führen kann. Es erscheint daher dringend notwendig, im weiteren Verlauf der Untersuchungen zum hormonellen Einfluss von Kläranlagenabwässern auf aquatische Organismen neben östrogenen Einflüssen auch mögliche androgene Einflüsse zu berücksichtigen. Aufgrund der Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale während der Laichzeit und der Verwendung beiderlei Geschlechter erscheint der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze besonders für die Überprüfung hormoneller Aktivitäten von Oberflächen- und Kläranlagenabwässern geeignet.

3.5.8 Ausblick

Mit Blick auf die bisher gewonnenen Daten zum Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze, soll daher in einer abschließenden Untersuchung die Anwendbarkeit dieses Fischtestsystems auf ein Freilandssystem, hier ein Kläranlagenauslauf, untersucht werden. Um mögliche hormonelle Effekte in den Dickkopfelritzen durch hormonaktive Substanzen im Abwasser nachweisen zu können, sollen insbesondere die Endpunkte herangezogen werden, welche sich in den vorherigen Versuchen mit dieser Fischart als besonders empfindlich herausgestellt hatten.

3.6 Effekte von kommunalem Kläranlagenabwasser auf adulte Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*) im Gonadal Recrudescence Assay

Zusammenfassung

Durch die vorangegangenen Studien mit den hormonaktiven Referenzchemikalien 17α -Ethinylestradiol (Östrogen) und 17α -Methyltestosteron (Androgen) konnte gezeigt werden, dass der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) zum Nachweis östrogenen und androgenen Effekte von Einzelsubstanzen geeignet ist. In der gegenwärtigen abschließenden Studie wurde versucht, dieses Fischtestsystem auf seine Übertragbarkeit für Umweltanalysen unter Freilandbedingungen zu testen. Hierzu wurden adulte Dickkopfelritzen für drei Wochen im Kläranlagenablauf der kommunalen Kläranlage des ersten Standortes über einen Zeitraum von drei Wochen im Mai 2002 (14:10 h Tag:Nacht-Rhythmus; $17,8 \pm 0,3$ °C) exponiert. Entsprechende Kontrolltiere wurden unter Sommerbedingungen (16:8 h Tag:Nacht-Rhythmus) bei 22 °C in Leitungswasser exponiert. Nach dreiwöchiger Belastung wurden Effekte auf Kondition (Konditionsfaktor), Gonadenwachstum (gonadosomatischer Index, GSI), sekundäre Geschlechtsmerkmale und Plasmavitellogenin untersucht. Weiterhin wurden lichtmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis histologischer Veränderungen von Hoden und Ovarien durchgeführt.

Die Exposition beider Geschlechter gegenüber dem kommunalen Kläranlagenabwasser führte im Vergleich zur Kontrolle zu keiner signifikanten Änderung im Konditionsfaktor. Bei beiden Geschlechtern der exponierten Fische konnte ein signifikanter Anstieg im GSI um 38 (Männchen) bzw. 90 % (Weibchen) festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu war die Anzahl der Tuberkel in den exponierten Männchen um 53 % reduziert. Bei den exponierten männlichen Fischen konnte ein signifikant erhöhter Plasmavitellogenin-Gehalt um 83 % gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Bei den exponierten Weibchen konnte hingegen ein um 50 % reduzierter Plasmavitellogenin-Gehalt gegenüber der Kontrolle festgestellt werden, welcher auf die geringeren Wassertemperaturen unter Freilandbedingungen zurückzuführen ist.

In den Ovarien exponierter Weibchen konnte eine signifikant erhöhte Anzahl an tertiären Follikeln festgestellt werden. In den Hoden exponierter Männchen konnten neben reifen Spermien auch degenerierende Spermatogonien nachgewiesen werden.

Auch unter Freilandbedingungen konnten durch den Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze östrogene Effekte durch das untersuchte kommunale Kläranlagenabwasser nachgewiesen werden.

3.6.1 Einleitung

Durch die vorangegangenen Studien mit den hormonaktiven Referenzchemikalien 17α -Ethinylestradiol (Östrogen) und 17α -Methyltestosteron (Androgen) konnte gezeigt werden, dass der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) zum Nachweis östrogenen und androgenen Effekte von Einzelsubstanzen geeignet ist. In der gegenwärtigen abschließenden Studie wurde versucht, dieses Fischtestsystem auf seine Übertragbarkeit für Umweltanalysen unter Freilandbedingungen zu testen.

3.6.2 Konditionsfaktor und Gonadenwachstum

Nach dreiwöchiger Exposition adulter Dickkopfelritzen im Abwasser der kommunalen Kläranlage des Standortes 1 konnten keine Unterschiede im Konditionsfaktor männlicher und weiblicher Fische gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden (Fig. 3.46). Sowohl bei den exponierten, als auch bei den Kontrolltieren lag die Überlebensrate bei 100 %.

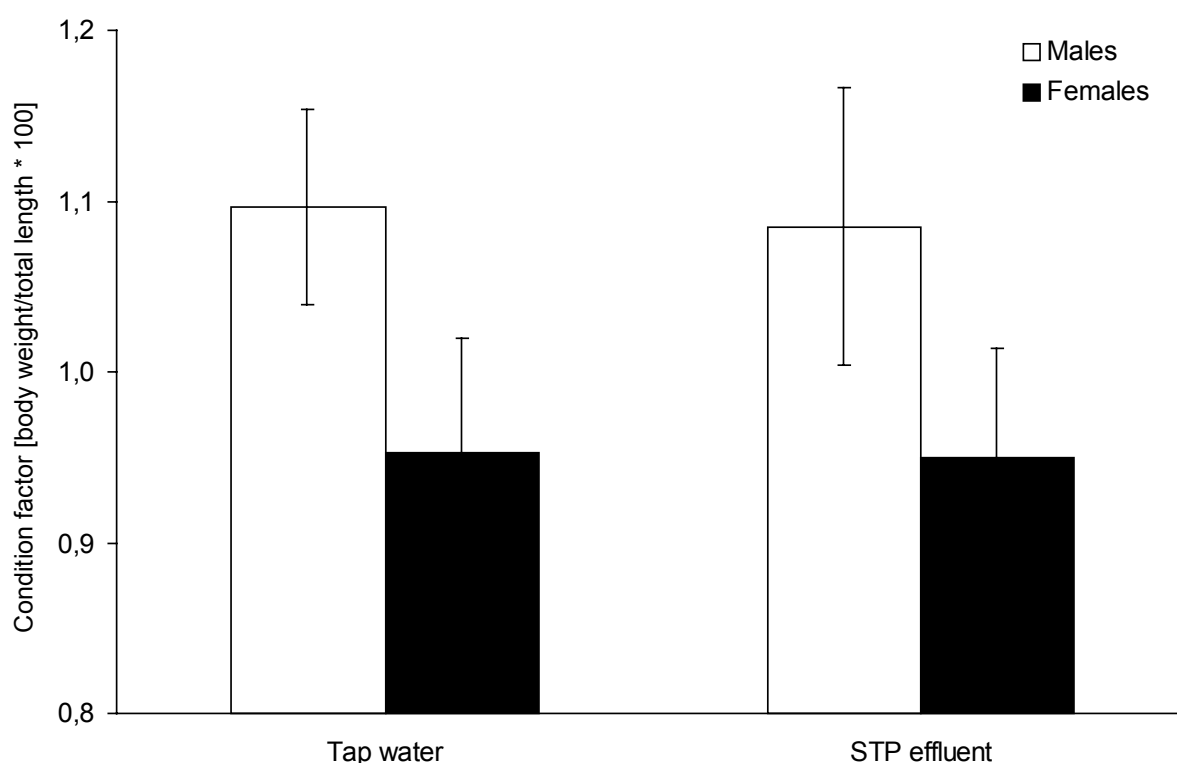


Fig. 3.46. Condition factor (CF) of male and female fathead minnow in the gonadal recrudescence assay after a three week exposure in the effluent from the municipal sewage treatment plant (STP) at site 1. No significant difference in CF could be observed in both sexes, compared to the control fish receiving tap water only. $n = 20$ for each sex and treatment group. (one way ANOVA, Dunnett's post-hoc test).

Sowohl in männlichen als auch in weiblichen Dickkopfelritzen, welche mit dem Abwasser der kommunalen Kläranlage exponiert wurden, konnte ein stärkeres Gonadenwachstum (höherer gonadosomatischer Index, GSI) im Vergleich zu den Kontrollfischen festgestellt werden (Fig. 3.47). Bei den Männchen der Kontrolle lag der GSI bei 0,99, während er bei den exponierten Tieren mit 1,37 um etwa 38 % höher war. Bei den Weibchen waren die Unterschiede im GSI noch deutlicher: So lag er bei den Kontrolltieren bei 2,38, während die exponierten Weibchen einen GSI von 4,53 (entspricht einem Anstieg um ca. 90 %) aufwiesen.

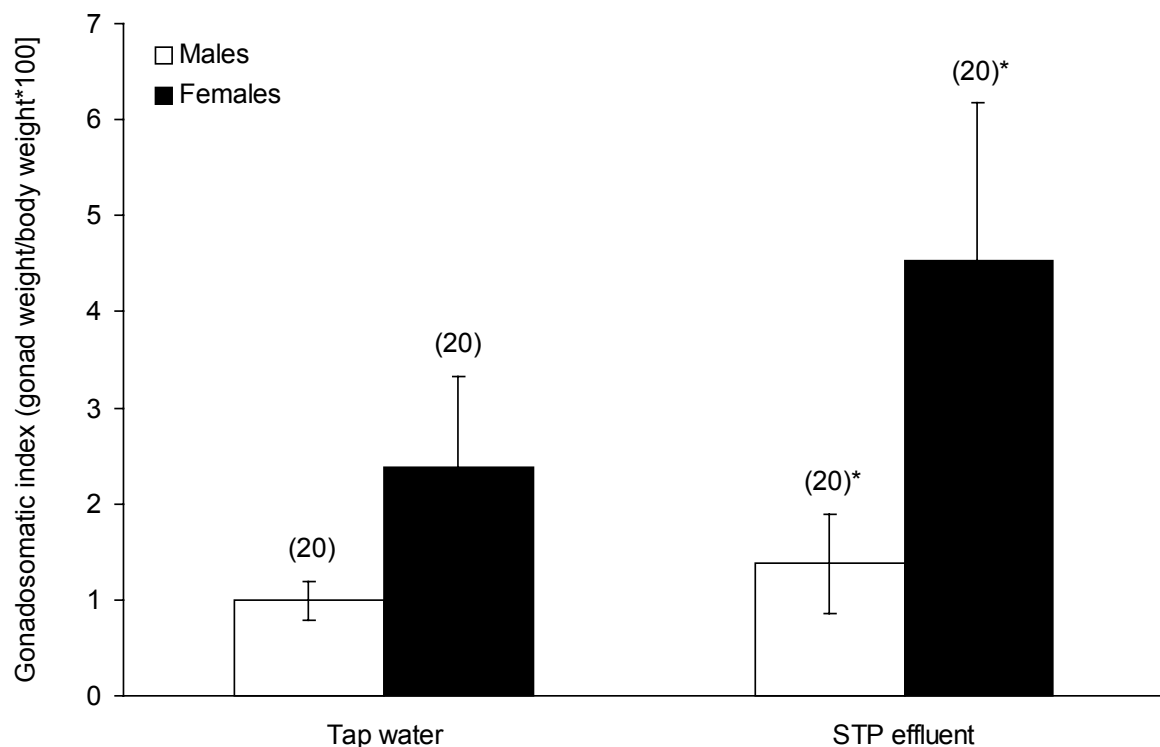


Fig. 3.47. Gonadosomatic index (GSI) of male and female fathead minnow in the gonadal recrudescence assay after a three week exposure to the effluent from the municipal sewage treatment plant (STP) at site 1. Exposed fish of both sex, indicated a higher GSI, if compared to the control, receiving tap water only. In exposed males, GSI increased about 38 %, whereas in females GSI an increase of about 90 %, if compared to the control could be observed. Numbers of fish are given in brackets. * $p < 0.05$ from tap water control (one way ANOVA, Dunnett's post-hoc test).

3.6.3 Sekundäre Geschlechtsmerkmale

Nach der Exposition adulter Dickkopfelritzen im Abwasser der kommunalen Kläranlage traten Tuberkel ausschließlich im männlichen Geschlecht sowohl der exponierten als auch der Kontrolltiere auf (Fig. 3.48). Bei den Abwasser exponierten männlichen Dickkopfelritzen konnte jedoch eine signifikant reduzierte Anzahl an Tuberkel im Kopfbereich gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden ($p < 0,05$; Fig. 3.48): Die Anzahl der Tuberkel lag hier mit durchschnittlich 5,3 d.h. 53 % der entsprechenden Kontrolle (durchschnittliche Tuberkelzahl: 9,75).

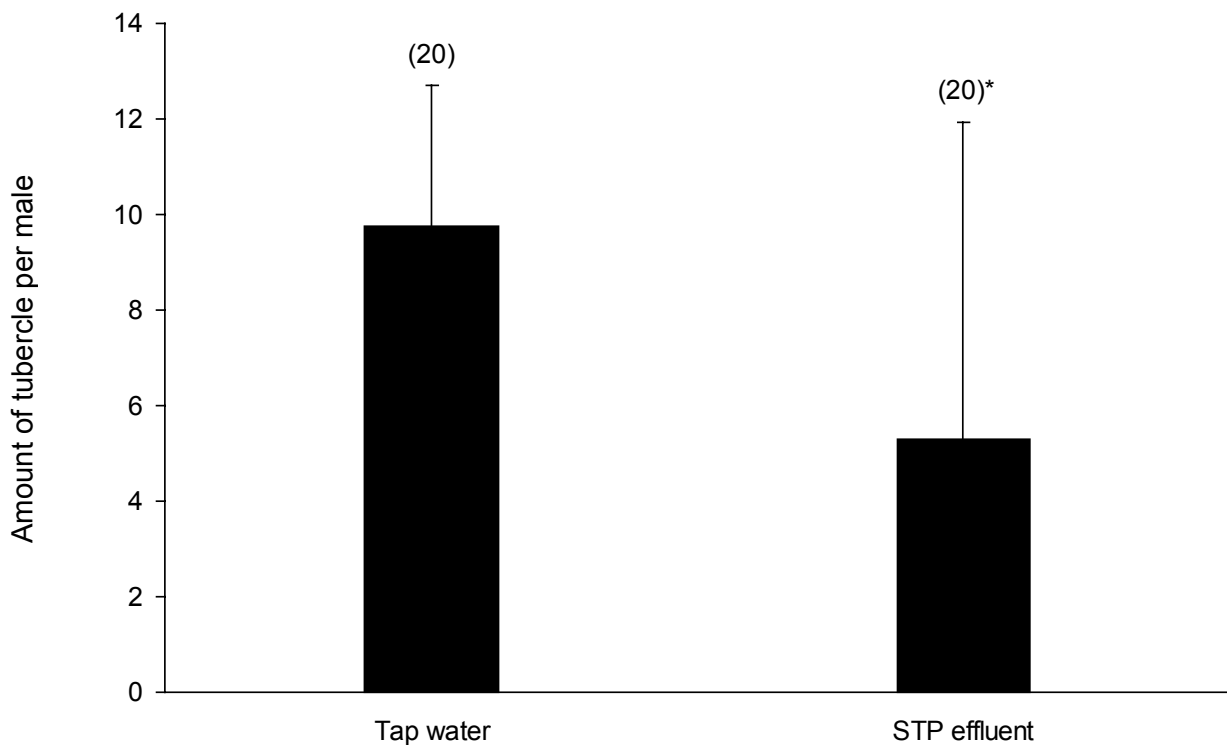


Fig. 3.48. Number of tubercles per male fathead minnow in the gonadal recrudescence assay after a three week exposure in the effluent from the municipal sewage treatment plant (STP) at site 1. Exposed males indicate a significant reduction in the mean number of tubercles of about 53 %, if compared to the controls receiving tap water only. Numbers of fish are given in brackets. * $p < 0.05$ from tap water control. (one way ANOVA, Dunnett's post-hoc test).

