

# Wirkung hormonartiger Substanzen in Gewässern

 Veränderungen beim Zebrafisch (*Danio rerio*) nach *low-dose* Belastung mit  $17\alpha$ -Ethinylöstradiol im *Fish Sexual Development Test* (FSDT)

ID U54-S04-N12

## EINLEITUNG

Der Eintrag von hormonartig wirkenden Stoffen insbesondere in die aquatische Umwelt ist ein latentes und nach neueren Untersuchungen auch unterschätztes Problem. Da hormonaktive Substanzen häufig schon bei sehr geringer Konzentration ihre negative Wirkung entfalten, sollten die zur Detektion in der Umwelt verwendeten Biomarker sensitiv genug sein, um auch bei geringen Mengen schon einen deutlichen Effekt zu zeigen. Als wichtigste Biomarker für eine östrogene Gewässerbelastung sind mittlerweile die Vitellogenininduktion, die Gonadenhistologie und das Geschlechterverhältnis von Fischen anerkannt. Dabei liegt das ‚sensitive Fenster‘ für endokrine Störungen bei Fischen im Zeitraum der Geschlechtsdifferenzierung und der Gonadenreifung. Bei den meisten kleinen Versuchsfischarten wie dem Zebrafisch (*Danio rerio*) wird dieses Fenster vom Fish Sexual Development Test (FSDT) abgedeckt, der eine kontinuierliche Exposition über 60 Tage ab dem befruchteten Ei vorsieht (OECD, 2010).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Ermittlung der NOEC- und LOEC-Werte für  $17\alpha$ -Ethinylöstradiol (EE2) in einem FSDT mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*).



Abbildung: Zebrafisch

Daraus ergibt sich die Wirkungsschwelle, die als Kriterium für die Bewertung von Messergebnissen im Freiland dient.

## METHODIK

Getestet wurde mit 2 Replikaten je 40 Individuen. Die Fische wurden im kontinuierlichen Durchfluss über das Aquariumswasser gegen EE2 in Konzentrationen von 0,1 – 0,5 – 1,0 ng/L exponiert. Als Lösungsvermittler diente DMSO in Konzentrationen von  $\leq 0,02 \mu\text{L/L}$ .

Chemisch-analytisch wurden die eingestellten EE2-Konzentrationen vom Betriebs- und Forschungslabor des



Zweckverbandes Landeswasserversorgung in Langenau und mittels Zelltest (ER-CALUX®) vom Labor der Firma ‚BioDetection Systems‘ (BDS) in Amsterdam überprüft.

## ERGEBNISSE

### Schlupferfolg und Geschlechterverhältnis

Während die Einstellung der vorgegebenen EE2-Konzentrationen nach der chemischen Kontrolle im Großen und Ganzen als gelungen zu bezeichnen ist, verzeichnete der Zelltest in vielen aber nicht allen Fällen die doppelte EE2-Konzentration. Eine mögliche Erklärung ist die Störung des Zelltests durch gelöste organische Substanzen aus den Verbindungsschläuchen der Wasser- und Chemikalien-Zufuhr (Chen et al., 2012).

Schlupferfolg und Mortalität der Kontrollfische lagen im von der OECD geforderten Sollbereich des Tests. Verhaltensstörungen und Missbildungen konnten nicht beobachtet werden. Weder bei der Länge noch beim Gewicht der Fische aus den einzelnen Versuchsgruppen und Replikaten wurden bei Testende signifikante Unterschiede festgestellt.

Das Geschlechterverhältnis schwankte bereits zwischen Wasser- und Lösungsmittel-Kontrolle auffällig. Die mittlere Expositionsgruppe (0,5 ng/L EE2) wies einen signifikant erhöhten Weibchenanteil gegenüber der Wasserkontrolle auf, nicht jedoch gegenüber der DMSO-Kontrolle. In der höchsten Konzentration (1 ng/L EE2) war das Geschlechterverhältnis ebenfalls in Richtung der Weibchen verschoben (nicht signifikant, da die Mortalität bei dieser Belastung eine statistische Auswertung erschwerte).

Niedrige EE2-Konzentrationen (0,1 ng/L) scheinen einen negativen Einfluss auf die Gonadenentwicklung zu haben (verstärktes Auftreten von Zwittergonaden). Bei

den Weibchen konnte zu Versuchsende eine dosisabhängig weiter fortgeschrittene Ovarienreife ab 0,5 ng/L EE2 beobachtet werden. Bei den Männchen bewirkte die Belastung mit EE2 eine verringerte Hodenreife, die bereits bei 0,1 ng/L signifikant war ( $p = 0,02$ ).

### Histopathologische Veränderungen

Die Untersuchung der Gonaden ergab nach Belastung mit EE2 einige histopathologische Veränderungen. Die Anzahl der Einzelveränderungen ungeachtet des Schweregrads unterschied sich bei den Weibchen ab  $\geq 0,5$  ng/L EE2 hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) von den Kontrolltieren. Bei den Männchen war die Anzahl der Einzelbefunde nur bei 0,5 ng/L signifikant erhöht ( $p = 0,025$ ).

#### Wasser-Kontrolle

Bei 10% der Weibchen konnte eine geringfügige Ansammlung von proteinartiger Flüssigkeit im Ovar beobachtet werden, welches vermutlich auf den Abbau nicht abgelaichter Eier zurückzuführen ist. Als Cysten bezeichnete Hohlräume in der Gonade konnten bei 16% der Kontrollweibchen beobachtet werden.

#### DMSO-Kontrolle

Bei den Männchen war das einzig auffällige Merkmal die minimale Ausbildung von Zwittergonaden (Testis-ova) bei 6% der Tiere.

Bei den Weibchen konnte eine geringfügige Ansammlung von proteinartiger Flüssigkeit im Ovar bei 12% der Tiere beobachtet werden. Eine geringgradige Cystenbildung trat bei 21% der Weibchen auf.

#### 0,1 ng/L EE2

Die Männchen dieser Gruppe zeigten als auffälligste Veränderung das starke Auftreten von Testis-ova. Hier konnte das einzige Testis-ovum mit Schweregrad 4 beobachtet werden. Außerdem zeigte ein Individuum eine deutliche Degeneration des Hodens.

Bei den Weibchen zeigten 23% geringgradige Ansammlungen proteinartiger Flüssigkeit im Ovar. Betroffen waren mehr als doppelt so viele Fische wie in der Kontrolle. Auch Cysten (23%) traten mehr als doppelt so häufig wie in der Wasserkontrolle auf (allerdings kaum mehr als in der DMSO-Kontrolle).

0,5 ng/L EE2

Die Männchen zeigten eine signifikante ( $p = 0,045$ ) Abnahme der Spermiedichte in den *Tubuli seminiferi*.

Proteinartige Flüssigkeit im Ovar trat bei 32% der Weibchen auf. Auch zeigten die Weibchen bei 0,5 ng/L signifikant häufiger ( $p = 0,024$ ) eine interstitielle Fibrose des Ovars (43%) sowie eine signifikante ( $p = 0,007$ ) Abundanz von Cysten (24%), die bei 11% der Weibchen auch deutlich stärker ausgeprägt war als bei der Kontrolle.

1 ng/L EE2

Die Männchen zeigten einen leichten Rückgang der Spermienzahl, der wegen der verringerten Hodenreife weniger stark ausgeprägt war als bei 0,5 ng/L und auch wegen der erhöhten Mortalität weniger gut statistisch zu belegen war.

Bei den Weibchen waren die signifikant häufiger auftretende Ansammlung von proteinartiger Flüssigkeit (59%,  $p = 0,002$ ) in der Gonade, eine interstitielle Fibrose (55%,  $p = 0,003$ ) sowie Cysten mit 46% die bedeutendsten Effekte.

### Bewertung

Die Gegenüberstellung der Einzelergebnisse (Tabelle) zeigt, dass für die meisten der untersuchten Parameter die NOEC bei 0,1 ng/L, die LOEC bei 0,5 ng/L liegt. Dies gilt insbesondere für die Endpunkte Reifegrad und Anzahl der histologischen Veränderungen bei den Weibchen. Das Auftreten von proteinartiger Flüssigkeit bei den Weibchen zeigte ebenfalls eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, allerdings lag hier die NOEC bei 0,5 ng/L.

Der Vitellogeningehalt (VTG-Gehalt) fiel zuerst bei 0,1 ng/L EE2 signifikant ab, bevor der Wert nach Belastung mit 0,5 ng/L signifikant anstieg.

Als niedrigste populationsrelevante LOAEC ergibt sich 0,5 ng/L (mehrere signifikante Veränderungen), als entsprechende NOAEC 0,1 ng/L (keine statistische Signifikanz außer bei der Hodenreife und der Suppression des natürlicherweise in männlichen Individuen vorkommenden VTG).

### DISKUSSION

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen zu den adversen Effekten von EE2 durchgeführt, wobei in den meisten Fällen deutlich höhere Konzentrationen getestet wurden. Einige Studien konnten bei Konzentrationen ab 3 ng/L EE2 eine komplette Verweiblichung aller Versuchsfische zeigen (Fenske et al., 2005; Nash et al., 2004; Maack & Segner, 2004; Örn et al., 2006). In der vorliegenden Studie war bereits bei einer Belastung mit 0,5 ng/L EE2 eine Zunahme der Weibchen an der Gesamtpopulation zu beobachten, allerdings folgte die höchste Konzentration diesem Trend nicht.

Die in dieser Studie beobachtete signifikante Verringerung der Hodenreife nach Exposition gegenüber EE2 (LOEC = 0,1 ng/L) deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen ab 1 ng/L (Weber et al., 2003) bzw. 3 ng/L (Fenske et al., 2005), bei denen die Fische in partiellen *Life-cycle*-Studien und in einer Studie adulte Zebrafische in einer Kurzzeitexposition (max. 24 Tage) getestet wurden (van den Belt et al., 2001, LOEC = 10 ng/L EE2). Weitere Übereinstimmungen bestehen bei den histopathologischen Effekten der Weibchen. So berichten auch andere Studien von einer verstärkten Atresie vitellogener Eistadien (Maack & Segner, 2004; van den Belt et al., 2001). Hier ist anzumerken, dass die in der vorliegenden Studie beobachteten Cysten ebenfalls eine Form der Atresie darstellen.