3.6.4 Plasmavitellogenin

Die Exposition adulter Dickkopfritzen im Abwasser einer kommunalen Kläranlage führte bei den Männchen zu einem signifikanten Anstieg im Plasmavitellogenin-Gehalt um 83 % gegenüber der Kontrolle (von 42 ng/ml auf 77 ng/ml; $p < 0,05$; Fig. 3.49). Bei den exponierten Weibchen konnte hingegen ein signifikanter Rückgang des Plasmavitellogenin-Gehaltes um 50 % gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (883 ng/ml im Ablauf gegenüber 1.781 ng/ml bei der Kontrolle; $p < 0,05$; Fig. 3.49).

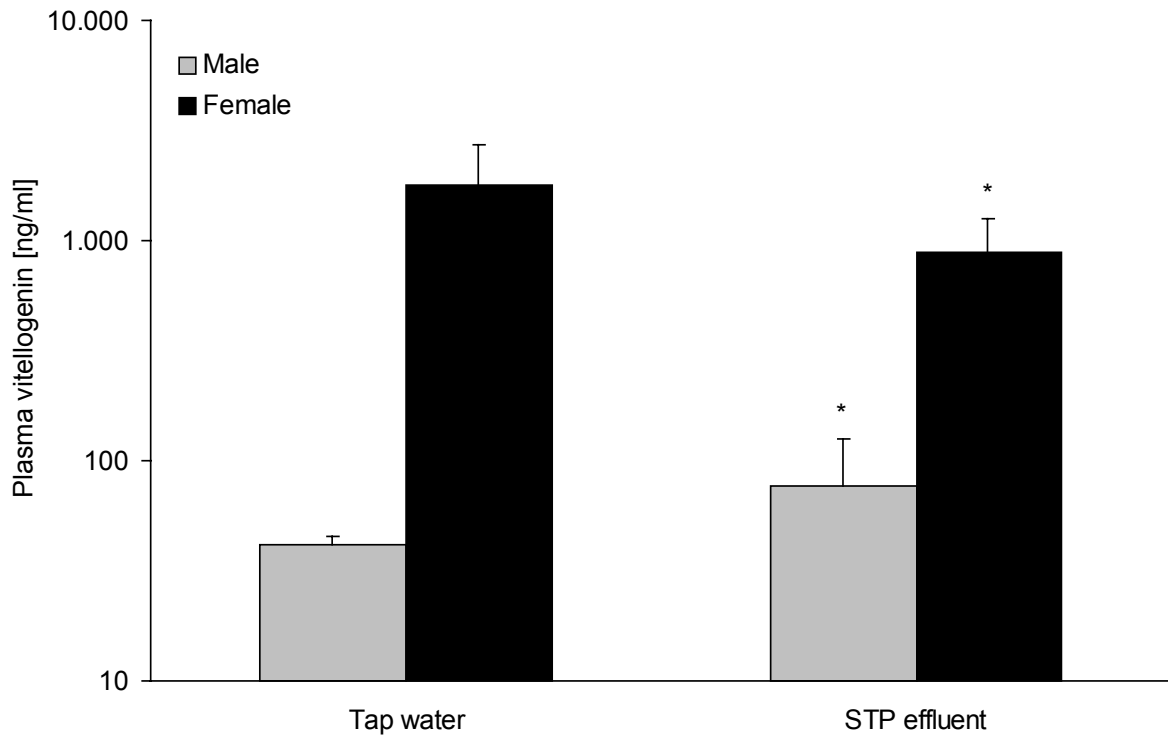


Fig. 3.49. Plasma vitellogenin concentrations in male and female fathead minnow ($n = 12$ for each sex) after exposure to municipal sewage effluent (STP effluent) in the gonadal recrudescence assay. Whereas in exposed males, a significant increase in plasma vitellogenin concentration was apparent, a significant decrease of plasma vitellogenin concentration could be observed in females. $n = 12$ males and females for STP effluent exposure regime and control, respectively. * $p < 0.05$ from tap water control (one way ANOVA, Dunnett's post-hoc test).

3.6.5 Histopathologie der Gonaden

Durch histologische Untersuchungen der Ovarien konnten sowohl in den abwasserexponierten weiblichen Dickkopfritzen, als auch in den vergleichbaren Kontrolltieren alle Stadien der Oocytenentwicklung (primäre, sekundäre und tertiäre [Graafsche] Follikel) identifiziert werden (Fig. 3.51, 3.52, Table 3.9). Bei den im Kläranlagenabwasser befindlichen Weibchen konnte jedoch ein signifikanter Anstieg der tertiären (Graafschen) Follikel in den Ovarien gegenüber den Kontrollen beobachtet werden ($p < 0,05$). Während der Anteil an tertiären Follikeln bei den Kontrollfischen bei rund 20 % der Gesamtzahl lag, betrug er bei den exponierten Fischen nach dreiwöchiger Belastung rund 36 %, welches einem Anstieg um ca. 80 % entspricht. Zudem zeigte sich, dass sich die Tertiärfollikel der Kontrolltiere noch in einem frühen Stadium (relativ geringer Anteil an Dottervorrat in den Oocyten) befanden, während sie bei den exponierten Weibchen bereits nahezu voll entwickelt (hoher Anteil an Dotter in den Tertiärfollikeln) waren (Fig. 3.52).

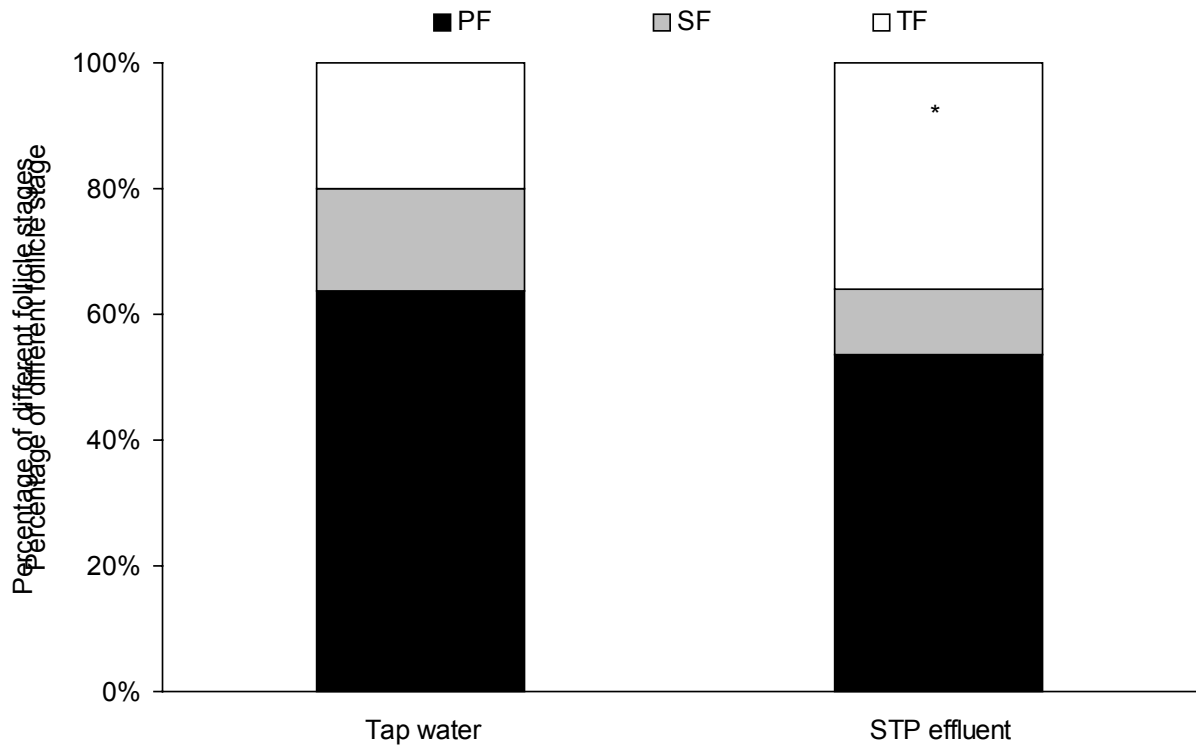


Fig. 3.51. Proportion of developing oocytes at the different classified stages of development in female fathead minnow after a three week exposure to effluent from the municipal sewage treatment plant (STP) at site 1. Exposed females indicate an increase in the average amount of tertiary follicles of about 80 %, if compared to the controls, receiving tap water only. $n = 20$ for each sex and exposure regime. $*p < 0.05$ from tap water control (one way ANOVA, Dunnett's post-hoc test).

Bei Primär- und Sekundärfollikeln konnten hingegen keine signifikanten Veränderungen zwischen abwasserexponierten und Kontrollfischen festgestellt werden. Auch atretische Follikel waren bei keinem der Weibchen nachweisbar.

Anhand lichtmikroskopischer Untersuchungen der Hoden männlicher Dickkopfelritzen konnte sowohl in den abwasserexponierten als auch in den Kontrolltieren eine aktive Spermiogenese festgestellt werden (Fig. 3.53a, b, Table 3.10). In beiden Gruppen waren die Samenkanälchen mit reifen Spermien gefüllt. In den exponierten Dickkopfelritzen konnten jedoch vereinzelt degenerierte Spermatozoonen festgestellt werden (Fig. 3.53b, Table 3.10).

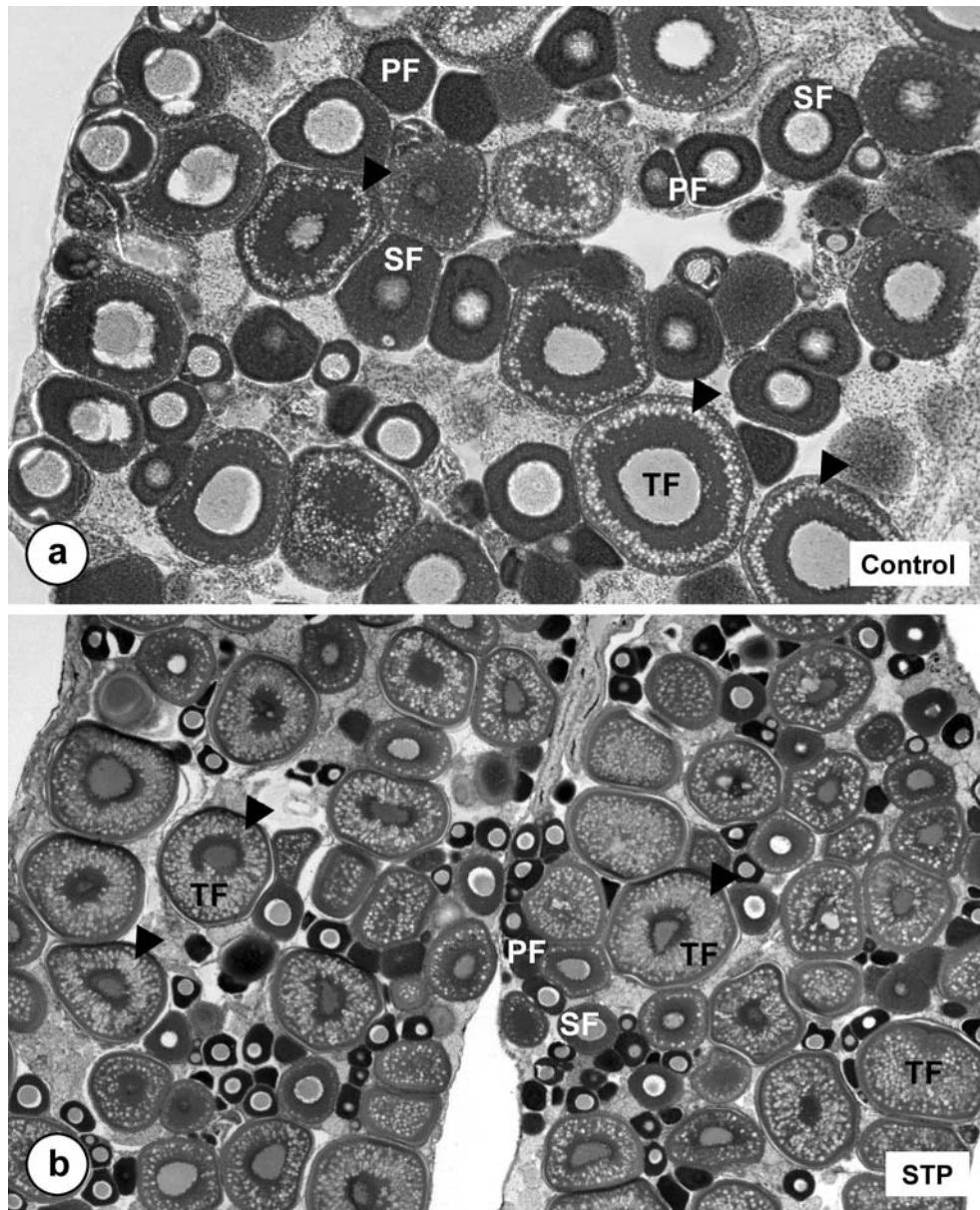


Fig. 3.52. Ovaries from female fathead minnow after a three week exposure to municipal sewage treatment plant effluent from site 1 stained with haematoxylin/eosin. In all ovaries from the controls (water, DMSO) and the MT-exposure groups, all stages of follicular development (PF – primary follicle; SF – secondary follicle; TF – tertiary follicle) could be observed. Ovaries from exposed females (b) displayed a significant increase in tertiary follicles, if compared to the control (a). Even tertiary follicles in control were at an early stage of development, with low amounts of incorporated yolk (arrowhead, a), if compared to late stage TF in exposed females with large amounts of incorporated yolk (arrowheads, b). a: x 100, b: x 40.

3. Ergebnisse und Diskussion

Table 3.9. Range of different follicle stages in ovaries from control and STP effluent exposed female fathead minnow [in %]

Exposure regime	Female no.	Primary follicles	Secondary follicles	Tertiary follicles
Tap water control	1	46.8 – 57.9	14.5 – 22.1	23.8 – 38.7
	2	45.8 – 58.4	16.5 – 20.9	22.9 – 33.3
	3	80.0 – 86.0	9.3 – 14.9	3.9 – 5.3
	4	56.5 – 67.4	16.6 – 24.1	14.9 – 23.4
	5	59.6 – 67.5	10.3 – 15.5	21.8 – 26.8
STP effluent	1	52.3 – 62.7	4.3 – 9.3	31.2 – 39.3
	2	56.3 – 63.0	2.3 – 4.8	33.2 – 38.9
	3	47.0 – 55.4	4.2 – 12.2	37.0 – 41.0
	4	46.5 – 59.2	13.1 – 19.7	27.8 – 36.7
	5	43.5 – 50.5	13.3 – 17.8	35.4 – 41.0

Table 3.10. Light microscopical investigations of testes from male fathead minnow after a three week exposure to STP effluent at site 1

Exposure regime	Male no.	Primary and secondary spermatogonia	Fertile sperm	Degenerative spermatogonia
Tap water control	1	+	-	-
	2	+	+	-
	3	+	+	-
	4	+	+	-
	5	+	+	-
STP effluent	1	+	+	+
	2	+	-	-
	3	+	+	-
	4	+	+	+
	5	+	+	+

+: apparent; - absent

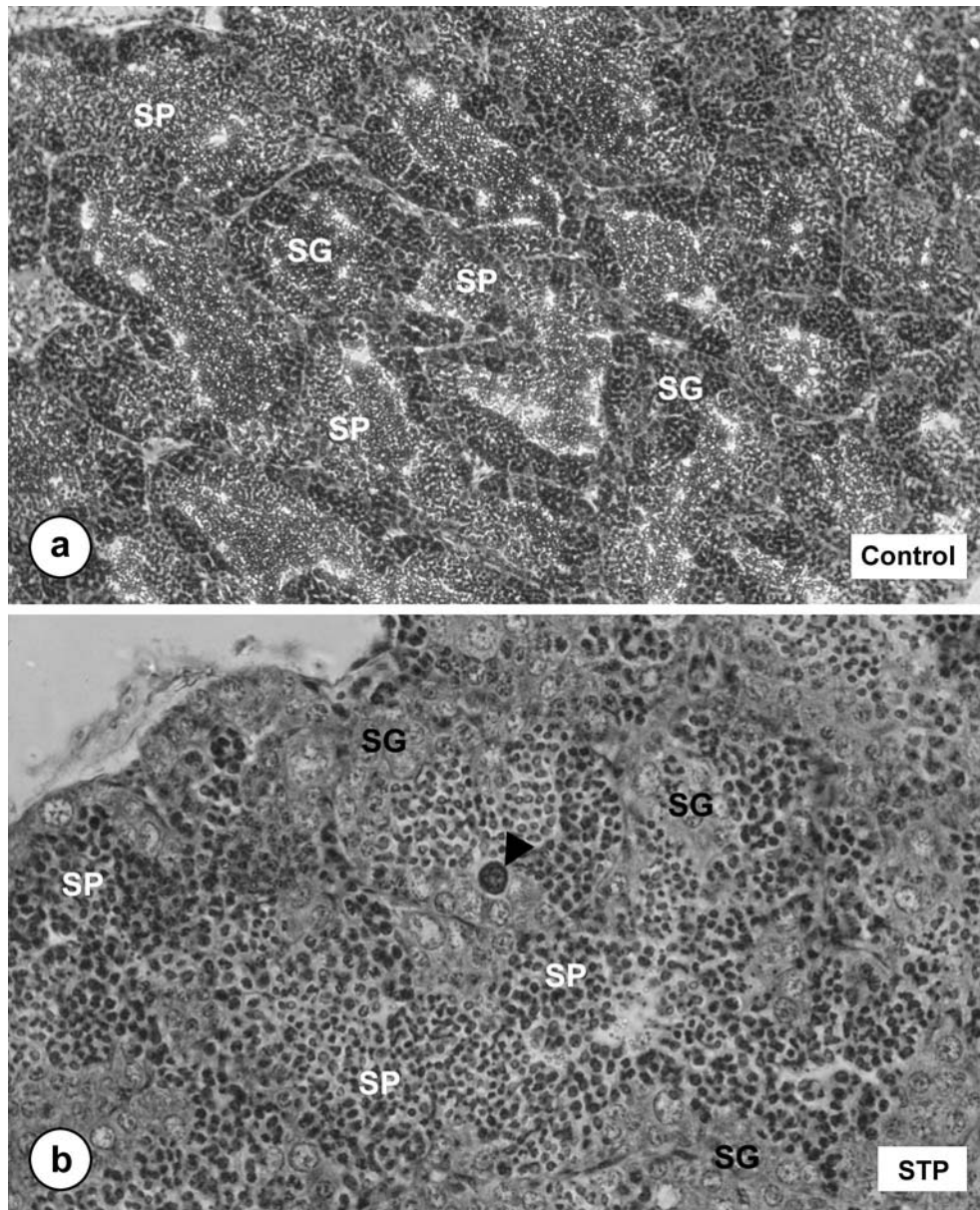


Fig. 3.53. Light microscopy of testes from male fathead minnow after a three week exposure to the municipal sewage treatment plant (STP) effluent from site 1 in the gonadal recrudescence assay stained with haematoxylin/eosin. In both exposed and control fish, seminiferous tubules were filled up with fertile sperm (SP, a and b). In contrast to testes from the controls, several degenerative spermatogonia (arrowhead) could be observed in male fathead minnow exposed to the STP effluent (a, b). SG – primary and secondary spermatogonia; SP – fertile sperm. a: x 200, b: x 400.

3.6.6 Diskussion

Nachdem bereits in Laborversuchen mit ausgewählten hormonaktiven Substanzen (17α -Ethinylestradiol, 17α -Methytestosteron) eine umweltrelevante Empfindlichkeit des Gonadal Recrudescence Assays mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) nachgewiesen werden

konnte, wurde in der vorliegenden Studie die Anwendung dieses Fischtestsystems unter Freilandbedingungen anhand einer Umweltprobe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich mit Hilfe des Gonadal Recrudescence Assays auch im Kläranlagenablauf eines ausgewählten Standortes hormonelle Einflüsse auf die exponierten Dickkopfritzen nach dreiwöchiger Belastung nachweisen lassen. So konnten bei den exponierten Fischen neben Einflüssen auf die Gonadenreifung (gonadosomatischer Index, GSI) und Plasmavitellogenin-Gehalt, auch Einflüsse auf die Tuberkelzahl bei den Männchen sowie lichtmikroskopische Veränderungen in den Hoden und Ovarien festgestellt werden.

Da sowohl Überlebensrate (100 %) und Kondition der abwasserexponierten Fische keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren aufwies, lassen sich akut toxische Einflüsse des Abwassers der kommunalen Kläranlage am Standort 1 während des Untersuchungszeitraumes ausschließen. Dieser Befund ist mit der vorangegangenen Exposition männlicher Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) am gleichen Standort vergleichbar: Auch hier konnte keine akute Toxizität festgestellt werden (vgl. Kapitel 3.3). Studien aus England, bei denen bisweilen bis zu 100 % der Versuchsfische während der Exposition im Kläranlagenabwasser starben (Harries et al. 1999, Sumpter and Jobling 1995) belegen, dass jedoch nicht prinzipiell von einem Überleben der Fische im Kläranlagenabwasser ausgegangen werden kann.

Bei den exponierten Dickkopfritzen zeigte sich bei beiden Geschlechtern ein deutlich stärkeres Gonadenwachstum (höherer GSI) im Vergleich zu den Kontrolltieren, obwohl Wassertemperatur (17,8 °C statt 22 °C) und Tageslänge (14 h statt 16 h) niedriger bzw. kürzer waren. Insbesondere bei den Männchen der Kontrollgruppe lag der GSI mit rund 1 unterhalb der Werte (1,4 – 1,8) vergleichbarer Studien mit geschlechtsreifen männlichen Dickkopfritzen, welche bei 25 °C gehältert wurden (Ankley et al. 2001, Jensen et al. 2001, Makynen et al. 2000, Sohoni et al. 2001). Zudem konnte in den beiden vorangegangenen Studien mit Referenzsubstanzen nach gleichem Versuchsprinzip bei 25 °C ein GSI ebenfalls von rund 1,8 bei den Männchen der Kontrolle festgestellt werden (vgl. Kapitel 3.4 und 3.5). Auch die im Abwasser exponierten Männchen lagen im Vergleich hierzu mit rund 1,4 an der unteren Grenze des GSI der anderen Studien. Jedoch konnte bei Männchen, welche bei 22 °C Wassertemperatur über einen Zeitraum von drei Wochen gehältert wurden, ein GSI von lediglich 1,2 festgestellt werden (Panter et al. 1998).

Es ist daher stark anzunehmen, dass die niedrigere Wassertemperatur während der dreiwöchigen Versuchsdauer für den insgesamt niedrigeren GSI bzw. für das geringere Gonadenwachstum in den männlichen Dickkopfritzen verantwortlich ist. Für das stärkere Gonadenwachstum bei den exponierten Männchen könnte die stärkere Lichtintensität durch die Sonnenstrahlung verantwortlich sein, da sich auch die Beleuchtungsstärke positiv auf das Gonadenwachstum auswirkt (vgl. Smith 1978, Wallace 1985)

Auch bei den Weibchen lag der GSI mit 2,4 (Kontrolle) bzw. 4,5 (Abwasser) deutlich unterhalb der Werte vergleichbarer Studien mit einem GSI von 8 – 13 (Ankley et al. 2001, Jensen et al. 2001, Sohoni et al. 2001). Auch bei den beiden vorangegangenen Studien konnten im Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfritze GSI-Werte von 12 – 14 bei den Kontrollen erreicht werden. Auch hier scheint die niedrigere Wassertemperatur für das insgesamt

geringere Gonadenwachstum verantwortlich zu sein. Ferner könnte insbesondere bei den Weibchen die geringere Fütterungsrate (2x täglich statt 4x täglich im Vergleich zu den Laborversuchen) mit für den allgemein geringeren GSI in diesem Versuch verantwortlich sein.

Bei den abwasserexponierten Weibchen konnte jedoch ein rund 90 % höherer GSI im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Der niedrigere GSI bei den Kontrollweibchen, im Vergleich zu den abwasserexponierten Fischen lässt sich zudem mit den Stadien der Follikelreifung korrelieren: Bei den abwasserexponierten weiblichen Dickkopfelritzen konnte eine deutlich schnellere Reifung der Follikel gegenüber den Kontrollen festgestellt werden, was sich in einer höheren Anzahl (rund 90 % mehr) reifer Tertiärfollikel zeigte. Dies könnte möglicherweise mit der höheren Lichtintensität am Kläranlagenstandort zusammenhängen. Jedoch sind die Unterschiede im GSI bei den Weibchen beider Gruppen (Abwasser, Kontrolle) doch deutlich größer als bei den Männchen, so dass hier vielmehr östrogene Effekte durch östrogen aktive Substanzen im Abwasser zu einer Beschleunigung der Gonaden- bzw. Follikelreifung geführt haben könnten.

Aufgrund des stärkeren Gonadenwachstums bei den abwasserexponierten männlichen Dickkopfelritzen wäre eine höhere Anzahl an Tuberkel im Kopfbereich exponierter Fische im Vergleich zur Kontrolle zu erwarten gewesen. Anhand der vorliegenden Daten zeigte sich jedoch, dass die Anzahl der Tuberkel bei den exponierten Männchen bei nur 53 % im Vergleich zur Kontrolle lag. Da sowohl das Gonadenwachstum bzw. die Spermatogenese, als auch die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale wie Tuberkel testosteronabhängig sind (Borg et al. 1986, Olivereau and Olivereau 1985, Smith 1974), lässt sich die Reduktion der Tuberkel bei den abwasserexponierten Dickkopfelritzen auf östrogene Effekte des Kläranlagenabwassers zurückführen. Unter Berücksichtigung des stärkeren Gonadenwachstums bei den abwasserexponierten Männchen sollte die Tuberkelzahl hier über den Werten der Kontrolltiere liegen, da die durchschnittliche Zahl an Tuberkeln bei geschlechtsreifen männlichen Dickkopfelritzen zur Laichzeit zwischen 20 und 25 liegt (Ankley et al. 2001, Smith 1974).

Der erhöhte Plasmavitellogenin-Gehalt bei den exponierten männlichen Dickkopfelritzen deutet ebenfalls auf östrogene Effekte des Abwassers hin. Zwar lag die Induktionsrate im Vergleich zur vorangegangenen Studie mit EE₂ (siehe Kapitel 3.4) hier bei lediglich 83 %, was jedoch auf die Temperaturabhängigkeit der Vitellogeninsynthese zurückzuführen ist (vgl. Korsgaard et al. 1986, MacKay and Lazier 1993, Kapitel 3.1). Dadurch lassen sich trotz der höheren GSI-Werte bei den exponierten Weibchen die niedrigeren Plasmavitellogenin-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle erklären. Dass die Wassertemperatur einen maßgeblichen Einfluss auf die Vitellogeninsynthese hat, zeigt sich insbesondere beim Vergleich der weiblichen Kontrolltiere aller drei durchgeführten Studien: Während bei den vorangegangenen Studien mit EE₂ und MT bei 25 °C Wassertemperatur Plasmavitellogenin-Konzentrationen von rund 10.000 ng/ml gemessen wurden (vgl. Kapitel 3.4 und 3.5), lagen die Plasmavitellogenin-Konzentrationen in der vorliegenden Studie lediglich bei rund 1.800 ng/ml. Daraus lässt sich schließen, dass bei einer angenommenen Wassertemperatur von 25 °C (wie sie im diesem Kläranlagenauslauf jedoch höchst selten vorkommt), deutlich höhere Plasmavitellogenin-Konzentrationen in den exponierten Dickkopfelritzen beiderlei Geschlechts feststellbar sein müssten.

Histologische Untersuchungen der Hoden männlicher Dickkopfelritzen zeigten sowohl in den belasteten, als auch in den Kontrolltieren eine aktive Spermienbildung (Spermiogenese) mit zahlreichen reifen Spermien. Jedoch konnten in den Hoden abwasserbelasteter Fische vereinzelt degenerierte Spermatogonien nach dreiwöchiger Expositionsphase festgestellt werden, welche bei den Kontrollfischen nicht auftraten. Dies deutet auf einen weiteren östrogenen Einfluss des Kläranlagenabwasser auf die Spermatogenese hin.