Tabelle: Zusammenstellung der für die einzelnen Parameter ermittelten NOEC- und LOEC-Werte nach Exposition gegenüber Ethinylöstradiol im FSDT mit dem Zebrafisch. Die **fett** angegebenen Werte kennzeichnen Parameter, bei denen die höchste Konzentration nicht signifikant verändert war (-: keine Wirkung nachgewiesen)

|  | ARTSPEZIFISCH |             | WEIBCHEN    |             | MÄNNCHEN    |             |
|--|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|  | NOEC (ng/L)   | LOEC (ng/L) | NOEC (ng/L) | LOEC (ng/L) | NOEC (ng/L) | LOEC (ng/L) |
| Schlüpferfolg und Mortalität                   | -             | -           |             |             |             |             |
| Geschlechterverhältnis                         | 0,1           | 0,5         |             |             |             |             |
| <b>Überleben</b>                               |               |             |             |             |             |             |
| Missbildungen und Verhalten                    |               |             | -           | -           | -           | -           |
| <b>Wachstum</b>                                |               |             |             |             |             |             |
| Körperlänge                                    |               |             | -           | -           | -           | -           |
| Körpergewicht                                  |               |             | -           | -           | -           | -           |
| <b>Gonadenentwicklung und -differenzierung</b> |               |             |             |             |             |             |
| Reifegrade                                     |               |             | 0,1         | 0,5         | < 0,1       | 0,1         |
| <b>Histopathol. Veränderungen</b>              |               |             |             |             |             |             |
| Anzahl Effekte pro Tier                        |               |             | 0,1         | 0,5         | <b>0,1</b>  | <b>0,5</b>  |
| Proteinartige Flüssigkeit                      |               |             | 0,5         | 1           | -           | -           |
| Fibrose  |               |             | <b>0,1</b>  | <b>0,5</b>  | -           | -           |
| Cysten (Atresie)                               |               |             | <b>0,1</b>  | <b>0,5</b>  | -           | -           |
| Abnahme Spermatozoen                           |               |             | -           |             | <b>0,1</b>  | <b>0,5</b>  |
| <b>Biochemische Parameter</b>                  |               |             |             |             |             |             |
| Vitellogenininduktion                          |               |             | 0,5         | 1           | 0,1 (< 0,1) | 0,5         |

Insgesamt sind somit die histopathologischen Ergebnisse der vorliegenden Studie durchaus mit anderen Studien vergleichbar, zumal nach Kenntnisstand der Autorin keine methodisch vergleichbaren histopathologischen Daten nach Testung mit ähnlich niedrigen Konzentrationen von EE2 existieren. Obwohl in manchen Studien vergleichbare Konzentrationen und auch vergleichbare Expositionsdesigns wie in der vorliegenden Studie getestet wurden, wurden bei den meisten Studien die LOECs zwischen 1 und 3 ng/L EE2 ermittelt (Balch et al., 2004; Segner, 2003; van den Belt et al., 2002). Somit liegt die LOEC in diesen Studien zwei bis sechsmal höher als in unserer aktuellen Studie.

Die Abnahme des VTG-Wertes nach Belastung mit 0,1 ng/L EE2 in der vorliegenden Studie ist ungewöhnlich. Hier wären weitere Untersuchungen mit niedrigen Konzentrationen von EE2 hilfreich.

Grist et al. (2003) fanden für die Populationswach-

tumsrate von Dickkopf-Elritzen (*Pimephales promelas*) eine NOAEC von 0,2 ng/L und eine LOAEC von 1,0 ng/L. Der geometrische Mittelwert dieser beiden Werte liegt bei rund 0,5 ng/L und stellt die populationsrelevante Wirkungsschwelle dar. Kuch et al. (2010) leiteten daraus eine vorläufige PNEC (*predicted no effect concentration*) von 0,3 ng/L ab.

#### SCHLUSSFOLGERUNG

Zur Ableitung einer PNEC aus der hier vorliegenden Studie ist ein Beurteilungsfaktor von 2 ausreichend, weil mit dem angewandten Test schon die empfindlichsten Endpunkte abgedeckt sind. So ergibt sich aus der empfindlichsten populationsrelevanten NOAEC (0,1 ng/L) eine PNEC von  $0,1 / 2 = 0,05$  ng/L.

## LITERATUR

- Balch GC, Mackenzie CA, Metcalfe CD. (2004): Alterations to gonadal development and reproductive success in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 alpha-ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(3), 782-791
- van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H. (2001): Reproductive effects of ethinylestradiol and 4t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 458-467.
- van den Belt, K.; Wester, P. W., van der Ven, L. T. M., Verheyen, R.; Witters, H. (2002): Effects of ethinylestradiol on the reproductive physiology in Zebrafish (*Danio rerio*): Time dependency and reversibility. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(4), 767-775
- Chen L, Shen CF, Tang X, Chen C, Chen Y (2012): Estrogenic effects of dissolved organic matter and its impact on the activity of 17 $\alpha$ -estradiol. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 522-528
- Fenske, M., Maack, G., Schäfers, C., Segner, H. (2005): An environmental relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(5), 1088-1098
- Grist EPM, Wells NC, Whitehouse P, Brighty G, Crane M (2003): Estimating the effects of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol on populations of the Fathead Minnow *P. promelas*: are conventional toxicological endpoints adequate? *Environ. Sci. Technol.* 37(8), 1609-1616
- Kuch B, Kern F, Metzger JW, von der Trenck KT (2010): Effect-related monitoring: estrogen-like substances in groundwater. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 250-260
- Maack, G. & Segner, H. (2004): Life-stage-dependent sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) to estrogen exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 139, 47-55
- Nash, J. P.; Kime, D. E.; van der Ven, L. T. M.; Wester, P. W.; Brion, F.; Maack, G.; Stahlschmidt-Allner, P.; Tyler, C. R. (2004): Longterm exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives* 112 (17), 1725-1733
- OECD (2010): Fish sexual development test. Draft Guideline, Organization of Economic Cooperation and Development. [www.oecd.org/data](http://www.oecd.org/data)
- Örn, S., Yamani, S., Norrgren, L. (2006): Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between Zebrafish and Japanese Medaka after exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and 17 $\alpha$ -trenbolone. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 237-243
- Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M., Wenzel, A. (2003): Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: Report from the European IDEA project. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302- 314
- Weber, L.P., Hill, J., Janz, D.M. (2003): Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquat. Toxicol.* 63, 44.

## IMPRESSUM

|                     |  |
|---------------------|--|
| <b>HERAUSGEBER</b>  | LUBW Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg<br>Postfach 10 01 63, 76231 Karlsruhe, <a href="http://www.lubw.baden-wuerttemberg.de">www.lubw.baden-wuerttemberg.de</a>   |
| <b>BEARBEITUNG</b>  | Dr. Susanne Knörr & Prof. Dr. Thomas Braunbeck, Universität Heidelberg, COS, Arbeitsgruppe Aquatische Ökotoxikologie, INF 504, 69120 Heidelberg. Für den Inhalt sind die Bearbeiter verantwortlich. Die geäußerten Interpretationen und Einschätzungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen. Originalbericht siehe Anhang. |
| <b>AUFTRAGGEBER</b> | Dr. Theo v. d. Trenck, LUBW, Referat Medienübergreifende Umweltbeobachtung, Klimawandel,<br>76231 Karlsruhe, <a href="mailto:theo.v.d.trenck@lubw.bwl.de">theo.v.d.trenck@lubw.bwl.de</a>  |
| <b>BEZUG</b>        | <a href="http://www.fachdokumente.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/91063/">http://www.fachdokumente.lubw.baden-wuerttemberg.de/servlet/is/91063/</a><br>ID Umweltbeobachtung U54-S04-N12  |
| <b>STAND</b>        | März 2012  |

Nachdruck und Verteilung für kommerzielle Zwecke – auch auszugsweise – ist nur mit Zustimmung des Herausgebers unter Quellenangabe und Überlassung von Belegexemplaren gestattet.

## **Inhaltsverzeichnis**

|   |    |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis .....  | 1  |
| 1. Einleitung .....   | 1  |
| 2. Material und Methoden .....                                    | 2  |
| 2.1 Der Zebrafisch ( <i>Danio rerio</i> ) .....                   | 2  |
| 2.2 Hälterung der Brutpaare .....                                 | 2  |
| 2.3 Eigengewinnung .....  | 3  |
| 2.4 Testsubstanz und Testkonzentrationen .....                    | 3  |
| 2.5 Versuchsaufbau des Fish Sexual Development Tests (FSDT) ..... | 4  |
| 2.6 Testende .....  | 6  |
| 2.7 Histologie .....  | 6  |
| 2.8 Vitellogeninmessung .....                                     | 10 |
| 2.9 Analytik .....  | 11 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion .....                                | 13 |
| 3.1 Wasserparameter .....   | 13 |
| 3.2 Analytik .....  | 13 |
| 3.3 Schlupferfolg und Mortalität .....                            | 15 |
| 3.4 Verhaltensstörungen und Missbildungen .....                   | 15 |
| 3.5 Länge und Gewicht .....                                       | 16 |
| 3.6 Geschlechterverhältnis .....                                  | 16 |
| 3.7 Reifegrade .....  | 18 |
| 3.8 Histopathologische Veränderungen .....                        | 23 |
| 3.9 Vitellogenin .....  | 29 |
| 4. Abschließende Bewertung .....                                  | 31 |
| 4.1 NOEC und LOEC im FSDT mit Ethinylestradiol .....              | 31 |
| 4.2 Literaturvergleich .....                                      | 32 |
| 5. Literatur .....  | 34 |
| 6. Anhänge .....  | 35 |
| 6.1 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....                | 36 |
| 6.2 Rohdaten .....  | 38 |

## 1. Einleitung

Adverse Effekte einer Belastung unserer Gewässer mit hormonaktiven Stoffen haben in den vergangenen Jahrzehnten einerseits zu steigender Besorgnis, andererseits aber auch zu sehr großen Forschungsaktivitäten geführt. Da die Belastung mit einem Schadstoff möglicherweise zu einer Vielzahl von Beeinträchtigungen und chronische Belastungen mit Schadstoffen letztendlich möglicherweise auch zu einer Störung in der Fortpflanzung der exponierten Organismen führen, stellte die Identifizierung echter „endokriner“ Endpunkte eines der Hauptprobleme dar.

Hormonaktive Substanzen entfalten häufig schon bei sehr geringer Konzentration ihre negative Wirkung. Deshalb sollten die verwendeten Biomarker sensitiv genug sein, um auch bei geringen Mengen einen deutlichen Effekt zu zeigen. Als wichtigste Biomarker für östrogene Belastung sind mittlerweile Vitellogenininduktion, Gonadenhistologie (Reifestadien und histopathologische Veränderungen) und Geschlechterverhältnis anerkannt.

Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Fragestellung, wann ein Organismus besonders empfindlich gegenüber einer Belastung mit endokrin aktiven Substanzen reagiert. In zahlreiche Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass das sog. „sensitive window“ für endokrine Störungen bei Fischen im Wesentlichen der Zeitraum der Geschlechtsdifferenzierung und der Gonadenreife ist (für Zebrafisch siehe Maack & Segner 2004). So konnte gezeigt werden, dass die Exposition gegenüber östrogenen Substanzen in einem frühen Lebensstadium insbesondere während der Phase der Geschlechtsdifferenzierung zur Bildung von Zwittergonaden (Testes-ova, Lange et al. 2001), Verschiebungen im Geschlechterverhältnis (Nimrod & Benson 1998, Parrot & Blunt 2005) und Störungen der Reproduktion bei geschlechtsreifen Fischen führen kann (Hill & Jantz 2003, Van den Belt et al. 2003).

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurde der sog. „Fish Sexual Development Test“ (FSDT) entwickelt, welcher auch der vorliegenden Studie zugrunde liegt. Dieser sieht eine Exposition über 60 Tage ab dem befruchteten Ei vor, welche bei den meisten kleinen Versuchsfischarten wie Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*), japanischer Reiskärpfling (Medaka, *Oryzias latipes*) und Zebraärbli ( *Danio rerio*) das sensitive Fenster abdeckt (OECD 2010).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Ermittlung der NOEC- und LOEC-Werte für 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol in einem *Fish Sexual Development Test* mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*).

## 2. Material und Methoden

Der Test wurde weitgehend gemäß der erweiterten Version der OECD Test Guideline 210, *Fish Early Life Stage Toxicity Test* (OECD 1992), bzw. dem *Draft Proposal* für den *Fish Sexual Development Test* (OECD 2010) durchgeführt. Abweichungen zum empfohlenen Testdesign sind **Tab. 14** im Anhang (Seite 35) zu entnehmen.