Mögliche androgene Effekte (vgl. Kapitel 3.5) des Kläranlagenabwassers auf die exponierten Dickkopfelritzen konnten an diesem Standort während des Untersuchungszeitraumes ausgeschlossen werden, da sich bei der Untersuchung beider Geschlechter sowohl morphologisch als auch histologisch keine Vermännlichung weiblicher Fische festgestellt werden konnte. Somit lässt sich auch die Synthese von Plasmavitellogenin in den exponierten Männchen auf rein östrogene Effekte des Abwassers zurückführen.

4. Abschlussdiskussion

4.1 Vergleichbarkeit von Daten aus *In vitro*- und *In vivo*-Biotests und chemischer Analytik

Prinzipiell eignen sich alle in der vorliegenden Arbeit herangezogenen *In situ*- (männliche bzw. juvenile Regenbogenforellen) und *In vitro*-Biotests (Yeast Estrogen Screen, 293 HEK-Zellen, Primärhepatocyten der Regenbogenforelle) zum Nachweis hormoneller Aktivitäten von Umweltwasserproben. Auch lassen sich tendenzielle Unterschiede in der östrogenen Aktivität von Kläranlagenabwässern und Oberflächengewässern (hier Rhein) mit allen untersuchten *In situ*- und *In vitro*-Biotests nachweisen. Es zeigte sich jedoch, dass insbesondere im unteren Grenzbereich der Konzentrationen an östrogen wirksamen Substanzen in Oberflächengewässern z.T. wesentliche Unterschiede im Reaktionsverhalten der untersuchten Biotests bestehen, welche bei isolierter Bewertung zu möglichen Falschaussagen führen können. Chemische Analysen können an dieser Stelle zwar wichtige Anhaltspunkte über die Zusammensetzung der Umweltprobe sowie die Konzentration an östrogen wirksamen Substanzen geben, jedoch lassen sich hierdurch nicht ohne weiteres biologische Wirkungsgrenzen voraussagen. Zudem ist der Einsatz umfangreicher chemischer Analysen aufgrund hoher Kosten für den routinemäßigen Einsatz im Umweltbereich meist nur eingeschränkt möglich. Da gerade im Bereich hormonaktiver Substanzen das Substanzspektrum ausgesprochen groß ist (vgl. Gülden et al 1997), stellen biologische Testsysteme, welche als Summenparameter bestimmte Wirkmechanismen (z.B. östrogene Wirkung) darstellen können, eine wichtige Ergänzung zu chemischen Analytik dar.

Im Hinblick auf die gewonnenen Erkenntnisse wäre daher insbesondere bei der Untersuchung von Oberflächenwasserproben hinsichtlich östrogen wirksamer Substanzen auch im Screening-Bereich ein Einsatz kombinierter *In situ*- und *In vitro*-Biotests mit parallel verlaufender chemischer Analyse zu fordern, da nur dadurch fundierte Aussagen über biologische Wirkungen in Fischen gemacht werden können. Letztendlich können Screeningtests (Yeast Estrogen Screen, 293-ER-Luciferase Assay, Primärhepatocyten, *In situ*-Exposition von Fischen über kurze Zeiträume) nur Hinweise auf östrogene Belastungen geben. Sie können jedoch weiterführende Studien, z.B. Langzeitexposition von Fischen (*in situ* und *in vivo*; Knörr and Braunbeck 2002, Länge et al. 2001, Rodgers-Gray et al. 2001, Schäfers et al. 2000, van den Brandhof et al. 2002) bzw. Untersuchung lokaler Fischpopulationen (vgl. van Aerle et al. 2001) hinsichtlich der Belastung einheimischer Fließgewässer mit hormonwirksamen Substanzen nicht ersetzen.

4.2 Eignung des Gonadal Recrudescence Assays mit der Dickkopfelritze zum Nachweis hormonaktiver Substanzen im Fisch

Anhand zweier hormonaktiver Substanzen aus der Gruppe der Östrogene (17α -Ethinylestradiol, EE₂) bzw. der Androgene (17α -Methyltestosterone, MT) konnte gezeigt werden, dass der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) prinzipiell zum Nachweis hormonaktiver Substanzen geeignet ist. Insbesondere durch die Belastung mit EE₂ konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe dieses Fischtestsystems Nachweisgrenzen (LOECs - lowest observed effective concentrations) im umweltrelevanten Konzentrationsbereich des steroiden Hormons existieren. Diese Nachweisgrenzen gegenüber EE₂ werden auch durch Life Cycle-Experimente mit der Dickkopfelritzen nicht unterschritten (Länge et al. 2001, vgl. Tab. 4.1). Konzentrationen von EE₂, welche im Gonadal Recrudescence Assay lediglich zur Induktion der sogenannten Biomarker wie Vitellogeninsynthese, Reduzierung der Tuberkelzahl bzw. ultrastrukturellen Veränderungen von Leber und Hoden männlicher Dickkopfelritzen führen, beeinflussen bei längerer Belastung der Fischart (z.B. im Full Life Cycle) reproduktionsrelevante Parameter (Ausbleiben der Geschlechtsdifferenzierung bei Männchen, massive Geschlechterverschiebung zugunsten der Weibchen) negativ. Daher kann der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze auch im Bereich der Biomarker (Plasmavitellogenin, Tuberkelzahl, Gonadenhistologie) als wichtiger Hinweis auf reproduktionsrelevante Parameter wie Geschlechterverhältnis und Reproduktionsvermögen (Befruchtungsrates, Eizahl) bei längerfristiger Belastung mit hormonaktiven anthropogenen und natürlichen Substanzen dienen. Auch im Vergleich mit Fischtestsystemen zum Nachweis hormoneller Aktivitäten mit anderen Fischarten wie Zebraquarienfisch (*Danio rerio*) und Japanischer Reiskarpfing (*Oryzias latipes*) lag die Empfindlichkeit des Gonadal Recrudescence Assays mit der Dickkopfelritze unter den LOECs anderer Kurzzeit-Studien (vgl. Tab. 4.1), was seine Eignung gerade im umweltanalytischen Bereich unterstreicht.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten zwar lediglich das steroidale Hormon EE₂ hinsichtlich seiner Wirksamkeit im Gonadal Recrudescence Assays untersucht werden, wodurch die Übertragbarkeit auf andere östrogen wirksame Substanzen wie Estron oder 17β -Estradiol nur bedingt möglich erscheint, weiterführende Untersuchungen zur Anwendbarkeit des Gonadal Recrudescence Assays unter Freilandbedingungen (kommunales Kläranlagenabwasser) zeigten aber, dass auch hier ein EE₂-vergleichbares Reaktionsschema in den Fischen nachgewiesen werden konnte, obwohl es sich hierbei um eine komplexe Umweltprobe handelte. Somit besteht zumindest in diesem Bereich eine eingeschränkte Übertragbarkeit der EE₂-Befunde hinsichtlich östrogenen Effekte in der Dickkopfelritze auf Umweltwasserproben.

Table 4.1. Lowest observed effective concentrations (LOECs) for 17 α -Ethinylestradiol (EE₂) in different fish testing systems using various laboratory fish species

Fish species	Exposition regime	LOEC for EE ₂ [ng/L]	Investigated endpoint	Reference
Fathead minnow, <i>Pimephales promelas</i>	Gonadal recrudescence assay	1	Vitellogenin, amount of tubercles, testes histology; liver ultrastructure	This study
	3 week exposure of juvenile fish	5	Vitellogenin	Zerulla et al. 2002 Panter et al. 2001
	Full life cycle (305 days)	4	Sex ratio, reproduction, vitellogenin	Länge et al. 2001
Zebrafish, <i>Danio rerio</i>	24 day exposure	10	GSI, vitellogenin	van den Belt et al. 2002
	8 day exposure	4	Vitellogenin	Rose et al. 2002
	21 day exposure	2.5	Vitellogenin-mRNA, estrogen receptor-mRNA	Islinger et al. 2002a
Japanese medaka <i>Oryzias latipes</i> , d-rR-strain	Two month	10	GSI, egg production	Scholz and Gutzeit 2000
Japanese medaka <i>Oryzias latipes</i> , wild type	21 day exposure	25	Choriogenin H-mRNA	Islinger et al. 2002b
		85	vitellogenin and estrogen receptor-mRNA	

Die Belastung adulter Dickkopfritzen im Gonadal Recrudescence Assay mit den synthetischen Androgen 17 α -Methyltestosteron (MT) führte hier zu deutlich abweichenden Befunden. Das Auftreten atretischer Follikel (ab 0,1 μ g/L MT) und männchentypischer sekundärer Geschlechtsmerkmale (ab 1 μ g/L MT) bei weiblichen Dickkopfritzen zeigt hier deutliche hormonelle Störungen im weiblichen Fisch. Ein Vergleich mit anderen Studien zur Kurzzeitbelastung von juvenilen und adulten Dickkopfritzen mit MT ist allerdings schwierig, da hier deutlich höhere MT-Konzentrationen eingesetzt wurden (\geq 0,2 mg/L Ankley et al. 2001 bzw. \geq 10 μ g/L Zerulla et al. 2002). Auch liegen bisher keine Angaben zu Langzeitstudien (z.B. Full Life Cycle) bezüglich der Belastung von Dickkopfritzen mit MT vor. Es ist jedoch anzunehmen, dass auch hier möglicherweise populationsrelevante Parameter wie Befruchtungsrates und Eizahl in niedrigeren Konzentrationsbereichen von MT negativ beeinflusst werden könnten, d.h. im Bereich des im Gonadal Recrudescence Assays nachgewiesenen LOECs (0,1 μ g/L MT) liegen könnten. Zudem kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass auch bei niedrigeren MT-Konzentrationen hormonelle Effekte in adulten Dickkopfritzen nachweisbar sein könnten, da der Anteil atretischer Follikel bereits in niedrigsten untersuchten MT-Konzentration bei rund 5 % lag. Ob jedoch in Umweltwasserproben in biologisch relevante Konzentrationen von MT auftreten, kann derzeit nicht beantwortet werden. Zwar ist MT als Bestandteil diverser Hormonpräparate für Frauen nach der Menopause (Adamson et al. 2001,

Hickok et al. 1993, Raisz et al. 1996) bzw. in Anabolika (Kuuranne et al. 2002) verwendet, doch liegen bisher keine Daten zum Auftreten dieser Substanz im Abwasser bzw. Oberflächenwasser vor.

Zwar konnte anhand des Plasmavitellogenin-Gehaltes gezeigt werden, dass auch die Exposition männlicher Fische mit Androgenen (hier MT) zu östrogenen Effekten im Organismus führen kann, dennoch zeigt sich in der Summe der untersuchten Parameter (insbesondere Gonadenhistologie der Weibchen, Ausprägung sekundärer Geschlechtsmerkmale), dass es sich hierbei nicht primär um eine östrogene Wirkung des Androgens handelt, sondern vielmehr stoffwechselphysiologische Prozesse im Organismus für die Natur der Wirkung verantwortlich sind.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass der Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze unter den LOECs der bisher angewandten Kurz- und Langzeittests mit der gleichen Fischart liegt, was möglicherweise auf die bessere Synchronisation der Fische bezüglich der Reproduktionsphase durch eine vorherige künstliche Gonadenruhephase (simulierte Winterperiode) zurückzuführen ist. Diese Ruhephase entspricht zudem wesentlich eher dem natürlichen Rhythmus vieler Fischarten der gemäßigten Klimate. Bisweilen wird bereits in der Sekundärliteratur eine Kühlphase bei verschiedenen einheimischen Fischarten für eine erfolgreiche Reproduktion empfohlen (vgl. Riehl and Baensch 1995). Daher erscheint der Ansatz des Gonadal Recrudescence Assays als wesentlich sinnvoller als eine dauerhafte Haltung der Dickkopfelritzen unter konstanten Sommerbedingungen (vgl. Länge et al. 2001, Miles-Richardson et al. 1999a, Sohoni et al. 2001). Auch die Ermittlung des gonadosomatischen Index (GSI) während der Reproduktionsphase, d.h. bei unkontrolliertem Ablachen erscheint nicht sehr sinnvoll, da insbesondere bei den Weibchen Schwankungen im GSI in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Ablachens von bis zu 40 % nachgewiesen wurden (Jensen et al. 2001). Auch im Bezug auf die Plasmavitellogenin-Konzentration konnten hier Schwankungen von rund 40 % innerhalb der Reproduktionsphase ermittelt werden (Jensen et al. 2001). Durch die getrenntgeschlechtliche Belastung adulter Dickkopfelritzen mit hormonwirksamen Substanzen im Gonadal Recrudescence Assay wird ein unkontrolliertes Ablachen der Fische verhindert. Somit können die natürlichen Schwankungen im GSI und Plasmavitellogenin-Gehalt reduziert werden, was zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber hormonaktiven Substanzen führen kann.

Letztendlich zeigten die vorliegenden Studien mit dem Gonadal Recrudescence Assay eine deutliche Unterscheidung in den Auswirkungen hormonaktiver Substanzen (Östrogen, Androgen) auf die adulten Dickkopfelritzen, so dass hier zumindest eine erste Klassifizierung der Substanzen in bestimmte Wirkungsgruppen möglich erscheint. Zudem konnten die östrogenen Effekte, wie sie in den abwasserexponierten Regenbogenforellen festgestellt wurden, durch den Gonadal Recrudescence Assay mit der Dickkopfelritze bestätigt werden.

4.3 Mögliche Gefährdung einheimischer Fische durch hormonaktive Substanzen kommunaler Kläranlagenabwässer

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein wesentlicher Beitrag zur Risikoabschätzung einheimischer Fischpopulationen durch hormonaktive Substanzen aus kommunalen Kläranlagenabwässern geleistet werden. Während man bisher nicht von einer Gefährdung einheimischer Fische durch östrogen wirksame Substanzen wie 17β -Estradiol und 17α -Ethinylestradiol ausgegangen ist (vgl. Kalbfuss 1997, Schweinfurt et al. 1997), zeigen die Befunde aus der vorliegenden Studie, dass kommunale Kläranlagenabwässer durchaus eine biologisch relevante östrogene Fracht enthalten, welche auch noch in großen Fließgewässern wie dem Rhein nachweisbar ist. So konnten durch kombinierte *In vivo*- und *In situ*-Experimente in den Abwässern beider untersuchten kommunalen Kläranlagen biologisch wirksame Konzentrationen an östrogen aktiven Substanzen festgestellt werden. Diese östrogene Aktivität lässt sich auch noch in großen Fließgewässern wie dem Rhein nachweisen, jedoch in biologisch geringeren Wirkungsbereichen. Auch wenn man der chemischen Analyse aufgrund der einmaligen Messung nur richtungsweisenden Charakter hinsichtlich der östrogenen Belastung mit hormonaktiven Substanzen zuschreiben kann, zeigt dennoch der Vergleich mit Analysendaten anderer Kläranlagenstandorte, dass es sich bei den Messwerten keineswegs um Ausreißer handelt (vgl. Belfroid et al. 1999, Desbrow et al. 1998, Spengler et al. 2000, 2001, Stumpf et al. 1996, Ternes et al. 1999). Vielmehr liegen die Messwerte im unteren Bereich der Vergleichsdaten. Es ist daher anzunehmen, dass auch durch andere Kläranlagenabwässer innerhalb der BRD eine östrogene Fracht in die Vorfluter gelangt, welche im Bereich der biologischen Wirksamkeit auf Fische liegt. Durch *In situ*-Experimente mit adulten Dickkopfelritzen im Kläranlagenabwasser konnte zudem gezeigt werden, dass es sich bei den vorangegangenen Studien mit adulten männlichen Regenbogenforellen nicht um artspezifische Effekte handelt. Vielmehr zeigte sich dadurch, dass auch in der Dickkopfelritze östrogene Einflüsse durch das Kläranlagenabwasser auf Tuberkelzahl und Hodenhistologie nach dreiwöchiger Exposition nachweisbar waren. Vergleicht man diese Befunde mit den Daten aus den EE_2 -Versuchen (Gonadal Recrudescence Assay mit Full Life Cycle, Länge et al. 2001) so erscheint ein Defizit im Reproduktionsvermögen bei längerer bzw. lebenslanger Exposition mit Abwasser durchaus wahrscheinlich. Zwar konnten bei den Studien mit Rheinwasser der Leitung 4 (im Einflussbereich der zweiten kommunalen Kläranlage) keine östrogene Effekte auf die exponierten juvenilen Regenbogenforellen nach zweiwöchiger Exposition festgestellt werden, dennoch zeigten die Befunde aus den *In vitro*-Biotests (Yeast Estrogen Screen, Primärhepatocyten der Regenbogenforelle) doch erstaunlich hohe östrogene Aktivitäten des Rheinwassers im Vergleich zu den beiden Kläranlagenausläufen. Insbesondere bei kleineren Fließgewässern, welche zudem meist mehreren Kläranlagen als Vorfluter dienen, ist das Erreichen biologischer Wirkungsgrenzen für Fische abzusehen. Das auch durch Verdünnungen des Abwassers mit Oberflächenwasser noch immer biologische Wirkungsgrenzen überschritten werden, zeigen die Befunde der *In situ*-Experimente an der zweiten kommunalen Kläranlage: Trotz starker Verdünnungen des Abwassers (insbesondere im März und Mai 2001) konnte in den exponierten männlichen Regenbogenforellen eine Induktion der Vitellogenin-mRNA nach-

gewiesen werden. Ferner zeigten Untersuchungen zu Wildpopulationen von Gründling (*Gobio gobio*, van Aerle et al. 2001) und Rotaugel (*Rutilus rutilus*, Jobling et al. 1998), dass sich hormonelle Fehlentwicklungen der Gonaden auf anthropogene Einflüsse zurückzuführen lassen.

In kleineren Fließgewässern kann es insbesondere während der regenarmen Perioden im Spätsommer zu deutlichen Aufkonzentrierungen des Abwassers im Vorfluter kommen, so dass hier ein östrogenen Einfluss auf Fische nach den bisherigen Befunden sogar als wahrscheinlich anzusehen ist. Zwar existieren bereits fundierte Angaben zum Abbauverhalten diverser steroider Östrogene und anderer hormonwirksamer Substanzen (Jürgens et al. 2002, Klecka et al. 2001), jedoch darf hierbei nicht vergessen werden, dass es sich bei den stofflichen Einträgen in die Gewässer keineswegs um einmalige Ereignisse (vgl. Guillette Jr. et al. 1994, 1995, 1999) handelt sondern vielmehr um periodisch wiederkehrende bzw. kontinuierliche Einleitungsprozesse. Dass hierbei Schwankungen in der hormonellen Belastung kommunaler Kläranlagenabwässer nur bedingt eine Rolle spielen, zeigen Studien von Panter et al. (2000): Hier konnte bei adulten Dickkopfelritzen nach diskontinuierlicher Belastung mit 17 β -Estradiol vergleichbare Plasmavitellogenin-Konzentrationen wie bei kontinuierlich belasteten Tieren festgestellt werden.

Gerade die Versuche mit der Dickkopfelritze im Gonadal Recrudescence Assay zeigen deutlich, wie wichtig es ist, neben der reinen *In vivo*-Messung des scheinbar östrogen-spezifischen Vitellogenins in männlichen Fischen auch weitere Parameter (sowohl *in vivo* als auch *in vitro*) für eine Risikoabschätzung hinsichtlich hormonaktiver Substanzen in Umweltwasserproben heranzuziehen.

Selbst wenn akute hormonelle Einflüsse (Ausbleiben der Reproduktion) auf Fische in Fließgewässern nicht direkt nachweisbar sind, besteht dennoch die Gefahr, dass es aufgrund subletaler hormoneller Belastungen zur Einschränkung der genetischen Vielfalt innerhalb der verschiedenen Fischarten führen kann (vgl. Silbiger et al. 2001). Auch die Resistenz gegenüber verschiedenen Schadstoffen bzw. deren Erblichkeit kann durch die zunehmende Anzahl der Schadstoffe reduziert werden (Klerks and Moreau 2001).

4.4 Weiterführende Schutzmaßnahmen im Hinblick auf hormonaktive Substanzen in der aquatischen Umwelt

Im Hinblick auf die Erfassung hormoneller Aktivitäten von Einzelchemikalien im Fisch wäre aufgrund der bisweilen starken Unterschiede im Reaktionsverhalten verschiedener Fischarten eine Ausweitung auf zumindest zwei Fischarten als sinnvoll anzusehen, um eine eindeutige Identifikation entsprechender Substanzen zu gewährleisten.

Wie bereits zuvor erwähnt, ist zudem auch in Zukunft mit einem östrogenen Einfluss einheimischer Fließgewässer und somit der darin lebenden Fische durch Abwässer häuslicher und industrieller Kläranlagen zu rechnen. Ziel weiterführender Studien muss zunächst eine Risikoabschätzung hinsichtlich der östrogenen Belastung insbesondere kleinerer Fließgewässer

im Einflussbereich kommunaler und industrieller Kläranlagen sein. Ferner ist die Entwicklung geeigneter Verfahren nötig, um hormonwirksame Substanzen aus dem Abwasser zu entfernen (Schiewer 2000). Diese Verfahren müssen nicht nur effektiv, sondern im Hinblick auf ökonomische Gesichtspunkte auch kostengünstig und praktikabel sein.

Letztlich können nur durch diese Schutzmaßnahmen Verunreinigungen von Trink- und Oberflächenwasser durch hormonaktive Substanzen vermieden und so ein wichtiger Beitrag zu einer nachhaltigen Bewirtschaftung im Bereich Trinkwasser und Artenvielfalt geleistet werden.

5. Zusammenfassung

Durch den Eintrag hormonaktiver Substanzen (sogenannter „Endocrine Disruptors“) über Kläranlagenabwässer kann es bei Fischen zu Verschiebungen im Geschlechterverhältnis sowie zu Entwicklungs- und Reproduktionsstörungen kommen. Bisher fehlen ausreichende Informationen bezüglich des Risikos solcher Substanzen auf Fische sowie verbindliche gesetzliche Vorschriften zur Prüfung von Einzelsubstanzen auf hormonelle Aktivität. Vielfach werden *In vitro*-Tests zum Nachweis hormoneller Aktivität von Einzelsubstanzen und Umweltwasserproben herangezogen, es fehlen jedoch vergleichbare Daten aus *In vivo*-Versuchen.

Durch die vorliegende Arbeit sollte ein Beitrag zur Aufklärung der Belastung einheimischer Fische mit hormonell, insbesondere östrogen aktiven Substanzen geleistet werden. Hierzu wurden zunächst zwei *In vitro*-Biotests (Yeast Estrogen Screen – YES; Primärhepatocyten der Regenbogenforelle, *Oncorhynchus mykiss*) hinsichtlich ihrer Eignung im Bereich der Umweltanalysen optimiert. In Kombination mit einem weiteren, bereits erprobten *In vitro*-Biotest (293 ER-Luciferase Assay) wurden diese dann mit Daten aus *In situ*-Experimenten mit Regenbogenforellen an drei Standorten (Kläranlage 1 + 2, sowie Rhein bei Worms) und chemischer Analytik korreliert. Um dem Mangel an geeigneten *In vivo*-Nachweissystemen im Bereich der Fischtests entgegenzuarbeiten, wurde parallel hierzu ein Fischtestsystem mit der Dickkopfelritze, *Pimephales promelas* (Gonadal Recrudescence Assay) zum Nachweis hormonell aktiver Substanzen in Fischen anhand zweier Referenzchemikalien (Östrogen: 17 α -Ethinylestradiol; Androgen: 17 α -Methyltestosteron) überprüft. Hierbei macht man sich das natürliche Reproduktionsverhalten der Fische gemäßigter Klimate zu Nutze, indem man die adulten Dickkopfelritzen zunächst für mindestens 4 Wochen unter Winterbedingungen (15 °C Wassertemperatur, 8:16 h Tag:Nacht-Rhythmus) hält, was zu einer Inaktivierung der Fortpflanzung und somit auch der Gonadenreifung führt. Anschließend werden die Fische für drei Wochen unter Sommerbedingungen (25 °C WT, 16:8 h Tag-Nacht-Rhythmus) mit hormonaktiven Substanzen belastet, um deren Einfluss auf verschiedene hormonabhängige Parameter wie Kondition, Gonadenwachstum, sekundäre Geschlechtsmerkmale, Plasmavitellogenin, Fortpflanzung, Befruchtungsrate und Eizahl sowie Gonadenhistologie und Leberultrastruktur der Fische zu untersuchen. Um die Anwendbarkeit dieses Fischtestsystems im Umweltanalysebereich zu demonstrieren, erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine abschließende Exposition der Dickkopfelritzen im Kläranlagenabwasser einer kommunalen Kläranlage.

Durch die Erhöhung der Inkubationstemperatur von 14 auf 18 °C konnte die Empfindlichkeit der Primärhepatocyten gegenüber den östrogen aktiven Substanzen 17 β -Estradiol (E₂), Bisphenol A und Nonylphenol erhöht werden. Der YES konnte für den Nachweis östrogenen Aktivität in extrahierten Umweltwasserproben adaptiert werden. Die zweiwöchige *In situ*-Exposition adulter männlicher Regenbogenforellen im Kläranlagenabwasser führte an beiden Standorten zu einer deutlichen Induktion der Vitellogenin-mRNA. Auch in den *In vitro*-Biotests war die östrogene Aktivität des Abwassers nachzuweisen. Am Rhein war keine Vitellogenin-mRNA-Synthese in den exponierten Fischen festzustellen, jedoch zeigten die *In*

vitro-Biotests, dass auch hier ein östrogenes Potential vorhanden war. Chemische Analysen belegen die biologischen Befunde. So lagen die gemessenen Konzentrationen an steroiden Östrogenen (bis zu 26,6 ng/L) und Fecal- und Phytosteroiden, sowie der resorcyclischen Lactone und Flavonoide (bis zu 1.194 ng/L) im Kläranlagenabwasser deutlich im biologisch wirksamen Bereich. Auch im Rheinwasser lag die Konzentration an steroiden Östrogenen mit 3,9 ng/L (E_2) im noch biologisch relevanten Bereich.

Im Testsystem mit der Dickkopfeleritze ergab die Belastung mit 17α -Ethinylestradiol (EE_2) Nachweisgrenzen von 1 ng/L (Effekte auf Tuberkelzahl, Plasmavitellogenin, Gonadenhistologie und Leberultrastruktur), welche im Bereich eines Full Life Cycles mit der gleichen Fischart lagen und sich zugleich deutlich im umweltrelevanten Konzentrationsbereich von EE_2 befanden. Ab 10 ng/L EE_2 sank sowohl die Befruchtungsrate als auch die durchschnittliche Eizahl pro Gelege aufgrund unzureichender Spermienproduktion deutlich ab. Die Belastung der Fische mit 17α -Methyltestosteron (MT) führte bei den Weibchen ab 0,1 μ g/L zum Auftreten atretischer Follikel. Ab 5 μ g/L MT zeigte sich ein signifikanter Rückgang in der Befruchtungsrate. Bei den Männchen erfolgte ab 1 μ g/L MT ein Anstieg des Plasmavitellogenin-Gehalts, was auf eine Biotransformation des Androgens in ein Östrogen zurückzuführen sein dürfte. Aufgrund der untersuchten Endpunkte in den exponierten Fischen war jedoch eine deutliche Unterscheidung hinsichtlich androgener und östrogenen Effekte durch die jeweiligen Substanzen möglich. Auch unter Freilandbedingungen konnte mit Hilfe des Fischtestsystems an einem Kläranlagenablauf ein östrogenen Einfluss auf die Fische festgestellt werden (reduzierte Tuberkelzahl, Anstieg im Plasmavitellogenin-Gehalt, nekrotische Spermatogonien bei Männchen sowie schnellere Gonadenreifung bei den Weibchen), welcher bei entsprechender Langzeitbelastung reproduktionsbiologische Auswirkungen auf die Fische haben kann.

Durch die vorliegende Arbeit konnte anhand kombinierter Freiland- und Laboruntersuchungen gezeigt werden, dass kommunale Kläranlagenabwässer biologisch relevante Konzentrationen an östrogen wirksamen Substanzen enthalten, welche selbst in Oberflächengewässern noch nachweisbar sind. Ferner konnte die Eignung des Gonadal Recrudescence Assays mit der Dickkopfeleritze sowohl im labortechnischen Bereich zur Identifizierung hormonaktiver Einzelsubstanzen, als auch im Umweltanalysebereich zum Nachweis hormoneller Aktivitäten von Wasserproben belegt werden.