### 2.1 Der Zebrafisch (*Danio rerio*)



**Abb. 1:** Der Zebrafisch (*Danio rerio*) ist in den vergangenen Jahren zum beliebten Modell-Organismus geworden. Bei den adulten Tieren sind Männchen und Weibchen leicht zu unterscheiden.

Der Zebrafisch (*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan 1822) ist ein kleiner benthopelagischer Süßwasserfisch aus der Familie der Cypriniden. Diese Fischart ist ursprünglich im Ganges und seinen Zuflüssen, aber auch in Burma und Sumatra beheimatet (Eaton and Farley 1974). Aufgrund dieser Herkunft liegt die ideale Haltungstemperatur des Zebrafischs bei etwa 26°C. Bei dieser Temperatur wächst er sehr schnell und erreicht die Geschlechtsreife innerhalb 12 Wochen. Zebrafische erreichen ausgewachsen eine Gesamtlänge von 3-5 cm. Männchen und Weibchen sind gut zu unterscheiden: Während die Männchen relativ schlank sind und zumindest im Wildtyp in den weißen Streifen ein dünnes rotes Band zeigen, haben die Weibchen ein rundliches Abdomen und das rote Band fehlt. Adulte Weibchen legen zwischen 50-200 Eier pro Tag und benötigen nur wenige Regenerationstage zwischen den Eiablagen. Zebrafische sind leicht erhältlich und aufgrund der oben genannten Eigenschaften beliebte Versuchsfische der Neuro- und Entwicklungsbiologie sowie in der Toxikologie.

### 2.2 Hälterung der Brutpaare

In der Aquatischen Ökotoxikologie der Universität Heidelberg werden mehrere Zuchtgruppen Zebrafische unterhalten. Jede Gruppe besteht aus je sieben Weibchen und Männchen. Diese werden in 13 L Aquarien bei einer Temperatur von 26°C ± 1°C im Durchfluss und mit einem Lichtzyklus von 10/14 Stunden hell/dunkel gehalten. Die Tiere werden einmal täglich ad libitum mit TetraMin Flockenfutter (Tetra, Melle) sowie am Tag vor dem Ablachen zusätzlich mit frisch geschlüpften Nauplii von *Artemia spec.* (Great Salt Lake Artemia Cysts, Sanders Brine Shrimp Company, Ogden, USA) gefüttert.

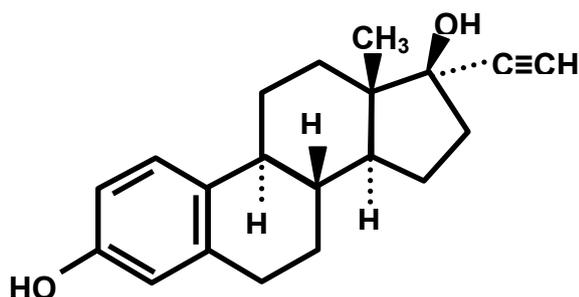
## 2.3 Eigewinnung

Zur Eigewinnung werden die Brutpaare am Vorabend des Ablachens in dafür vorgesehene Brutkästen gesetzt. Diese befinden sich in einem großen wassergefüllten Aquarium, bei dem die Temperatur über Heizstäbe (Typ 3602, Eheim, Deizisau) konstant bei  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  gehalten wird. Der Boden der Brutkästen besteht aus einem Edelstahlnetz mit einer Maschenweite von 1,25 mm, die Wände des Brutkastens sind mit Ausnahme der Vorderfront als Sichtschutz mit schwarzem Silikon beschichtet. Außerdem ist in jedem Brutkasten eine „Pflanzenattrappe“ aus Plastik als Laichsubstrat zu Stimulation des Laichvorgangs befestigt. Die Brutkästen werden auf eine Laichschale aus Glas gestellt, in der die durch das Netz im Boden fallenden befruchteten Eier aufgefangen werden.

Zebrafische beginnen mit dem Ablachen kurz nach dem morgendlichen Beginn der Lichtperiode. Nach dem Ablachen werden die Brutpaare in die Hälterungsbecken zurückgesetzt und die Brutkästen entfernt. Anschließend kann die Laichschale vorsichtig aus dem Wasserbad genommen, die Embryonen gezählt und aussortiert werden. Zu diesem Zweck werden sie in Petri- bzw. Kristallisierschalen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei einer Temperatur von  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$  in einem Klimaschrank aufbewahrt. Auf die beschriebene Weise produziert jede Zuchtgruppe zwischen 200 - 400 Eier pro Tag. Die Weibchen benötigen eine Regenerationszeit von etwa 4 Tagen.

## 2.4 Testsubstanz und Testkonzentrationen

Als Testsubstanz wurde  $17\alpha$ -Ethinylöstradiol (**Abb. 2**, EE2, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet.



**CAS-No.:** 57-36-6

**Lot No.:** 107K1454

**Molekularformel:**  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_2$

**Reinheit:**  $\geq 98\%$

**Produktnummer:** E8750

**Bezugsquelle:** Sigma-Aldrich, Deisenhofen

**Molekulargewicht:** 296,41

**Abb. 2:** Molekularstruktur  $17\alpha$ -Ethinylöstradiol

Die verwendeten Testkonzentrationen waren 0,1, 0,5 und 1 ng/L EE2. Aufgrund dieser geringen Konzentrationen wurde zunächst eine Stammlösung mit 1,3 mg/L EE2 und daraus eine 2. Stammlösung mit einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{g/L}$  EE2 in DMSO (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) angesetzt. Die Einwaage der Testsubstanz für Stammlösung I erfolgte auf ei-

ner Satorius R180D Feinwaage (Satorius, Göttingen). Stammlösung II wurde im Test als Ausgangslösung für die im Test eingesetzten Substanzstammlösungen eingesetzt. Beide Stammlösungen wurden im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Details zu den Ansätzen und Verdünnungen sind **Tab. 1** zu entnehmen. Die Stammlösungen für die einzelnen Testbecken wurden alle 48 Stunden neu angesetzt und aufgefüllt.

**Tab. 1:** Stammlösungen und verwendete Endkonzentrationen

|                                 | Substanz Einwaage/Menge | Lösungsmittel Menge |
|---------------------------------|-------------------------|---------------------|
| Stammlösung I (1,3 mg/L EE2)    | 0,01300 mg EE2          | 100 ml DMSO         |
| Stammlösung II (10 µg/L EE2)    | 1 ml Stammlösung I      | 129 ml DMSO         |
| Stamm für Endkonz. DMSO         | 130 µl DMSO             | 5 L Aquarienwasser  |
| Stamm für Endkonz. 0,1 ng/L EE2 | 130 µl Stamm II         | 5 L Aquarienwasser  |
| Stamm für Endkonz. 0,5 ng/L EE2 | 65 µl Stamm II          | 5 L Aquarienwasser  |
| Stamm für Endkonz. 1,0 ng/L EE2 | 13 µl Stamm II          | 5 L Aquarienwasser  |

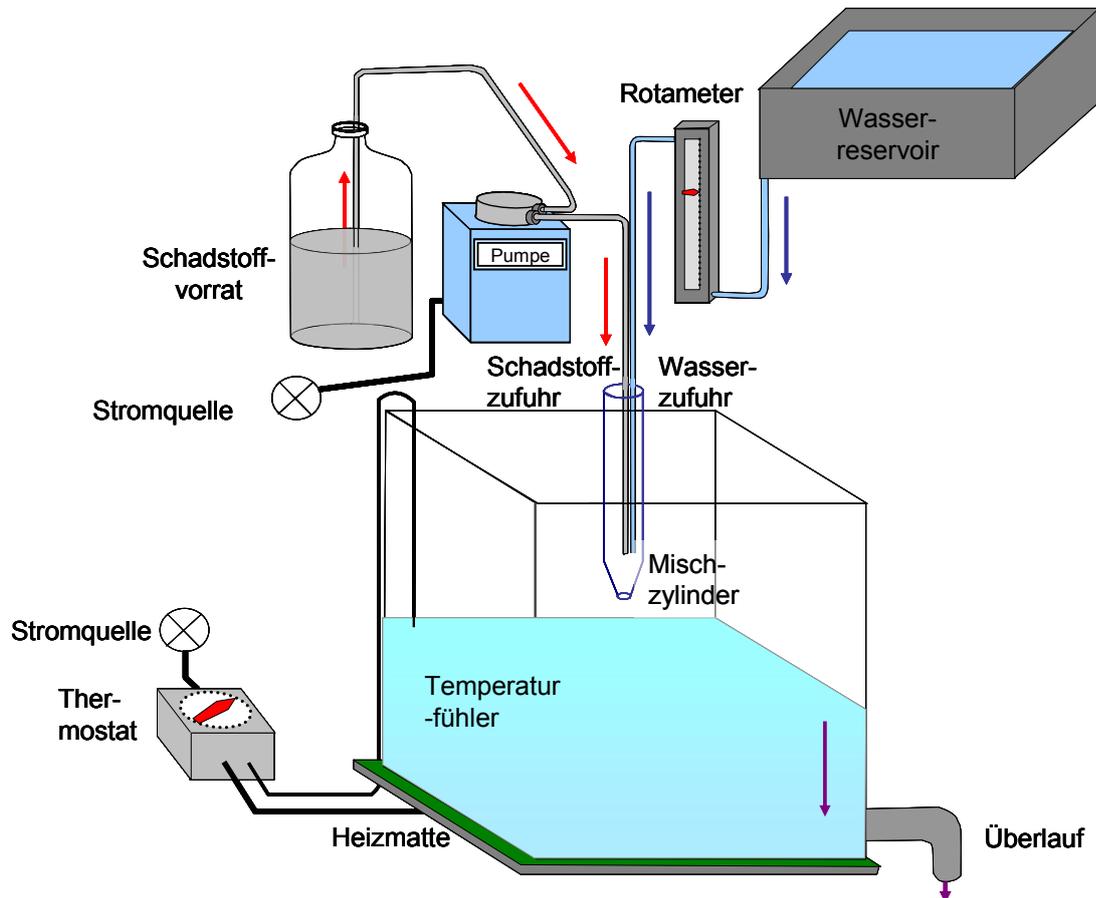
## 2.5 Versuchsaufbau des *Fish Sexual Development Tests* (FSDT)

Im FSDT werden Zebrafische mit potenziell oder tatsächlich hormonaktiven Substanzen über einen Zeitraum von 60 Tagen belastet. Dabei beginnt die Exposition 3-4 Stunden nach der Befruchtung. Die Eier wurden aus den Laichschalen direkt auf Kristallisierschalen mit den verschiedenen Testkonzentrationen verteilt. In Abweichung zum OECD-Guideline wurden allerdings nur 80 statt 160 befruchtete Eier pro Testkonzentration eingesetzt und auf zwei Replikate je 40 Embryonen verteilt. Die Embryonen verblieben 5 Tage in den Kristallisierschalen wobei die Testsubstanz täglich gewechselt wurde. Die Aufbewahrung erfolgte bei einer Temperatur von  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  und in einem temperaturreguliertem Klimaschrank. Anschließend wurden die Larven in 10 l Aquarien überführt und bis Testende unter Durchflussbedingungen mit einem dreifachen Wasseraustausch pro Tag gehalten. Der Aufbau der Durchflussanlage ist **Abb. 3** zu entnehmen.