6. Literatur

- Adamson, D.L., Webb, C.M., Collins, P. (2001) Esterified estrogens combined with methyltestosterone improve emotional well-being in postmenopausal women with chest pain and normal coronary angiograms. *Menopause* 8: 233-238.
- Afonso, L.O., Iwama, G.K., Smith, J., Donaldson, E.M. (1999) Effects of the aromatase inhibitor fadrozole on plasma sex steroid secretion and ovulation rate in female coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, close to final maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 221-229.
- Alcamo, J., Hendrichs, T., Rösch, T. (2000) World Water in 2025. Kassel World Water Series - University of Kassel/Center for Environmental Systems Research Report No 2: 1-48.
- Anderson, M.J., Olsen, H., Matsumura, F., Hinton, D.E. (1996) *In vivo* modulation of 17 β -estradiol-induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by β -naphthoflavone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137: 2210-2218.
- Anglade, I., Douard, V., Le Jossic-Corcous, C., Mananos, E.L., Mazurais, D., Michel, D., Kah, O. (1998) The GABAergic system: A possible component of estrogenic feedback on gonadotropin secretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin de Francais Peche and de la Pisciculture* 647-654.
- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Makynen, E.A. (2001) Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Tox. Chem.* 20: 1276-1290.
- Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E.A., Leino, R.L. (2002) Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 67: 121-130.
- Ankley, G.T., Mihaich, E., Nimrod, A., Stahl, R., Tillitt, D., Colborn, T., McMaster, S., Miller, R., Bantle, J., Campbell, P., Denslow, N., Dickerson, R., Folmar, L., Fry, M., Giesy, L., Gray, L.E., Guiney, P., Hutchinson, T., Kennedy, S., Kramer, V., LeBlanc, G., Mayes, M., Patino, R., Peterson, R., Purdy, R., Ringer, R., Thomas, P., Touart, L., Van der Kraak, G. (1998) Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-)estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Tox. Chem.* 17: 68-87.
- Arnold, S.F., Robinson, M.K., Notides, A.C., Guillette Jr., L.J., McLachlan, J.A. (1996) A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 104: 544-548.
- Balguer, P., Francois, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.-M., Pons, M., Nicolas, J.-C., Casellas, C. (1999) Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* 233: 47-56.
- Barrett-Connor, E., Young, R., Notelovitz, M., Sullivan, J., Wiita, B., Yang, H.M., Nolan, J. (1999) A two-year, double-blind comparison of estrogen-androgen and conjugated estrogens in surgically menopausal women. Effects on bone mineral density, symptoms and lipid profiles. *J. Reprod. Med.* 44: 1012-1020.
- Bätscher, R., Studer, C., Fent, K. (1999) Stoffe mit endokriner Wirkung in der Umwelt. Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwassereinigung und Gewässerschutz (EAWAG) und Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), 258 pp.
- Bayley, M., Nielsen, J.R., Baatrup, E. (1999) Guppy sexual behavior as an effect biomarker of estrogen mimics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43: 68-73.
- Belaid, M., Richard-Mercier, N., Pieau, C., Dorizzi, M. (2001) Sex reversal and aromatase in the european pond turtle: Treatment with letrozole after the thermosensitive period for sex determination. *J. Exp. Zool.* 290: 490-497.
- Belfroid, A.C., Van der Horst, A., Vethaak, A.D., Schäfer, A.J., Rijs, G.B.J., Wegener, J., Cofino, W.P. (1999) Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci. Total Environ.* 225: 101-108.
- Beresford, N., Routledge, E.J., Harris, C.A., Sumpter, J.P. (2000) Issues arising when interpreting results from an *in vitro* assay for estrogenic activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162: 22-33.

- Bergeron, J.M., Crews, D., McLachlan, J.A. (1994) PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ. Health Perspect.* 102: 780-781.
- Birnbaum, L.S. (1995) Developmental effects of dioxins. *Environ. Health Perspect.* 103: 89-94.
- Borg, B., Paulson, G., Peute, J. (1986) Stimulatory effects of methyltestosterone on pituitary gonadotropic cells and testes leydig cells of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., in winter. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62: 54-61.
- Braunbeck, T. (1993) Entwicklung von Biotestverfahren mit Zellkulturen aus Fischen und Mollusken zum Nachweis letaler und subletaler Schäden von Organismen durch Umweltschadstoffe im Wasser. *PAÖ 7*: 537-559.
- Braunbeck, T., Arnold, H., Bauer, I., Briese, I., Hauck, C., Hollert, H., J., H., Islinger, M., Müller, F., Zahn, T. (1995a) Zelltests in der Ökotoxikologie. Cytotoxizitätstests mit Zellkulturen aus Fischen als Alternative und Ergänzung zu konventionellen Fischtests. *PAÖ*, 1-204.
- Braunbeck, T., Berbner, T., Bieberstein, U., Erdinger, L., Geier, V., Hollert, H., Leist, E., Rahmann, N. and Zipperle, J. (1995b) Toxikologische und ökotoxikologische Untersuchung und Bewertung verschiedener Kompartimente in Fließgewässern mit Hilfe eines mehrstufigen Prüfsystems mit Zellkulturen aus Fischen. *PAÖ 12*: 345-958.
- Braunbeck, T., Müller, F. (1991) Isolierte Hepatocyten und Dauerzelllinien aus Fischen im Cytotoxizitätstest - eine Alternative zur Fischleberzelle *in vivo*? *Verh. Dtsch. Zoolog. Gesell.* 84: 496-497.
- Bulder, A.S., Wetser, P.W., van de Ven, L., van den Brandhof, E.J., van Beusekom, S.A.M., Folkerts, A.J., Traas, T.P., Canton, J.H. (2000) A partial life cycle (PLC) test in zebrafish for measuring reproduction effects of (xeno-)estrogens. Third SETAC World Conference Brighton, U.K., 21 - 25 May.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E. (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit. Med. J.* 305: 609-613.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.K. (1995) Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer: Is there a common cause? *Environ. Health Perspect.* 103: 137-139.
- Carlson, A.R., Kosian, P.A. (1987) Toxicity of chlorinated benzenes to fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16: 129-135.
- Chapin, R.E., Delaney, J., Wang, Y., Lanning, L., Davis, B., Collins, B., Mintz, N., Wolfe, G. (2000) The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. *Toxicol. Sci.* 52: 80-91.
- Christensen, L.J., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (1999) The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. *Aquat. Toxicol.* 46: 211-219.
- Christiansen, L.B., Pedersen, K.L., Pedersen, S.N., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2000) *In vivo* comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system. *Environ. Tox. Chem.* 19: 1867-1874.
- Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M. (1993) Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101: 378-384.
- Coldham, N.G., Dave, M., Sivapathasundaram, S., McDonnell, D.P., Connor, C., Sauer, M.J. (1997) Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ. Health Perspect.* 105: 734-742.
- Cook, J.C., Kaplan, A.M., Davis, L.G., O'Connor, J.C. (1997) Development of a Tier I screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 26: 60-68.
- Cooper, R.L., Stoker, T.E., Goldman, J.M., McElroy, W.K. (2000) Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol. Sci.* 53: 297-307.
- Couse, J.F., Lndzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.-A., Korach, K.S. (1997) Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinol.* 138: 4613-4621.
- Crews, D., Wibbels, T., Gutzke, W.H. (1989) Action of sex steroid hormones on temperature-induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 76: 159-166.
- Danzo, B.J. (1997) Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ. Health Perspect.* 105: 294-301.

- Desaiah, D., Cutkomp, L.K., Koch, R.B., Jarvinen, A. (1975) DDT: effect of continuous exposure on ATPase activity in fish, *Pimephales promelas*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 3: 132-141.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M. (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. Environ. Sci. Techn. 32: 1549-1558.
- Desvages, G. and Pieau, C. (1991) Steroid metabolism in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 39: 203-213.
- Diehl, P., Kiefer, M., Lauer, A., Kolland, I. Helbig, S. (1998) Tätigkeitsbericht 1998: Teil 1 Arbeitsbericht. Rheingütestation Worms im Landesamt für Wasserwirtschaft Rheinland-Pfalz.
- Dill, D.C., Murphy, P.G., Mayes, M.A. (1987) Toxicity of methylene chloride to life stages of the fathead minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 39: 869-876.
- Dodge, J.A., Glasebrook, A.L., Magee, D.E., Phillips, D.L., Sato, S., Short, L.L., Bryant, H.U. (1996) Environmental estrogens: Effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 59: 155-161.
- Donohoe, R.M., Curtis, L.R. (1996) Estrogenic activity of chlordecone, *o,p'*-DDT and *o,p'*-DDE in juvenile rainbow trout: induction of vitellogenesis and interaction with hepatic estrogen binding sites. Aquat. Toxicol. 36: 31-52.
- Dubé, M.G., MacLachy, D.L. (2001) Identification and treatment of a waste stream at a bleached-kraft pulp mill that depressed a sex steroid in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). Environ. Tox. Chem. 20: 985-995.
- Feldman, D., Krishnan, A. (1995) Estrogens in unexpected places: possible implications for researchers and consumers. Environ. Health Perspect. 103: 129-133.
- Field, J.A., Reed, R.L. (1996) Nonylphenol polyethoxy carboxylate metabolites of nonionic surfactants in U.S. paper mill effluents, municipal sewage treatment plant effluents, and river waters. Environ. Sci. Techn. 30: 3544-3550.
- Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Valotaire, Y. (1995) Influence of xenobiotics in rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. J. Mol. Endocrinol. 15: 143-151.
- Flouriot, G., Pakdel, F., Valotaire, Y. (1996) Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. Mol. Cell. Endocrinol. 124: 173-183.
- Flouriot, G., Vaillant, C., Salbert, G., Pelissero, C., Guiraud, J.M., Valotaire, Y. (1993) Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long-term and stable liver-specific expression in aggregates. J. Cell Sci. 105: 407-416.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, A., Enblom, J., Marcino, J., Guillette Jr., L.J. (1996) Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. Environ. Health Perspect. 104: 1096-1101.
- Fry, D.M., Toone, C.K. (1981) DDT-induced feminization of gull embryos. Science 213: 922-924.
- Garner, C.E., Jefferson, W.N., Burka, L.T., Matthews, H.B., Newbold, R.R. (1999) In vitro estrogenicity of the catechol metabolites of selected polychlorinated biphenyls. Toxicol. Appl. Pharmacol. 154: 188-197.
- Giesy, J.P., Pierens, S.L., Snyder, E.M., Miles-Richardson, S., Kramer, V.J., Snyder, S.A., Nichols, K.M., Villeneuve, D.A. (2000) Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environ. Tox. Chem. 19: 1368-1377.
- Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, A.G.M., Bowmer, T. (1998) Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. Aquat. Toxicol. 43: 77-92.
- Giwerzman, A., Carlsen, E., Keiding, N., Skakkebaek, N.E. (1993) Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review. Environ. Health Perspect. 101: 65-72.
- Gray, J.L.E. (1998) Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. Toxicol. Letters 102-103: 677-680.
- Gray, M.A. (1999) Factors affecting the development of testis-ova in medaka, *Oryzias latipes*, exposed to octylphenol. Environ. Tox. Chem. 18: 1835-1842.
- Gray, M.A., Metcalfe, C.D. (1997) Induction of testis-ova in japanses medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. Environ. Tox. Chem. 16: 1082-1086.

- Guillette Jr., L.J., Crain, D.A., Rooney, A.A., Pickford, D.B. (1995) Organisation versus activation: The role of endocrine-disrupting contaminations (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ. Health Perspect.* 103: 157-164.
- Guillette Jr., L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.P., Woodward, A.R. (1994) Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and controlled lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* 102: 680-688.
- Guillette Jr., L.J., Woodward, A.R., Crain, D.A., Pickford, D.B., Rooney, A.A., Percival, H.F. (1999) Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven Florida lakes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116: 356-372.
- Gülden, M., Turan, A., Seibert, H. (1997) Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit - Wasserwirtschaft, 1-362 pp.
- Gunatilleka, A.D. and Poole, C.F. (1999) Models for estimating the non-specific aquatic toxicity of organic compounds. *Anal. Commun.* 36: 235-242.
- Hale, R.C., Smith, C.L., De Fur, P.O., Harvey, E., Bush, E.O. (2000) Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls. *Environ. Tox. Chem.* 19: 946-952.
- Harries, C.A., Henttu, P., Parker, M.G., Sumpter, J.P. (1997a) The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ. Health Perspect.* 105: 802-811.
- Harries, J.E., Janbakhsh, A., Jobling, S., Matthiessen, P., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. (1999) Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. *Environ. Tox. Chem.* 18: 932-937.
- Harries, J.E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C.A., Maddix, S., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. (2000) Development of a reproductive performance for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 34: 3003-3011.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E.J., Rycroft, R., Sumpter, J.P., Tyler, T. (1996) A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Tox. Chem.* 15: 1993-2002.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Tyler, T., Zaman, N. (1997b) Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Tox. Chem.* 16: 536-542.
- Hauck, C., Zahn, T., Braunbeck, T. (1993) Zellkulturen aus der Leber der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) und ihre Fähigkeit zur Bio-transformation. *Verh. Dtsch. Zoolog. Gesell.* 86: 190.
- Hickok, L.R., Toomey, C., Speroff, L. (1993) A comparison of esterified estrogens with and without methyltestosterone: effects on endometrial histology and serum lipoproteins in postmenopausal women. *Obstet Gynecol.* 82: 919-924.
- Huang, C.-H., Sedlak, D.L. (2001) Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gaschromatography/tandem mass spectrometry. *Environ. Tox. Chem.* 20: 133-139.
- Islinger, M., Pawlowski, S., Braunbeck, T. (1999a) Vitellogenin als Marker für östrogen wirksame Stoffe im Wasser. *ATV* 15: 125-152.
- Islinger, M., Pawlowski, S., Hollert, H., Völkl, A., Braunbeck, T. (1999b) Measurement of vitellogenin-mRNA in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection assay. *Sci. Total Environ.* 233: 109-122.
- Islinger, M., Willimski, D., Völkl, A., Braunbeck, T. (2002a) Gene expression of estrogen-regulated genes associated with reproduction after exposure to 17 α -ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* in press.
- Islinger, M., Yuan, H., Völkl, A., Braunbeck, T. (2002b) Measurement of vitellogenin gene expression by RT-PCR as a tool to identify endocrine disruption in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Biomarkers* 7: 80-93.
- Jenkins, R., Angus, R.A., McNatt, H., Howell, W.M., Kempainen, J.A., Kirk, M., Wilson, E.M. (2001) Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. *Environ. Tox. Chem.* 20: 1325-1331.
- Jensen, K.M., Korte, J.J., Kahl, M.D., Pasha, M.S., Ankley, G.T. (2001) Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 128: 127-141.