Aus über der Anlage befindlichen Vorratstanks wurde in 24 Minuten 500 ml aufbereitetes Brauchwasser (Mischung aus Leitungswasser und demineralisiertem Wasser) über Rotameter (GAGL 54, Yokogawa, Wehr) in die Aquarien dosiert. Über eine Peristaltikpumpe (Gilson, Villier-le-Bel, Frankreich) erfolgte eine Schadstoffzugabe von 100 ml/Stunde. Aufbereitetes Brauchwasser und Schadstoff wurden in einem Mischzylinder zusammengeführt und tropften von dort gemeinsam in die Versuchsbecken. Die Temperaturregulierung wurde über Heiz-

matten (Pet Mat, Fa. Rebie, Bielefeld) und Thermostate konstant auf einer Temperatur von  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  gehalten.

Der korrekte Durchfluss von Pumpen und Rotameter wurden täglich überprüft. Ebenso wurde täglich die Wassertemperatur sowie die Mortalität überwacht. Kot und Futterreste wurden wenn nötig entfernt.



**Abb. 3:** Schematischer Aufbau der Durchflussanlage

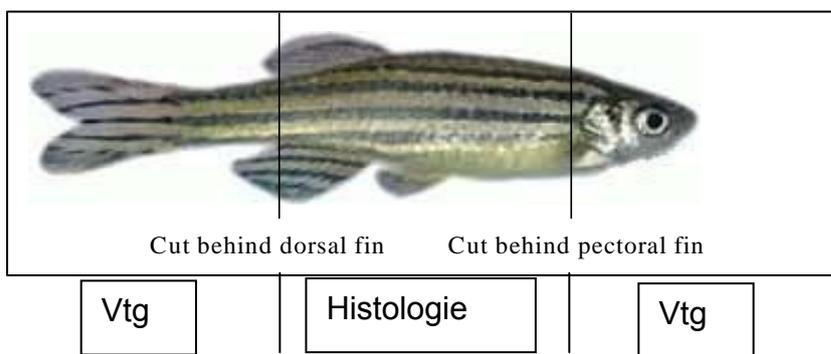
Die Fütterung erfolgte gemäß **Tabelle 2**.

**Tab. 2:** Fütterungsschema FSDT EE2, dpf = *days post fertilisation*

| Versuchszeitraum (dph) | Futter  |
|------------------------|---|
| 1 - 26                 | Staubfutter Sera Micron (Sera, Heinsberg)   |
| 8 - 60                 | Frisch geschlüpfte <i>Artemia spec. Nauplii</i> (Great Salt Lake Artemia Cysts, Sanders Brine Shrimp Company, Ogden, USA) |
| 20 - 60                | Tetra Min (Tetra, Melle)  |

## 2.6 Testende

Nach 60 Tagen wurden die Fische in einer gesättigten Benzocainlösung (Ethyl-4-aminobenzoat, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) abgetötet. Jeder Fisch wurde gemessen und gewogen und für die histologische Auswertung (s. u.) aufbewahrt. Außerdem wurden zur Bestimmung des Vitellogenins (Vtg) bei 25 Tieren pro Replikat Kopf und Schwanz abgeschnitten, deren Gewicht bestimmt und anschließend in Eppendorftubes in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Aufbewahrung dieser Proben bis zum Versand nach Odense, Dänemark zu Herrn Dr. Hendrik Holbeck zur Vtg-Messung erfolgte bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Die verbleibenden Körpermittelteile dieser Fische wurden ebenfalls der histologischen Auswertung zugeführt (**Abb. 4**).



**Abb. 4:** Schnittschema zur gleichzeitigen Verwendung eines Fisches für Vtg-Messung und Histologie

## 2.7 Histologie

Die Fixierung der Fische bzw. der Körpermittelteile für die histologische Auswertung erfolgte in Davidson's Fixativ (220 ml Formaldehyd (37-40%), 115 ml Eisessig, 330 ml Ethanol (96 %), 335 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest.) in Einbettkassetten. Nach der Fixierungsphase wurden die Proben mit Hilfe eines Einbettautomaten über eine aufsteigende Alkoholreihe (70, 80, 90 und 96 % für je zwei Stunden) und Xylol (3 x 3 Stunden) in Histoplast S (Serva, Heidelberg) für 2 x 6 Stunden überführt.

Zum Einbetten wurde eine Leica EG 1140 Ausgießstation (Leica, Tempe, USA) verwendet, wobei die Fische so orientiert wurden, dass der Anschnitt von ventral erfolgen konnte.

Anschließend wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms Schnitte der Gonaden mit einer Dicke von 3-5  $\mu\text{m}$  angefertigt. Um einen möglichst guten Überblick über die gesamte Gonade zu erhalten, wurden die Schnitte in Intervallen von etwa 12 - 20  $\mu\text{m}$  genommen. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad gestreckt und anschließend auf mit einer Albumin-Glycerin-Lösung (Serva, Heidelberg) beschichtete Objektträger aufgenommen. Die Objektträger wurden über Nacht bei 38  $^{\circ}\text{C}$  getrocknet.

Die Schnitte wurden mit einer Hämatoxylin-Eosin (HE-) Färbung gefärbt (Romeis 2010). Dabei wurde statt Xylol Orangerterpen (Roth, Karlsruhe) als Entparaffinierungsmedium verwendet (3 x 10 min). Die nach der Entparaffinierung anschließende Entwässerung vor der

eigentlichen Färbung erfolgte über eine absteigende Alkoholreihe (2 x 5 min 100 % Isopropanol, je 3 min 96, 90, 80, 70 % Ethanol, 1 min *A. dest.*). Nach dem Färben wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (je 3 min 70, 80, 90, 96 % Ethanol, 2 x 5 min 100 % Isopropanol), wieder in Orangenterpen (3 x 10 min) überführt und anschließend mit DePeX (Serva, Heidelberg) eingedeckt.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Leitz Aristoplan Mikroskop (Leitz, Wetzlar) und dokumentiert mit einer ColorView Digitalkamera und dem damit verknüpften Analysis Computerprogramm (Soft Imaging Systems, Münster).

Es wurden unterschiedliche Kriterien untersucht.

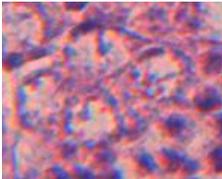
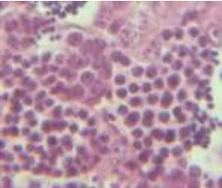
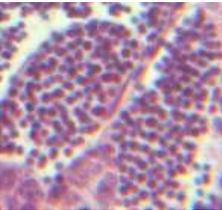
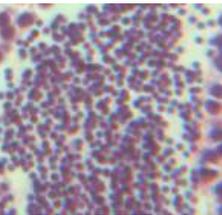
1. **Gonadentyp:** es wurde zwischen 5 Typen (Männchen, Weibchen, Testisova, Hermaphrodit, undifferenziert) unterschieden.
2. **Histopathologische Effekte:** Die histopathologischen Effekte wurden gemäß der von der OECD vorgeschlagenen Guideline für histopathologische Effekte (OECD 2010) untersucht (**Tab. 3**).
3. **Reifestadien:** die relativen Anteile verschiedener Gametentypen bezüglich ihres Reifzustands in den Gonaden wurde in verschiedene Reifestadien eingeteilt (**Tab. 4**, **Tab. 5**)

**Tab. 3:** Histologisch untersuchte Endpunkte gemäß der OECD Guideline für histopathologische Effekte

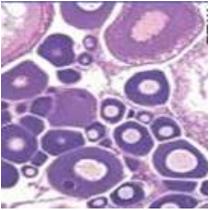
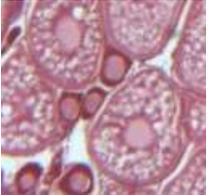
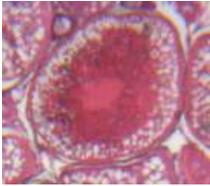
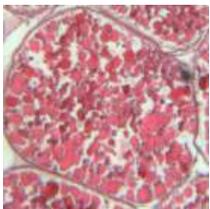
| Männchen |   | Weibchen |   |
|----------|---|----------|---|
| Code     | Veränderung                                       | Code     | Veränderung                             |
| M01      | Zunahme eines best. Zelltyps                      | F01      | Zunahme eines best. Zelltyps            |
| M02      | Abnahme eines best. Zelltyps                      | F02      | Abnahme eines best. Zelltyps            |
| M03      | Testis-ova  | F03      | Ovariale Spermatogenese                 |
| M04      | Hermaphrodit, Männchen                            | F04      | Hermaphrodit, Weibchen                  |
| M05      | Hodendegeneration                                 | F05      | Verstärkte Atresie unreife Eizellen     |
| M06      | Asynchr. Entwicklung Spermatozyten                | F06      | Verstärkte Atresie reife Eizellen       |
| M07      | Asynchr. Entwicklung Hoden                        | F07      | Asynchr. Entwicklung Ovar               |
| M08      | Asynchr. Entwicklung Hoden rechts/links           | F08      | Asynchr. Entwicklung Ovar rechts/links  |
| M09      | Intravaskuläre proteinartige Flüssigkeit          | F09      | Proteinaceous fluid, intravascular      |
| M10      | Interstitielle proteinartige Flüssigkeit          | F10      | Proteinaceous fluid, interstitial       |
| M11      | Interstitielle Fibrose                            | F11      | Interstitial fibrosis                   |
| M12      | Hypertrophie der Sertoli Zellen                   | F12      | Zunahme der postovulatorischen Follikel |
| M13      | Verstärkte Basophilie der Hepatozyten             | F13      | Verstärkte Basophilie der Hepatozyten   |
| M14      | Nephropathie                                      | F14      | Nephropathie                            |
| M15      | Granulomatöse Entzündung                          | F15      | Granulomatöse Entzündung                |
| M16      | Histolytische Zellen im Lumen                     | F16      | Verstärkte Makrophagenaggregation       |
| M17      | nicht abgelöste Anhaftungen an der Peritonealwand | F17      | Faltung der Oozytenmembran              |
|          |   | F18      | Eireste im Ovidukt                      |
|          |   | F19      | Zysten                                  |

Zur Ermittlung der Gonadenreife wurden unterschiedliche Reifungsstufen der Keimzellen unterschieden. Diese Differenzierungen sind **Tab. 4** und **5** zu entnehmen.

**Tab. 4:** Unterschiedliche Reifestadien der Keimzellen männlicher Zebrafische (*Danio rerio*)

|   | Zelltyp                                 | Abk.       | Beschreibung  |
|---|---|------------|---|
|    | <b>Spermatogonium</b>                   | <b>SPG</b> | Spermatogonien sind die größten Keimzellen im Hoden (~ 5-10 µm). Sie besitzen normalerweise einen vesikulären Zellkern mit deutlich sichtbaren Nucleoli. Sie treten normalerweise in Zellhaufen auf.  |
|    | <b>Spermatocyte</b>                     | <b>SPC</b> | Im Vergleich mit Spermatogonien sind Spermatocyten etwas kleiner (~ 4-6 µm), besitzen einen vergleichsweise dichten Kern und sind die meistens die häufigsten Zellen. Primäre Spermatocyten sind größer als sekundäre; letztere entstehen durch Meiose. |
|  | <b>Spermatidie</b>                      | <b>SPT</b> | Diese Zellen haben die 2. Meioseteilung durchlaufen und besitzen einen kleinen dichten Zellkern, der von einem dünnen Cytoplasmasaum umgeben ist. Es sind die kleinsten Zellen innerhalb des Keimepithels (~ 2-3 µm).                                   |
|  | <b>Spermatozoe</b><br><b>(Spermium)</b> | <b>SPZ</b> | Spermien besitzen einen sehr kleinen runden Zellkern und kein sichtbares Cytoplasma. Spermatozoa sind die kleinsten Keimzellen im Hoden (~ 2 µm), und befinden sich normalerweise im Lumen der Samenkanälchen.  |

**Tab. 5:** Beschreibung der unterschiedlichen Zelltypen weiblicher Fische anhand ihres Reifezustandes

|   | Typ                         | Abk. | Beschreibung   |
|---|-----------------------------|------|--|
|    | Oogonium                    | Oo   | Typisch für Oogonien ist neben ihrer geringen Größe und ihrer normalerweise geringen Stückzahl der relativ große Zellkern mit einem sehr kleinen Nucleolus und sehr geringe Cytoplasmamengen               |
| <b>Weibchen</b>   |                             |      |  |
|    | Perinulärer Follikel        | PNF  | Im Verlauf des Oocytenwachstums vergrößert sich der Zellkern und multiple Nucleoli treten in der Peripherie des Zellkerns in Erscheinung. Das Cytoplasma bleibt mehr oder weniger dunkel gefärbt.          |
|   | Kortikal - alveoläre Oocyte | CAO  | Sind größer als PNF und durch das Auftreten von kortikalen Vesikeln (Dottervesikel) im Cytoplasma charakterisiert. Das Chorion ist in dieser Phase gut sichtbar.   |
|  | Frühvitellogene Oocyte      | EVO  | (EVO - <i>early vitellogenic oocyte</i> ) Sind größer als die CAO und durch mittig abgelagerte vitellogene Dottertropfen, welche in der HE-Färbung leuchtend pink angefärbt sind, gekennzeichnet.          |
|  | Spätvitellogene Oocyte      | LVO  | (LVO - <i>late vitellogenic oocyte</i> ) In diesen Zellen sammelt sich zunehmend mehr Dottermaterial an und ersetzt das kortikal-alveoläre Material. Der Nucleolus beginnt in die Peripherie zu wandern.   |
|  | Reife Oocyte                | MVO  | (MVO - <i>mature vitellogenic oocyte</i> ) Vitellogenese und Dottereinlagerung sind abgeschlossen. Reife Eier sind noch größer als spätvitellogene Oocyten. Der Nucleolus ist in die Peripherie gewandert. |

Die gefundenen histopathologischen Effekte wurden außerdem in unterschiedliche Schweregrade eingeteilt (**Tab. 6**).

**Tab. 6:** Tabelle zur Ermittlung der Schweregrade der gefundenen histopathologischen Effekte. Da nicht für alle Veränderungen ein numerisches System verwendet werden kann (n Veränderungen pro Sichtfeld), wurde zwischen einzelnen Veränderungen, räumlichen Veränderungen und generellen Veränderungen unterschieden

|        | <b>einzelne Veränderungen</b>                 | <b>räumliche Veränderungen</b>   | <b>generelle Veränderungen</b>   |
|--------|---|--|--|
| Grad 1 | 0-2 Veränderungen im Sichtfeld                | Die Veränderung betrifft ein minimales Gebiet oder einen bestimmten Gewebetyp                                  | Es handelt sich um die geringste wahrnehmbare generelle Veränderung im Vergleich zu den Kontrollen |
| Grad 2 | 3-5 Veränderungen im Sichtfeld                | Die Veränderung betrifft einen größeren Bereich als bei Grad 1 aber weniger als 25 % des Bereichs oder Gewebes | Die Veränderung ist wahrnehmbar, aber nicht dramatisch   |
| Grad 3 | 6-8 Veränderungen im Sichtfeld                | Die Veränderung betrifft mehr als 25 % aber weniger als 50 % des Bereichs oder Gewebes                         | Die Veränderung ist dramatisch, aber eine stärkere Veränderung ist durchaus vorstellbar            |
| Grad 4 | 9 oder mehr dieser Veränderungen im Sichtfeld | Die Veränderung betrifft mehr als 50 % des Bereichs oder Gewebes   | Es handelt sich um die stärkste vorstellbare Veränderung   |

## 2.8 Vitellogeninmessung

Die Vitellogeninmessung in Kopf und Schwanz der Zebrafische wurde von Dr. Hendrik Holbech an der University of South Denmark in Odense, Dänemark durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein nicht kompetitiver Sandwich-ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) mit Zebrafisch-spezifischem polyklonales Anti-Lipovitellin Antiserum durchgeführt.

Die gefrorenen Proben wurden in flüssigen Stickstoff überführt und mit einem Tissueliser homogenisiert. Anschließend wurde eisgekühlter Homogenisierungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4 mit 1 % Protease) hinzu gefügt. Dieses Homogenat wurde 60 min bei 50.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Glaswolle gefiltert und in Aliquots bei -80°C aufbewahrt. Die für den ELISA vorgesehenen Mikrotiterplatten wurden mit 150 µl/well Anti-Zebrafisch Lipovitellin-IgG beschichtet, welcher zuvor mit Beschichtungspuffer (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) auf 5 µg/L (500 ml PBS-Stammlösung, 5 g BSA, 5 ml TWEEN) verdünnt wurde. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Platten geleert und dreimal mit PBS (160 g NaCl, 4 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26,6 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g KCl, pH 6,8 und mit Milliporewasser auf 2 L aufgefüllt) gewaschen.

Anschließend wurden die freien Bindungsstellen durch Zugabe von 250 µl PBS mit 3 % BSA blockiert. Die Platten wurden dazu erneut über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (500 ml PBS-Stammlösung, 5 g BSA, 5 ml TWEEN, auf 5 L mit Milliporewasser aufgefüllt, pH 7,4). Die Platten wurden getrocknet indem sie kopfüber in ein Handtuch ausklopft wurden und danach bis zur weiteren Verwendung bei 20°C aufbewahrt.

Für den Standard wurde „Battelle Zebrafisch Standard“ AP4.6.04 (1,18 mg/L) auf 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 mg/ml mit Verdünnungspuffer (100 ml PBS-Stammlösung, 0,3 g BSA, 1 ml TWEEN 20 aufgefüllt auf 1 l mit Milliporewasser, pH 7,3). Zur Vermeidung eines Matrixeffekts wurden die Proben mindestens um den Faktor 200 mit Verdünnungspuffer verdünnt und anschließend in die Platten pipettiert.

Der Standard wurde mit 150 µl/Well in 2 Replikaten, die Versuchsproben mit 3 Replikaten angelegt. Die Platten wurden erneut über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Nach anschließendem fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer (500 ml PBS-Stammlösung, 5 g BSA, 5 ml TWEEN, auf 5 L mit Milliporewasser aufgefüllt, pH 7,4). AMDEX (an Dextran gekoppelte *horseradish* Peroxidase konjugierte Antikörper) wurden mit Waschpuffer verdünnt, wobei die eingesetzte Verdünnung mit Alter und Charge variierte. Pro Well wurden 150 µl dieser Lösung eingesetzt. Danach erfolgten 5 Waschschrte mit Waschpuffer und anschließend wurden 150 µl TMB plus (KemEnTech, Dänemark) in die Wells pipettiert. Die Platten wurden mit Alufolie vor Licht geschützt und die Farbveränderung beobachtet während die Platten auf einem Schüttler inkubierten. Danach wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 150 µl 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Well.

Die Absorption wurde mit einem Molecular Devices Thermomax Plattenreader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Daten wurden mit der Thermomax Software analysiert.

## 2.9 Analytik

Zur Überprüfung der Realkonzentrationen in den Testbecken wurden wöchentlich je 1 L Analytikproben pro Konzentration sowie Wasserproben zum Abgleich mit dem an der LUBW durchgeführten ER-CALUX -Tests entnommen (je 0,5 L).

Details zu den Probenahmen sind **Tab. 7** zu entnehmen.

**Tab. 7:** Zeitplan zur Entnahme von Wasserproben im Rahmen des EE2-FSDT an der Universität Heidelberg

| <b>Probe Nr.</b> | <b>Datum</b> | <b>Replik 1</b>  | <b>Replik 2</b>  |
|------------------|--------------|------------------|------------------|
| 1                | 10.1.2011    | Analytik & CALUX |                  |
| 2                | 13.1.2011    | Analytik & CALUX |                  |
| 3                | 17.1.2011    |                  | Analytik & CALUX |
| 4                | 24.1.2011    | Analytik & CALUX |                  |
| 5                | 31.1.2011    |                  | Analytik & CALUX |
| 6                | 7.2.2011     | Analytik & CALUX |                  |
| 7                | 14.2.2011    |                  | Analytik & CALUX |
| 8                | 21.1.2011    | Analytik & CALUX |                  |
| 9                | 28.1.2011    |                  | Analytik & CALUX |
| 10               | 7.3.2011     | Analytik & CALUX |                  |

---

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Wasserparameter

Wasserhärte, Leitfähigkeit, pH und Gesamthärte wurden zu Beginn und am Ende des Expositionszeitraumes ermittelt (**Tab. 8**). Der Sauerstoffgehalt in den Testaquarien wurde wöchentlich (**Tab. 9**), die Temperatur täglich gemessen. Alle Werte deckten sich mit den Vorgaben der OECD-Guideline. Die Werte der Temperaturmessung sind **Tab. 17** im Anhang (Seite 38) zu entnehmen.

**Tab. 8:** pH-Wert, Gesamthärte und Leitfähigkeit im FSDT EE2 mit dem Zebrafisch gemessen zum Teststart (10.1.2011) und Testende (11.3.2011)

|       | pH - Wert | Gesamthärte (°dH) | Leitfähigkeit (µS) |
|-------|-----------|-------------------|--------------------|
| Start | 8,13      | 18                | 547                |
| Ende  | 8,02      | 17                | 503                |

**Tab. 9:** Sauerstoffsättigung (%) der einzelnen Testtanks im FSDT EE2 mit dem Zebrafisch

| Datum/Becken | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 7.1.2011     | 95,3 | 96,1 | 95,8 | 96,2 | 96,7 | 95,4 | 96,2 | 96,9 | 95,3 | 94,9 |
| 14.1.2011    | 96,1 | 94,9 | 96,1 | 96,8 | 95,6 | 90,1 | 92,6 | 95,8 | 95,7 | 90,1 |
| 21.1.2011    | 95,6 | 96,3 | 96,8 | 94,1 | 93,7 | 95,8 | 90,5 | 96,7 | 91,0 | 92,3 |
| 28.1.2011    | 96,6 | 95,7 | 91,3 | 91,6 | 89,2 | 93,2 | 91,8 | 94,1 | 87,6 | 94,8 |
| 4.2.2011     | 94,3 | 97,9 | 92,8 | 88,5 | 97,0 | 89,4 | 95,3 | 93,5 | 94,2 | 91,7 |
| 11.2.2011    | 93,4 | 96,5 | 95,3 | 90,3 | 89,6 | 88,4 | 94,7 | 89,1 | 93,4 | 89,6 |
| 18.2.2011    | 94,7 | 96,8 | 96,8 | 92,5 | 93,9 | 90,1 | 90,5 | 89,4 | 91,8 | 85,2 |
| 25.2.2011    | 90,1 | 94,2 | 89,6 | 91,8 | 96,3 | 90,5 | 91,6 | 90,1 | 89,4 | 96,1 |
| 4.3.2011     | 92,2 | 93,8 | 95,4 | 87,3 | 89,3 | 93,8 | 88,3 | 93,4 | 90,1 | 95,8 |
| 11.3.2011    | 91,9 | 90,4 | 91,3 | 90,7 | 85,5 | 85,2 | 86,4 | 96,5 | 89,2 | 96,2 |

Die Sauerstoffsättigung lag über den Versuchszeitraum mit durchschnittlich bei  $92,9 \pm 3,1$  % O<sub>2</sub> innerhalb der Vorgaben der OECD.