- Jobling, S. (1998) Review of suggested testing methods for endocrine-disrupting chemicals. *Pure Appl. Chem.* 70: 1805-1827.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P. (1998) Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2498-2506.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P. (1995) A variety of environmental persistent chemicals, including some phthalate plasticizers are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103: 582-587.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P. (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Tox. Chem.* 15: 194-202.
- Jobling, S., Sumpter, J.P. (1993) Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study, using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 27: 361-372.
- Johnson, A.C., Sumpter, J.P. (2001) Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4697-4703.
- Johnson, A.C., White, C., Jürgens, M.D., Williams, R.J., Holthaus, K., Rae, J.E. (2000) Fate and behaviour of oestradiol in river water. Third SETAC World Conference Brighton, U.K., p.
- Jürgens, M.D., Holthaus, K.I.E., Johnson, A.C., Smith, J.J.L., Hetheridge, M., Williams, R.J. (2002) The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers. *Environ. Tox. Chem.* 21: 480-488.
- Kalbfuss, W. (1997) Belastung bayerischer Gewässer durch synthetische Östrogene. In: Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, I.f.W.E.M. (eds.) Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser. R. Oldenbourg Verlag GmbH, München, Germany, pp. 31-38.
- Karnovsky, M.J. (1971) Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 51: 146A.
- Katzenellenbogen, B.S., Bhardwaj, B., Fang, H., Ince, B.A., Pakdel, F., Reese, J.C., Schodin, D., Wrenn, C.K. (1993) Hormone binding and transcription activation by estrogen receptors: analysis using mammalian and yeast systems. *J. Steroid Biochem.* 47: 39-48.
- Klecka, G.M., Gonsior, S.J., West, R.J., Goodwin, P.A., Markham, D.A. (2001) Biodegradation of bisphenol A in aquatic environments: river die-away. *Environ. Tox. Chem.* 20: 2725-2735.
- Klerks, P., Moreau, C.J. (2001) Heritability of resistance to individual contaminants and to contaminant mixtures in the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environ. Tox. Chem.* 20: 1746-1751.
- Knörr, S., Bieberstein, U., Schwaiger, J., Negele, R.D., Braunbeck, T. (2000) Effects of nonylphenol on medaka (*Oryzias latipes*) in a full life-cycle experiment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* submitted.
- Knörr, S., Braunbeck, T. (2000) Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in a life cycle test with the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Third SETAC World Conference Brighton, U.K., 21 - 25 May.
- Knörr, S., Braunbeck, T. (2002) Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51: 187-196.
- Knudsen, F.R., Pottinger, T.G. (1999) Interaction of endocrine disrupting chemicals, singly and in combination, with estrogen-, androgen-, and corticosteroid-binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 44: 159-170.
- Koban, M. (1986) Can cultured teleost hepatocytes show temperature acclimation? *Am. J. Physiol. Reg. Integrat. Comp. Physiol.* 250: R211-R220.
- Kolanczyk, R., Schmieder, P., Bradbury, S., Spizzo, T. (1999) Biotransformation of 4-methoxyphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic microsomes. *Aquat. Toxicol.* 45: 47-61.
- Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempfer, C., Metzger, J., Hagenmaier, H. (1999) Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci. Total Environ.* 225: 33-48.
- Korsgaard, B., Mommsen, T.P., Saunders, R.L. (1986) The effect of temperature on the vitellogenin response in Atlantic Salmon post-smolts (*Salmo salar*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 62: 193-201.
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D. (1993) Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinol.* 122: 2279-2286.

- Kuch, H.M., Ballschmiter, K.-H. (2000) Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366: 392-395.
- Kuch, H.M., Ballschmiter, K.-H. (2001) Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3201-3206.
- Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.A. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.* 139: 4252-4263.
- Kuوران, T., Aitio, O., Vahermo, M., Elovaara, E., Kostiaainen, R. (2002) Enzyme-assisted synthesis and structure characterisation of glucuronide conjugates of methyltestosterone (17 α -methylandrosta-4-en-17 β -ol-3-one) and nadrolone (estr-4-en-17 β -ol-3-one) metabolites. *Bioconjugate Chem.* 13: 194-199.
- Länge, R., Hutchinson, T.H., Croudace, C., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G.H., Sumpter, J.P. (2001) Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol over the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Tox. Chem.* 20: 1216-1227.
- Larsson, D.G.J., Hällman, H., Förlin, L. (2000) More male fish embryos near a pulp mill. *Environ. Tox. Chem.* 19: 2911-2917.
- Larsson, D.G.J., Kinnberg, K., Sturve, J., Stephensen, E., Skön, M., Förlin, L. (2002) Studies of masculinisation, detoxification, and oxidative stress responses in Guppies (*Poecilia reticulata*) exposed to effluent from a pulp mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52: 13-20.
- Leblond, V.S., Bisson, M., Hontela, A. (2001) Inhibition of cortisol secretion in dispersed head kidney cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by endosulfan, an organochloride pesticide. *Gen. Comp. Endocrinol.* 121: 48-56.
- Lester, S.M., Braunbeck, T.A., Teh, S.J., Stegeman, J.J., Miller, M.R., Hinton, D.E. (1993) Hepatic cellular distribution of cytochrome P-450 1A1 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), an immunohisto- and cytochemical study. *Cancer Res.* 53: 3700-3706.
- MacKay, M.E., Lazier, C.B. (1993) Estrogen responsiveness of vitellogenin gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kept at different temperatures. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89: 225-226.
- MacKay, M.E., Raelson, J., Lazier, C.B. (1996) Up-regulation of estrogen receptor mRNA and estrogen receptor activity by estradiol in liver of rainbow trout and other teleostian fish. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 115c: 201-209.
- Maitre, J.L., Valotaire, Y., Guguen-Guillouzo, C. (1986) Estradiol-17 β stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Animal* 22: 337-343.
- Makarevich, A., Sirotkin, A., Taradajnik, T., Chrenek, P. (1997) Effects of genistein and laven-dustin on reproductive processes in domestic animals *in vitro*. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 63: 319-337.
- Mäkelä, S., Santti, R., Salo, L., McLachlan, J.A. (1995) Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environ. Health Perspect.* 103: 123-127.
- Makynen, E.A., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Tietge, J.E., Wells, K.L., Van der Kraak, G., Ankley, G.T. (2000) Effects of the mammalian antiandrogen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 48: 461-475.
- Matthiesen, P., Gibbs, P. (1997) Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Tox. Chem.* 17: 37-43.
- Meerts, I.A.T., Letcher, R.J., Hoving, S., Marsh, G., Bergman, A., Lemmen, J.G., van der Burg, B., Brouwer, A. (2001) *In vitro* estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydrocylated PBDEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ. Health Perspect.* 109: 399-407.
- Mellanen, P., Petänen, T., Lehtimäki, J., Mäkelä, S., Bylund, G., Hombolm, B., Mannila, E., Oikari, A., Santti, R. (1996) Wood-derived estrogens, studies *in vitro* with breast cancer cell lines and *in vivo* in trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 136: 381-388.
- Metcalf, C.D., Metcalfe, T.L., Kiparissis, Y., Koenig, B.G., Khan, C., Hughes, R.J., Croley, T.R., March, R.E., Potter, T. (2001) Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with

- japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environ. Tox. Chem. 20: 297-308.
- Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P. (1999a) Effects of waterborne exposure of 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47: 129-145.
- Miles-Richardson, S.R., Pierens, S.L., Nichols, K.M., Kramer, V.J., Snyder, E.M., Snyder, S.A., Render, J.A., Fitzgerald, S.D., Giesy, J.P. (1999b) Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environ. Res. 80: S122-S137.
- Miller, S.C., Bottema, C.D.K., Stathis, P.A., Tokés, L.G., Feldman, D. (1986) Unexpected presence of estrogens in culture medium supplements: subsequent metabolism by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Endocrinol. 119: 1362-1369.
- Milligan, S.R., Khan, O., Nash, M. (1998) Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. Gen. Comp. Endocrinol. 112: 89-95.
- Morales, M.H., Baerga-Santini, C., Cordero-López, N. (1996) Synthesis of vitellogenin polypeptides and deposit of yolk proteins in *Anolis pulchellus*. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 114B: 225-231.
- Mouchel, N., Trichet, V., Betz, A., Le Pennec, J.P., Wolff, J. (1996) Characterisation of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gene 174: 59-64.
- Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Boechler, M., Welshons, W.V. (1997) Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative *in vivo* biocativity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. Environ. Health Perspect. 105: 70-76.
- Nakamura, M. (1994) A study to susceptibility of sex reversal after a single 2-h treatment of androgen in amago salmon. Fisheries Sci. 60: 483-483.
- Nath, P., Sundaraj, B.I. (1981) Isolation and identification of female specific serum lipophosphoprotein (vitellogenin) in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Gen. Comp. Endocrinol. 43: 184-190.
- Newsome, L.D., Johnson, D.E., Lipnick, R.L., Broderius, S.J., Russom, C.L. (1991) A QSAR study of the toxicity of amines to the fathead minnow. Sci. Total Environ. 109-110: 537-551.
- Nimrod, A.C., Benson, W.H. (1996) Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. Crit. Rev. Toxicol. 26: 335-364.
- Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pefraza, V., Soto, A.M., Sonnenschein, C. (1996) Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. Environ. Health Perspect. 104: 298-305.
- Olivereau, M., Olivereau, J. (1985) Effect of 17 α -methyltestosterone on the skin and gonads of freshwater male silver eels. Gen. Comp. Endocrinol. 57: 64-71.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Trant, J.M., Cajaraville, M.P. (2002) Effects of selected xenoestrogens on zebrafish development and reproduction. 12th Annual Meeting of SETAC Europe Vienna, Austria, p.
- Panter, G.H., Hutchinson, T.H., Länge, R., Lye, C.M., Sumpter, J.P., Zerulla, M., Tyler, C.R. (2002) Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti)-estrogenic substances. Environ. Tox. Chem. 21: 319-326.
- Panter, G.H., Thompson, R.S., Sumpter, J.P. (1998) Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. Aquat. Toxicol. 42: 243-253.
- Panter, G.H., Thompson, R.S., Sumpter, J.P. (2000) Intermittent exposure of fish to estradiol. Environ. Sci. Techn. 34: 2756-2760.
- Papoulias, D.M., Noltie, D.B., Tillitt, D.E. (1999) An *in vivo* model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: exposure to ethinyl estradiol. Aquat. Toxicol. 48: 37-50.
- Pelissero, C., Flouriot, G., Foucher, J.L., Bennetau, B., Dunoguès, J., Le Gac, F., Sumpter, J.P. (1993) Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 44: 263-272.
- Peter, R.E. (1981) Gonadotropin secretion during reproductive cycles in teleosts: influences of environmental factors. Gen. Comp. Endocrinol. 45: 294-305.
- Peute, J., R., H., van Oordt, P.G.W.J. (1985) Quantitative analysis of estradiol-17 β -induced changes in

- the ultrastructure of the liver of the male zebrafish, *Brachydanio rerio*. Cell. Tiss. Res. 242: 377-382.
- Peute, J., van der Gaag, M.A., Lambert, J.G.D. (1978) Ultrastructure and lipid content of the liver of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, related to vitellogenin synthesis. Cell. Tiss. Res. 186: 297-308.
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P. (1994) Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. Chem. Ecol. 8: 275-285.
- Raisz, L.G., Wiita, B., Artis, A., Bowen, A., Schwartz, S., Trahiotis, M., Shoukri, K., Smith, J. (1996) Comparison of the effects of estrogen alone and estrogen plus androgen on biochemical markers of bone formation and resorption in postmenopausal women. J. Clin. Endocrinol. Metab. 81: 37-43.
- Rathner, M., Sonneborn, M. (1979) Biologisch wirksame Östrogene in Trink- und Abwasser. Forum Städte-Hygiene 30: 45-47.
- Ren, L., Lattier, D., Lech, J.J. (1996a) Estrogenic activity in rainbow trout determined with a new cDNA probe for vitellogenesis, pSG5Vg1.1. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56: 287-294.
- Ren, L., Lewis, S.K., Lech, J.J. (1995) Effects of estrogen and nonylphenol on the post-transcriptional regulation of vitellogenin gene expression. Chem. Biol. Interact. 100: 67-76.
- Ren, L., Meldahl, A., Lech, J.J. (1996b) Dimethyl formamide DMFA and ethylene glycol EG are estrogenic in rainbow trout. Chem. Biol. Interact. 102: 63-67.
- Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208-212.
- Richardson, K.C., Jarett, L., Finke, E.H. (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. Stain Technol. 35: 313-323.
- Riehl, R., Baensch, H.A. (1995) Aquarien Atlas. MERGUS Verlag für Natur- und Heimtierkunde, 992.
- Rinchar, J., Dabrowski, K., Garcia-Abiado, M.A., Ottobre, J. (1999) Uptake and depletion of plasma 17 α -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: Effect on plasma steroids and sex reversal. Steroids 64: 518-525.
- Rodgers-Gray, T.P., Jobling, S., Kelly, C., Morris, S., Brighty, G., Waldock, M.J., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. (2001) Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. Environ. Sci. Technol. 35: 462-470.
- Rodgers-Gray, T.P., Jobling, S., Morris, S., Kelly, C., Kirby, S.J., Janbakhsh, A., Harries, J.E., Waldock, M.J., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. (2000) Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. Environ. Sci. Technol. 34: 1521-1528.
- Rose, J., Holbech, H., Loindholst, C., Norum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2002) Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 131: 531-539.
- Rossini, G.P., Malaguti, C. (1995) Steroid hormones and temperature induce changes of binding parameters of their receptors in intact cells. FEBS Letters 376: 151-154.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P. (1998) Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. in vivo responses in trout and roach. Environ. Sci. Technol. 32: 1559-1565.
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P. (1996) Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Environ. Tox. Chem. 15: 241-248.
- Schäfers, C., Schmitz, A., Böhmer, W., Wenzel, A. (2000) Multigeneration study with ethinylestradiol: environmental concentrations affect reproduction in fish. Third SETAC World Conference Brighton, U.K., 21 - 25 May.
- Schiewer, S. (2000) Endokrinwirksame Substanzen - Membrantechnische und biologische Strategien zur Vermeidung von Umweltbelastung durch hormonell wirksame Stoffe im Abwasser. UTA 5: 274-276.
- Schmelzing, T.O., Gall, G.A.E. (1991) Use of 17 α -methyltestosterone to sex inverse gynogenic female rainbow trout. J. Appl. Ichthyol. 7: 120-128.
- Scholz, S., Braunbeck, T., Segner, H. (1998) Viability and differential function of rainbow trout liver cells in primary culture: Coculture with two permanent fish cells. In Vitro Cell. Develop. Biol. Animal 34: 762-771.
- Scholz, S., Gutzeit, H.O. (2000) 17- α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and

- aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 50: 363-373.
- Schweinfurt, H., Länge, R., Miklantz, H., Schauer, G. (1997) Environmental behavior and aquatic toxicology of ethinylestradiol. In: Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, I.f.W.E.M. (eds.) *Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser*. R. Oldenbourg Verlag GmbH, München, Germany, pp. 39-54.
- Senthilkumar, K., Kannan, K., Sinha, R.K., Tanabe, S., Giesy, J.P. (1999) Bioaccumulation profiles of polychlorinated biphenyl congeners and organochlorine pesticides in Ganges river dolphins. *Environ. Tox. Chem.* 18: 1511-1520.
- Shape, R.M., Skakkebaek, N.E. (1993) Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-1395.
- Silbiger, R.N., Leonard, A.C., Dimsoski, P., Foré, S., Guttman, S.I., Roth, A.C., Gordon, D.A., Wessendarp, T., Toth, G.P., Smith, M.K. (2001) Use of molecular markers to study the effects of environmental impacts on genetic diversity in brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) populations. *Environ. Tox. Chem.* 20: 2580-2587.
- Simon, J., Klaiber, E., Wiita, B., Bowen, A., Yang, H.M. (1999) Differential effects of estrogen-androgen and estrogen-only therapy on vasomotor symptoms, gonadotropin secretion, and endogenous androgen bioavailability in postmenopausal women. *Menopause* 6: 138-146.
- Singh, I. (1964) A modification of the Masson-Hamperl method for staining of argentaffin cells. *Anat. Anz.* 115: 81-82.
- Smeets, J.M.W., Rankouhi, T.R., Nichols, K.M., Kommen, H., Kaminski, N.E., Giesy, J.P., van den Berg, M. (1999a) *In vitro* vitellogenin production by carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti)estrogenic activity of xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157: 68-76.
- Smeets, J.M.W., van Holsteijn, I., Giesy, J.P., Seinen, W., van den Berg, M. (1999b) Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay. *Toxicol. Sci.* 50: 206-213.
- Smith, R.J.F. (1974) Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can. J. Zool.* 52: 1031-1038.
- Smith, R.J.F. (1978) Seasonal changes in the histology of the gonad and dorsal skin of the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Can. J. Zool.* 56: 2103-2109.
- Socorro, S., Power, D.M., Olsson, P.-E., Canario, A.V.M. (2000) Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning characterization and tissue distribution. *J. Endocrinol.* 166: 293-306.
- Sohoni, P., Tyler, C.R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Garcas, M., Sumpter, J.P. (2001) Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 35: 2917-2925.
- Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C. (1991) p-nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92: 167-173.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Olea-Serrano, F. (1995) The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103: 113-122.
- Spengler, P., Körner, W., Metzger, J.W. (2001) Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environ. Tox. Chem.* 20: 2133-2141.
- Spengler, P., Körner, W., Orth, C., Metzger, J.W. (2000) Monitoring of substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants part 1: Chemical analysis. Third SETAC World Conference Brighton, U.K., 21 - 25 May.
- Spurr, A.R. (1969) A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructure Res.* 26: 31-43.
- Stone, R. (1994) Environmental estrogens stir debate. *Science* 265: 308-310.
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Haberer, K., Baumann, W. (1996) Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser* 87: 251-291.
- Sumpter, J.P. (1995) Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicological Letters* 82/83: 737-742.