#### 3.2 Analytik

**Tab. 10** zeigt, dass die Werte speziell in den höheren Konzentrationen deutliche Schwankungen aufwiesen. Allerdings wurden am 31.1.2011 und am 7.2.2011 die Proben über den

Beckenablauf entnommen, was eine mögliche Ursache für die zu diesem Zeitpunkt deutlich erhöhten EE2-Werte war. Dies wurde durch die Probenahme am 15.2.2011 bestätigt, da zu diesem Zeitpunkt in der höchsten Konzentration sowohl Proben aus dem Ablauf als auch direkt aus dem Becken genommen wurde. Die Analyse zeigte, dass der Wert der Ablaufprobe 2,5fach höher war als im Becken selbst (1,5 vs. 0,6 ng/L EE2). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnten Adsorptions- und Rücklösungsprozesse in den Gazezetzen, Plastikrohren und Schläuchen des Ablaufs sein.

**Tab. 10:** Analytikergebnisse FSDT EE2 mit dem Zebrafisch: **rot** - Werte außerhalb der 20 % Toleranzgrenze. (\*) Wasserproben wurden aus Aquarienablauf entnommen. Proben ohne Klammern sind Schöpfproben direkt aus dem Aquarium. \*\* Wegen Luft in der Leitung wurde direkt vor der Probenahme der Rotameter aufgedreht, was in einer erhöhten Zufuhr von unbelastetem Aquarienwasser resultierte. \*\*\* Probleme beim Einstellen der Wasserzufuhr

\*\*\*\*von BDS mit ER-CALUX bestimmt

| Datum     | Kontrolle |          | 0,1 ng/L EE2 |         | 0,5 ng/L EE2 |         | 1 ng/L EE2 |             |
|-----------|-----------|----------|--------------|---------|--------------|---------|------------|-------------|
|           | Repl. 1   | Repl. 2  | Repl. 1      | Repl. 2 | Repl. 1      | Repl. 2 | Repl. 1    | Repl. 2     |
| 10.1.2011 | < 0,1     |          | 0,1          |         | 0,5          |         | 1          |             |
| 13.1.2011 | < 0,1     |          | 0,1          |         | 0,5          |         | 1          |             |
| 17.1.2011 |           | < 0,1    |              | 0,1     |              | 0,6     |            | 1,2         |
| 24.1.2011 | < 0,1     |          | 0,1          |         | 0,6          |         | 1,2        |             |
| 31.1.2011 |           | (< 0,1*) |              | (0,2*)  |              | (0,9*)  |            | (1,7*)      |
| 7.2.2011  | < 0,1     |          | (0,2*)       |         | (0,9*)       |         | (1,7*)     |             |
| 15.2.2011 |           | < 0,1    |              | 0,1     |              | 0,4     |            | 0,6 (1,5**) |
| 21.2.2011 | < 0,1     |          | 0,1          |         | 0,3***       |         | 0,8        |             |
| 28.2.2011 |           | < 0,1    |              | 0,1     |              | 0,3     |            | 0,6         |
| 7.3.2011  | < 0,1     |          | 0,1          |         | 0,51****     |         | 0,6        |             |

Dennoch liegen die Werte der letzten drei Probenahmen für die beiden höchsten Konzentrationen nur bei 60 % des Sollwertes. Da die Versuchsanlage in diesem Zeitraum keine außergewöhnlichen Unregelmäßigkeiten aufwies, könnte als Ursache für diesen Rückgang Abbauprozesse in der Stammlösung vermutet werden. Allerdings würde dies den Erfahrungen an der Universität Heidelberg widersprechen, da in vorangegangenen Tests mit EE2 ein Abbau in den Stammlösungen nie ein Problem darstellte. Außerdem hätte sich ein solcher Abbau auch in der niedrigsten Konzentration bemerkbar machen müssen. Eine weitere Erklärung könnte eine veränderte Mikrobiologie in den Testbecken der höheren Konzentrationen

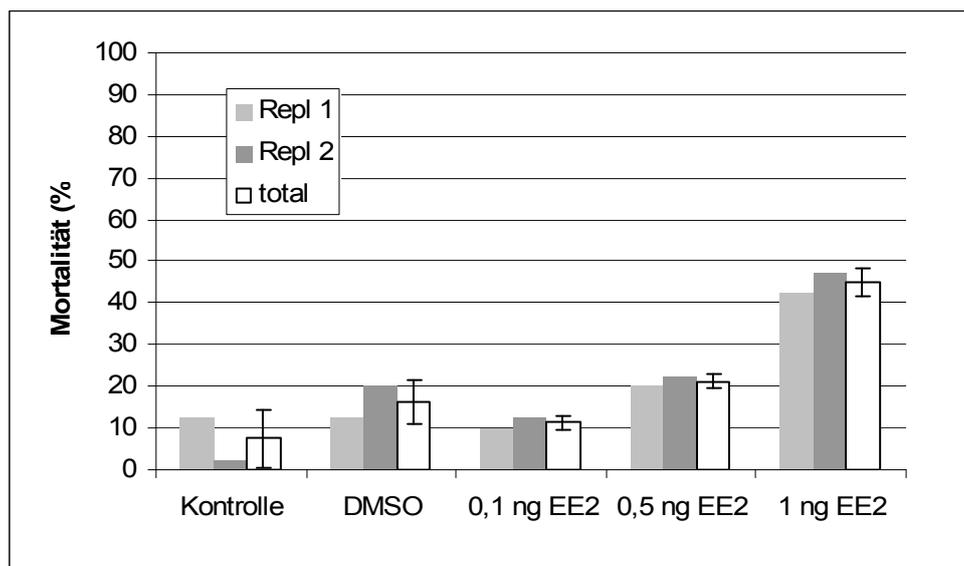
darstellen, bei der ein verstärkter Abbau von EE2 stattfindet. Aufgrund der niedrigen Konzentrationen die verwendet wurden, könnte sich dies durchaus bemerkbar machen.

Die letzte Probe mit 0,5 ng/L wurde beim Transport vertauscht und konnte somit nicht chemisch gemessen werden. Nach dem ER-CALUX-Zelltest lag sie im Sollbereich.

### 3.3 Schlupferfolg und Mortalität

Die Mortalität der Wasser- und DMSO-Kontrollen lag im Mittelwert unter 15 % und somit deutlich unterhalb des von der OECD akzeptierten Wertes von 30 % für die Kontrollgruppen. Die Ergebnisse zeigten zwar einen leichten Trend zu erhöhter Mortalität bei 1 ng/L, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (**Abb. 5**).

Die Larvmortalität lag in allen Versuchsbecken bei unter 3 %. Eine Ausnahme bildete das 2. Replikat der 0,1 ng/L EE2 Versuchsgruppe: hier waren am Tag 3 insgesamt 2 Eier (5 %) koaguliert. Die höchste Mortalität konnte allerdings im Zeitraum um Tag 11 beobachtet werden. Dieser Zeitpunkt deckt sich mit der Futterumstellung von reinem Staubfutter auf *Artemia Nauplii*, welcher erfahrungsgemäß einen kritischen Übergang für die Fischlarven darstellt.



**Abb. 5:** Mortalität der Fische im FSDT mit EE2 bei Versuchsende. Die Ergebnisse zeigten zwar einen leichten Trend zu erhöhter Mortalität bei 1 ng/L, jedoch war dieser nicht signifikant.

Die Larven schlüpften zwischen 72-120 hpf (Stunden nach der Befruchtung), also in einem Zeitraum von 48 h. Dabei konnten keine konzentrationsabhängigen Unterschiede beobachtet werden. Die durchschnittliche Anzahl der geschlüpften Larven betrug 20 Larven pro Tag.

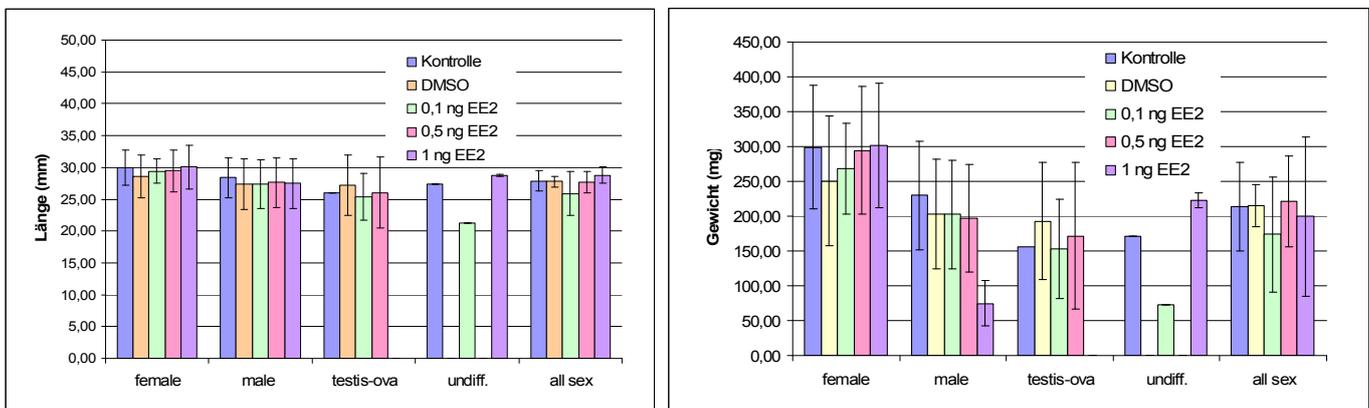
### 3.4 Verhaltensstörungen und Missbildungen

Während der Exposition mit EE2 konnten weder Verhaltensstörungen noch Missbildungen bei den Versuchsfischen im FSDT beobachtet werden.

### 3.5 Länge und Gewicht

Bei Testende konnten weder bei der Länge noch beim Gewicht der Fische aus den einzelnen Versuchsgruppen und Replikaten signifikante Unterschiede festgestellt werden (**Abb. 6 und 7**). Die durchschnittliche Länge betrug bei den Weibchen  $29,5 \pm 0,56$  mm, die Männchen waren mit  $27,6 \pm 0,47$  mm im Schnitt etwa 6,5 % kleiner als die den Weibchen. Die Fische mit *Testis-ova* waren mit  $26,4 \pm 3$  mm etwa 11 % kleiner als die Weibchen und die Fische mit undifferenzierten Gonaden mit  $25,8 \pm 3,9$  mm sogar 12,5 % kleiner.

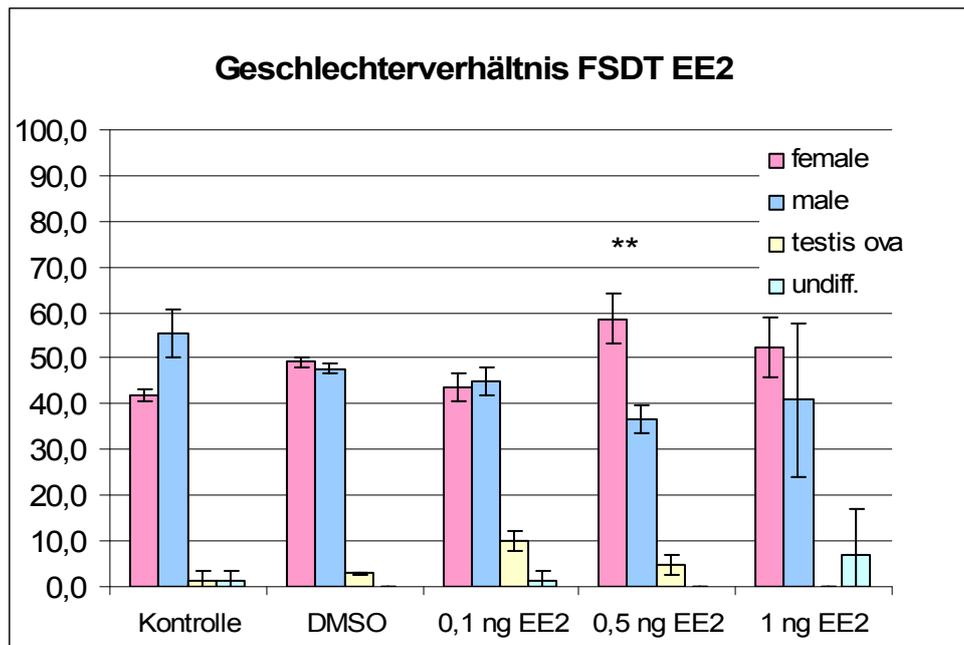
Noch deutlicher waren die Unterschiede beim Körpergewicht. Während die Weibchen durchschnittlich  $283,1 \pm 22,1$  mg wogen, lag das Gewicht der Männchen mit  $204,5 \pm 15,3$  mg fast 28 % niedriger, die Fische mit *Testis-ova* lagen mit einem Körpergewicht von  $170,9 \pm 56,2$  mg fast 40 %, bei den Fischen mit undifferenzierter Gonade mit  $155,2 \pm 76,5$  mg 45 % niedriger als bei den Weibchen.



**Abb. 6 und 7:** Länge und Gewicht der Fische im FSdT mit EE2 bei Versuchsende. Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede.

### 3.6 Geschlechterverhältnis

Das Geschlechterverhältnis schwankte bereits zwischen Wasser- und Lösungsmittelkontrolle auffällig (**Abb. 8**). So lag es bei den Wasserkontrollen bei einem Verhältnis von 42:55 Weibchen/Männchen. Außerdem war im 1. Replikat je ein Fisch (1,4 %) mit undifferenzierter Gonade und mit Zwittergonade zu finden. In der DMSO-Kontrolle verschob sich das Geschlechterverhältnis zu einem höheren Weibchenanteil: hier waren etwa 49 % der Fische Weibchen. Allerdings war hier auch der Anteil der Fische mit Zwittergonaden mit 3 % etwa doppelt so hoch wie in der Kontrolle. Undifferenzierte Gonaden wurden hier nicht beobachtet.



**Abb. 8:** Geschlechterverhältnis der Fische im FSDT mit EE2 bei Versuchende. Signifikanzen als Abweichung von der Wasserkontrolle. Es konnte keine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachtet werden. (Signifikanzen mit *One-Way-Anova* \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )

Innerhalb der übrigen Expositionsgruppen konnte kein eindeutiger Trend beobachtet werden. Zwar wies die mittlere Expositionsgruppe nach Belastung mit 0,5 ng/L EE2 einen signifikant erhöhten Weibchenanteil gegenüber der Wasserkontrolle auf, nicht jedoch gegenüber der DMSO-Kontrolle, so dass dieser Veränderung nur eine geringe Bedeutung zukommt. In der höchsten Konzentration (1 ng/L EE2) war das Geschlechterverhältnis zwar ebenfalls in Richtung der Weibchen verschoben, jedoch war diese Veränderung nicht signifikant. Allerdings war hier auch die höchste Mortalität im Test zu beobachten, was möglicherweise auch Einfluss auf das Geschlechterverhältnis, in jedem Fall aber auf die statistische Aussagekraft hat. Außerdem scheint EE2 eine gewisse entwicklungsverzögernde Wirkung zu besitzen, da in der höchsten Konzentration der Anteil der undifferenzierten Gonaden mit fast 7 % am höchsten war.

Dennoch scheinen insbesondere niedrige EE2 Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die Gonadenentwicklung zu haben, da der Anteil der Zwittergonaden in der gegenüber 0,1 ng/L EE2 exponierten Versuchsgruppe mit fast 10 % am höchsten lag. Diese Veränderung ist in der mittleren Konzentration zwar ebenfalls vorhanden, aber mit knapp 5 % deutlich schwächer ausgeprägt.

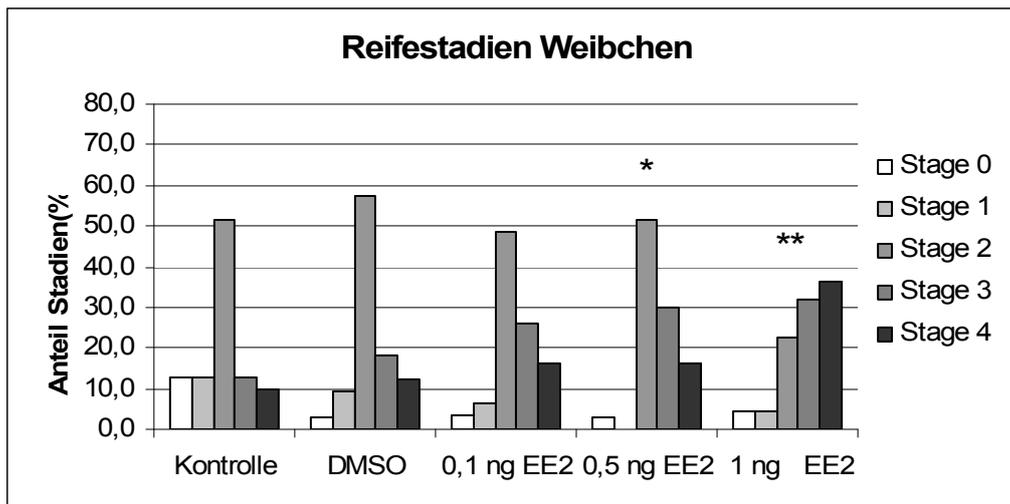
### 3.7 Reifegrade

Die Reifestadien wurden gemäß **Tab. 11** eingeteilt. Die histologische Untersuchung der Gonaden ergab bei beiden Geschlechtern eine dosisabhängige Veränderung der Gonadenreife nach Exposition gegenüber EE2.

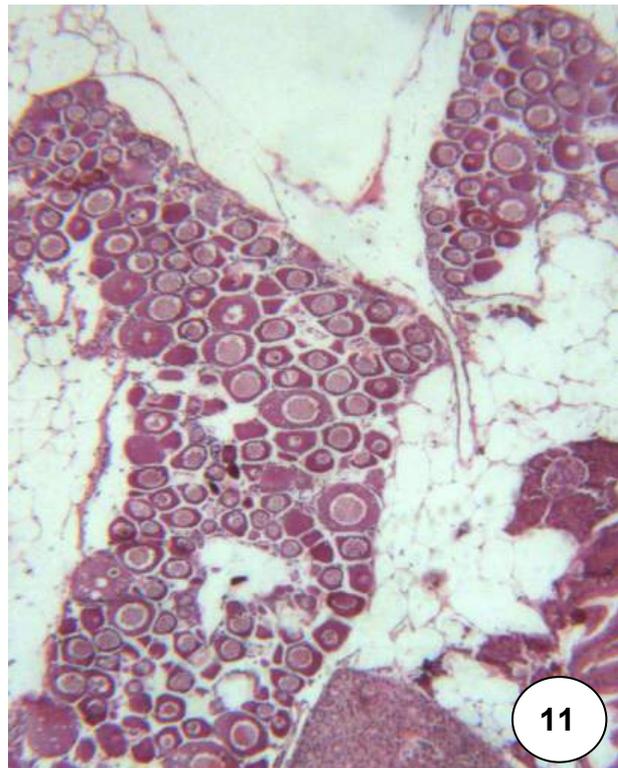
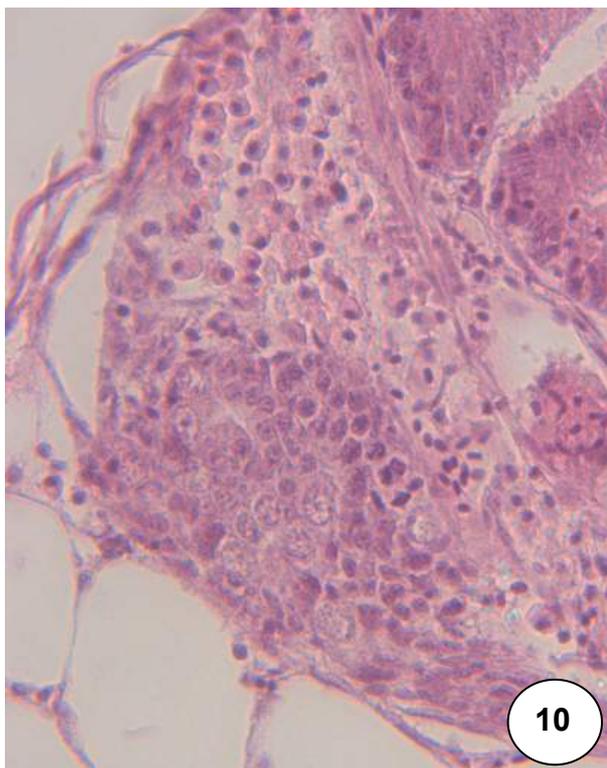
Bei den Weibchen konnte ein dosisabhängiger Anstieg der Ovarienreife ab einer Konzentration  $\geq 0,1$  ng/L EE2 beobachtet werden (**Abb. 9**). Der prozentuale Anteil an Weibchen in der höchsten Reifestufe (Stage 4) stieg dosisabhängig an und hatte sich in der höchsten Konzentration im Vergleich zur Kontrolle verdreifacht. Auch der Anteil der Stage 3 Weibchen erhöhte sich kontinuierlich und dosisabhängig. Dagegen sank der Anteil der Stage 2 Weibchen in der höchsten Konzentration um die Hälfte. Diese Verschiebungen gegenüber den Kontrollweibchen war nach Belastung mit 0,5 ng/L EE2 signifikant (\*  $p = 0,022$ ), in der höchsten Konzentration war der Unterschied sogar noch deutlicher (\*\* $p = 0,004$ ).