- Sumpter, J.P. (1998) Xenoendocrine disruptors - environmental impacts. *Toxicological Letters* 102-103: 337-342.
- Sumpter, J.P., Jobling, S. (1995) Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103: 173-178.
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D. (2002) Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. *Environ. Tox. Chem.* 21: 1264-1267.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.-D., Servos, M. (1999) Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225: 81-90.
- Thomas, K.V., Hurst, M.R., Matthiessen, P., Waldock, M.J. (2001) Characterisation of estrogenic compounds in water samples collected from United Kingdom estuaries. *Environ. Tox. Chem.* 20: 2165-2170.
- Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette Jr., L.J., Jégou, B., Jensen, T.K., Jounnet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J.A., Heyer, O., Müller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J.P., Skakkebaek, N.E. (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 104: 741-776.
- Tremblay, L., Van der Kraak, G. (1998) Use of a series of homologous in vitro and in vivo assays to evaluate the endocrine modulating actions of beta-sitosterol in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 43: 149-162.
- Tremblay, L., Van der Kraak, G. (1999) Comparison between the effects of the phytosterol β -sitosterol and pulp and paper mill effluent on sexually immature rainbow trout. *Environ. Tox. Chem.* 18: 329-336.
- Tyler, C.R., Beresford, N., Van der Woning, M., Sumpter, J.P., Thorpe, K. (2000) Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce compounds with endocrine activities. *Environ. Tox. Chem.* 19: 801-809.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P., Bromage, N.R. (1988) *In vivo* ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.* 246: 171-179.
- Tyler, C.R., Van Aerle, R., Hutchinson, T.H., Maddix, S., Trip, H. (1999) An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environ. Tox. Chem.* 18: 337-347.
- Tyler, C.R., Van Der Eerden, B., Jobling, S., Panter, G.H., Sumpter, J.P. (1996) Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 166: 418-426.
- Vaillant, C., LeGuellec, C., Pakdel, F., Valotaire, Y. (1988) Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70: 284-290.
- van Aerle, R., Nolan, M., Jobling, S., Christiansen, L.B., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. (2001) Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the Gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Environ. Tox. Chem.* 20: 2841-2847.
- van Bohemen, C.G., Lambert, J.G.D., Goos, H.J.T., Oordt, P.G.W.J. (1982) Estrogen and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 46: 81-92.
- van den Belt, K., Wester, P.W., van den Ven, L.T.M., Verheyen, R., Witters, H. (2002) Effects of ethinylestradiol on the productive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. *Environ. Tox. Chem.* 21: 767-775.
- van den Brandhof, E.J., Vos, J.H., Druke, J.M., Beekhof, P.K., Berrag, S., van der Ven, L.T.M., Wester, P.W. (2002) Effects of estrogen 17 β -estradiol and anti-thyroid propylthiouracil in a partial life cycle with zebrafish. 12th Annual Meeting of SETAC Europe Vienna, Austria, 12-16 May.
- van den Hurk, R., Slof, G.A. (1981) A morphological and experimental study of gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell. Tiss. Res.* 218: 487-497.
- Walbridge, C.T., Fiandt, J.T., Phipps, G.L., Holcombe, G.W. (1983) Acute toxicity of ten chlorinated aliphatic hydrocarbons to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12: 661-666.

- Wallace, R.A. (1985) Vitellogenesis and Oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: Browder, L.W. (eds.) *Developmental Biology*. pp. 127-177.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G. (1994) Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinol.* 135: 175-182.
- Wiegand, M.D. (1996) Composition, accumulation and utilisation of yolk lipids in teleost fish. *Rev. Fish Biol. Fisheries* 6: 259-286.
- Willingham, E., Crews, D. (1999) Sex reversal effects of environmentally relevant xenobiotic concentrations on the Red-Eared Slider Turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 429-435.
- Wolffe, A.P., Glover, J.F., Tata, J.R. (1984) Culture shock. Synthesis of heat-shock-like proteins in fresh primary cell cultures. *Exp. Cell. Res.* 154: 581-590.
- Zava, D.T., Blen, M., Duwe, G. (1997) Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. *Environ. Health Perspect.* 105: 637-645.
- Zerulla, M., Länge, R., Steger-Hartmann, T., Panter, G.H., Hutchinson, T., Dietrich, D.R. (2002) Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Letters* 131: 51-63.
- Zhan, J., Fahimi, D., Völkl, A. (1997) Sensitive non-radioactive dot blot/ribonuclease protection assay for quantitative determination of mRNA. *BioTechnol.* 22: 500-505.

7. Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

- Marthaler, R., Pawlowski, S., Bernauer, D. (2002): Fische in kleinen Fließgewässern. In Hollert, H., Storch, V. Tag der Artenvielfalt in Heidelberg. Zoologisches Institut der Universität Heidelberg. (in Bearbeitung).
- Pawlowski, S., Sauer, A., Riley, G., Tyler, C. R., Braunbeck, T. (2002): Effects of a municipal sewage treatment plant effluent in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. (in Bearbeitung).
- Pawlowski, S., Sauer, A., Riley, G., Tyler, C. R., Braunbeck, T. (2002): Effects of 17 α -methyltestosterone in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. (in Bearbeitung).
- Pawlowski, S., Ternes, T., Bonerz, M., Kluczka, T., Nau, H., Erdinger, L., Braunbeck, T. (2002): Combined *in situ*- and *in vitro*-experiments to assess estrogenic activity of environmental water samples. Environ. Sci. Technol. (in Bearbeitung).
- Pawlowski, S. (2002): Bemerkungen zur Geschlechtsreife der Europäischen Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*) bei kombinierter Zimmer- und Freilandhaltung. Elaphe N.F. (eingereicht).
- Pawlowski, S., Ternes, T., Bonerz, M., Rastall, A. C., Erdinger, L., Braunbeck, T. (2002): Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. Toxicol. In Vitro. (eingereicht).
- Pawlowski, S., van Aerle, R., Tyler, C.R., Braunbeck, T. (2002): Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. Ecotoxicol. Environ. Safety. (eingereicht).
- Pawlowski, S. (2002): Kombinierte Freiland- und Laboruntersuchung zur Wirkung endokriner Schadstoffe auf Fische, Teil 3. 36. Stipendiatenseminar der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, Internationale Naturschutzakademie, Vilm, 14. – 19. Juli 2002.
- Marthaler, R., Pawlowski, S. (2001): Fische im Neckar. In Brandis, D., Hollert, H., Storch, V. Tag der Artenvielfalt in Heidelberg. Zoologisches Institut der Universität Heidelberg, 273 S.
- Pawlowski, S. (2001): Nachzucht der Rotbauch-Spitzkopfschildkröte [*Emydura subglobosa* (KREFFT, 1876)] – Bemerkungen zu Eiablage und Schlupferfolg. elaphe NF. 9: 2-6.
- Pawlowski, S. (2001): Kombinierte Freiland- und Laboruntersuchung zur Wirkung endokriner Schadstoffe auf Fische, Teil 2. 35. Stipendiatenseminar der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, Biologische Anstalt Helgoland, 3. – 7. September 2001.
- Pawlowski, S. (2000): Kombinierte Freiland- und Laboruntersuchung zur Wirkung endokriner Schadstoffe auf Fische. Workshop Forschung an limnischen Ökosystemen, Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Neuglobsow am Stechlin, 26. – 29. Oktober 2000.

- Pawlowski, S. (2000): Kombinierte Freiland- und Laboruntersuchung zur Wirkung endokriner Schadstoffe auf Fische, Teil 1. 26. Stipendiatenseminar der Deutschen Bundesstiftung Umwelt, Verein Naturpark Thüringer Wald e.V., Friedrichshöhe, 21. – 25. Februar 2000.
- Pawlowski, S., Islinger, M., Völkl, A., Braunbeck, T. (2000): Temperature-dependent vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes at 14 and 18 °C. *Toxicol. In Vitro.* 14: 531-540.
- Pawlowski, S. (2000): Eine Möglichkeit zur gezielten Eiablage bei einer Rotwangenschmuckschildkröte, *Trachemys scripta elegans* (WIED, 1893). *elaphe* NF: 8, 9-12.
- Pawlowski, S., Weissmann, F., Islinger, M., Hollert, H., Sägesser, M., Ochsenein, U., Braunbeck, T. (2000): Endocrine activity of municipal waste water samples from Berne, Switzerland assessed by vitellogenin-mRNA induction in isolated rainbow trout hepatocytes. *Proceedings 10th Annual Meeting of SETAC-Europe, Brighton - United Kingdom, 21 - 25 Mai 2000.*
- Braunbeck, T., Islinger, M., Pawlowski, S., Segner, H. (2000): Endokrin wirksame Substanzen als Umweltschadstoffe: In: Kochen, W. *Umweltbedingte Gesundheitsschäden.* Thieme Verlag, Stuttgart (im Druck).
- Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Siebert, I., Winn, N., Islinger, M., Pawlowski, S., Gratzner, H., Hotley-Weber, R., Ahlf, W., Brack, W., Engwall, M., Erdinger, L., Braunbeck (2000): Use of a quality triad approach and bioassay-directed fractionation to evaluate sediments in southern Germany. *Proceedings 10th Annual Meeting of SETAC-Europe, Brighton – United Kingdom, 21. – 25. Mai 2000.*
- Hollert, H., Pawlowski, S., Braunbeck, T. (2000): Ökotoxikologische Belastung von Abwasserproben aus dem Kanton Bern/Schweiz. *Abschlußbericht an das Amt für Gewässerschutz und Abfallwirtschaft des Kantons Bern.*
- Islinger, M., Pawlowski, S., Hollert, H., Völkl, A., Braunbeck, T. (1999): Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a non-radioactive dot blot/RNase protection assay. *Sci. Total Environ.* 233: 109-122.
- Islinger, M., Pawlowski, S., Braunbeck, T. (1999): Vitellogenin als Marker für östrogen wirksame Stoffe im Wasser. *Abwasser-Technische-Vereinigung* 15: 125-152.
- Hollert, H., Dürr, M., Karaus, U., Siebert, I., Winn, N., Islinger, M., Pawlowski, S., Gratzner, H., Hotley-Weber, R., Färber, H., Ahlf, W., Brack, W., Erdinger, L., Braunbeck, T. (1999): Integrated assessment of sediments and surface waters in the Neckar catchment area (Germany) with analysis of in vitro toxicity, chemistry and macrozoobenthos. *Proceedings of 20th Annual World Wide Meeting of SETAC in Philadelphia, USA.*
- Hollert, H., Islinger, M., Dürr, M., Froschauer, A., Schnurstein, A., Pawlowski, S., Sägesser, M., Ochsenein, U., Erdinger, L., Braunbeck, T. (1999): Möglichkeiten und Grenzen von In vitro-Biotests zur Erklärung einer gestörten Bachforellen-Reproduktion im Einzugsgebiet der Aare (Schweiz). *Posterbeitrag beim Fachseminar Fischnetz, der EAWAG, Winterthur (Schweiz), 6. Mai 1999.*

- Hollert, H., Islinger, M., Siebert, I., Pawlowski, S., Braunbeck, T. (1999): Bestimmung des östrogen wirksamen Potentials von Sedimenten und Schwebstoffen mit Hilfe eines Vitellogenin-mRNA-Assays. DVWK-Schriften, Deutscher Verband für Wasser- und Kulturbau: Methodenstudie zur Schwebstoff- und Sedimentbewertung. 128.
- Hollert, H., Pawlowski, S., Islinger, M., Dürr, M., Froschauer, A., Schnurstein, A., Sägesser, M., Ochsenbein, U., Erdinger, L., Braunbeck, T. (1999): Risk assessment of sewage, suspended matter and sediments with in vitro assays to explain disturbance of brown trout reproduction in Switzerland. Proceedings 9th Annual Meeting of SETAC-Europe, Leipzig - Germany, 25 -29 Mai 1999.
- Siebert, I., Hollert, H., Pawlowski, S., Islinger, M., Dürr, M., Holtey-Weber, R., Färber, H., Braunbeck, T. (1999): Vitellogenin-mRNA in isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle als Biomarker für endokrin wirksame Stoffe in Wasser- und Sedimentextrakten. Posterbeitrag beim Statusseminar BWPlus des Forschungszentrums Karlsruhe, 9. und 10. März 1999.
- Islinger, M., Pawlowski, S., Völkl, A., Braunbeck, T. (1998): Measurement of vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes in a nonradioactive dot-blot-assay. Proceedings 8th Annual Meeting of SETAC-Europe, Bordeaux - France, 14 - 18 April 1998.
- Pawlowski, S., Hollert, H., Islinger, M., Braunbeck, T. (1998): Xenoöstrogene Belastung von Abwasserproben und Abwasserextrakten kommunaler Kläranlagen von Immenstaad und Bösau. Bericht an das Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Universität Stuttgart.