**Tab. 11:** Beschreibung der Reifestadien für männliche und weibliche Gonaden

| Reifestadien           | Weibchen  | Männchen   |
|------------------------|---|--|
| <b>Undifferenziert</b> | Die Gonade besteht nur aus Oogonien. In diesem Stadium ist das Geschlecht kaum zu unterscheiden ( <b>Abb. 10</b> ).   |  |
| <b>Stadium 0</b>       | Unreif - das Ovar besteht ausschließlich aus unreifen (Oogonien und Perinukläre Follikel) Zellstadien. Es sind noch keine kortikal-alveolären Stadien vorhanden ( <b>Abb. 11</b> ).                                     | Unreif - es sind ausschließlich unreife Zellstadien (Spermatogonien und Spermatozyten) vorhanden. Spermatozoen (Spermien) fehlen vollständig ( <b>Abb. 16</b> ). |
| <b>Stadium 1</b>       | Frühes Entwicklungsstadium - die Mehrheit (> 90 % des Gesamtquerschnitts) sind prävitellogene Follikel, → die Gonade besteht überwiegend aus perinuklären Follikeln und kortikal-alveolären Oocyten ( <b>Abb. 12</b> ). | Frühe Spermatogenese - die unreifen Zellstadien überwiegen, jedoch können vereinzelt bereits Spermatozoen auftreten ( <b>Abb. 17</b> ).                          |
| <b>Stadium 2</b>       | Mittleres Entwicklungsstadium - mindestens die Hälfte der Follikel sind in einem frühen bis mittleren vitellogenen Stadium ( <b>Abb. 13</b> ).  | Mittlere Spermatogenese: - Spermatozyten, Spermatoziden und Spermatozoen sind zu etwa gleichen Anteilen vorhanden ( <b>Abb. 18</b> ).                            |
| <b>Stadium 3</b>       | Spätes Entwicklungsstadium - der Großteil der Follikel ist im spätvitellogenen Stadium ( <b>Abb. 14</b> ).  | Späte Spermatogenese - alle Stadien können vorhanden sein, jedoch dominieren die Spermatozoen ( <b>Abb. 19</b> ).  |
| <b>Stadium 4</b>       | Reife Gonade - der Großteil der Follikel ist im spätvitellogenen Stadium. bzw. reif; verglichen mit Stadium 3 sind die Follikel größer ( <b>Abb. 15</b> ).  |  |

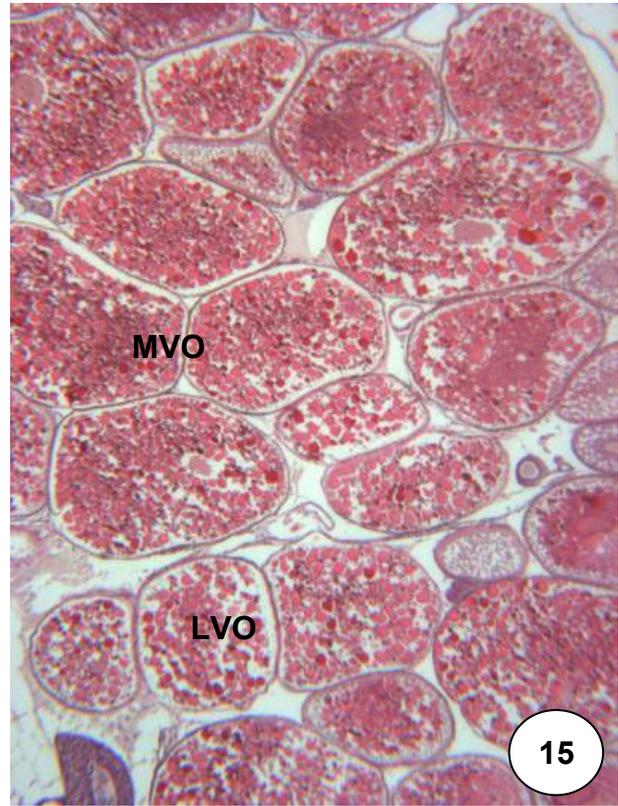
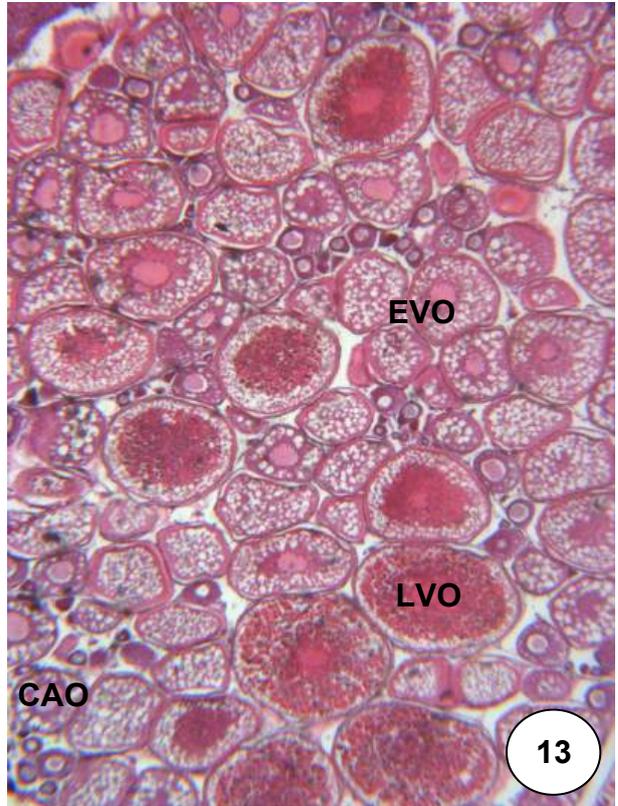


**Abb. 9:** Reife der Gonaden der Zebrafischweibchen im FSĐT nach Belastung mit EE2. In der höchsten Konzentration ist der Anteil der Weibchen mit einer Gonade im Reifestadium 4 signifikant erhöht. (Signifikanzen mit One-Way-Anova \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )



**Abb. 10: Undifferenzierte Gonade, 1 ng/L EE2:** die Gonade besteht ausschließlich aus unreifen Keimzellen. Das Geschlecht kann nicht bestimmt werden, 370 fache Vergrößerung.

**Abb. 11: Weibliche Gonade, Stadium 0, Kontrolle:** Im Ovar sind nur perinukleoläre Follikel (PNF) zu finden. 150 fache Vergrößerung



## Abbildungen Seite 20

---

**Abb. 12: Weibliche Gonade, Stadium 1, DMSO:** Frühes Entwicklungsstadium - die Gonade besteht überwiegend aus perinukleoläre Follikeln, einige weiterentwickelte Stadien (\*, CAO, *cortical alveolar oocytes*) sind jedoch ebenfalls vorhanden. 150 fache Vergrößerung

**Abb. 13: Weibliche Gonade, Stadium 2, Kontrolle:** Mittleres Entwicklungsstadium - mindestens die Hälfte der Follikel sind in einem frühen bis mittleren vitellogenen Stadium (EVO - early vitellogenic oocytes, LVO - late vitellogenic oocytes). 60 fache Vergrößerung

**Abb. 14: Weibliche Gonade, Stadium 3, DMSO:** Spätes Entwicklungsstadium - der Großteil der Follikel ist im spätvitellogenen Stadium. 60 fache Vergrößerung

**Abb. 15: Weibliche Gonade, Stadium 4, Kontrolle:** Reife Gonade - der Großteil der Follikel ist im spätvitellogenen Stadium (LVO - late vitellogenic oocytes) bzw. reif (MVO- *mature vitellogenic oocytes*); verglichen mit Stadium 3 sind die Follikel größer. 60 fache Vergrößerung

## Abbildungen Seite 22

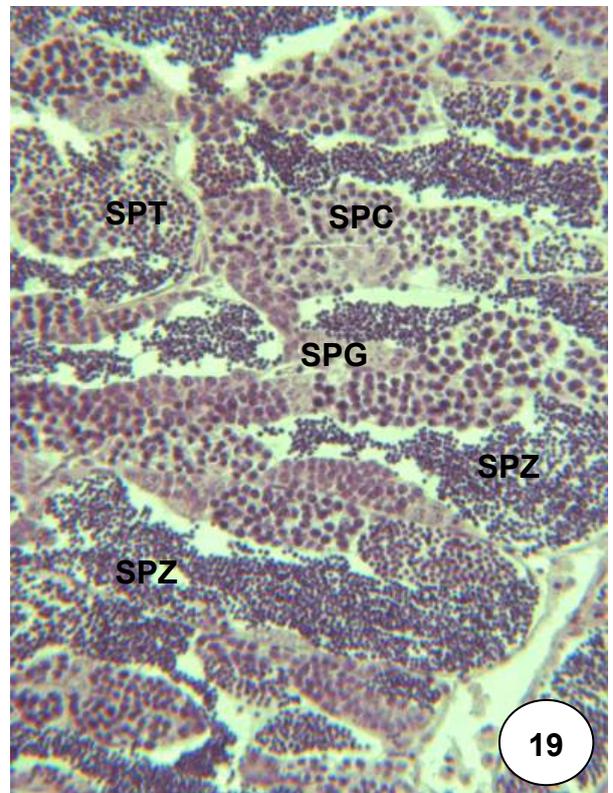
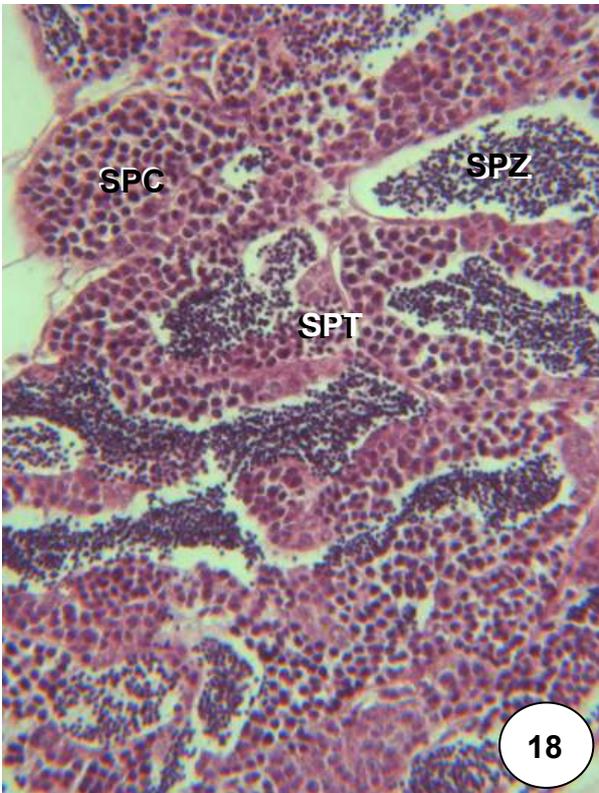
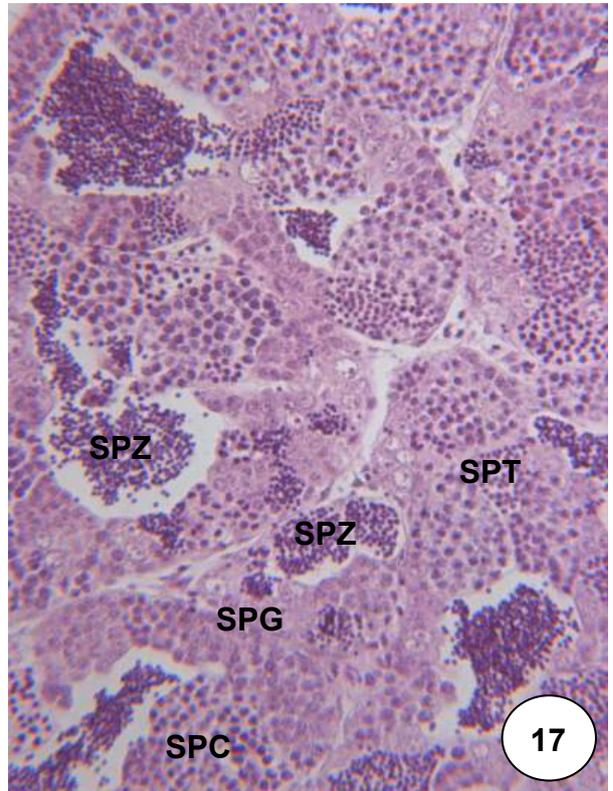
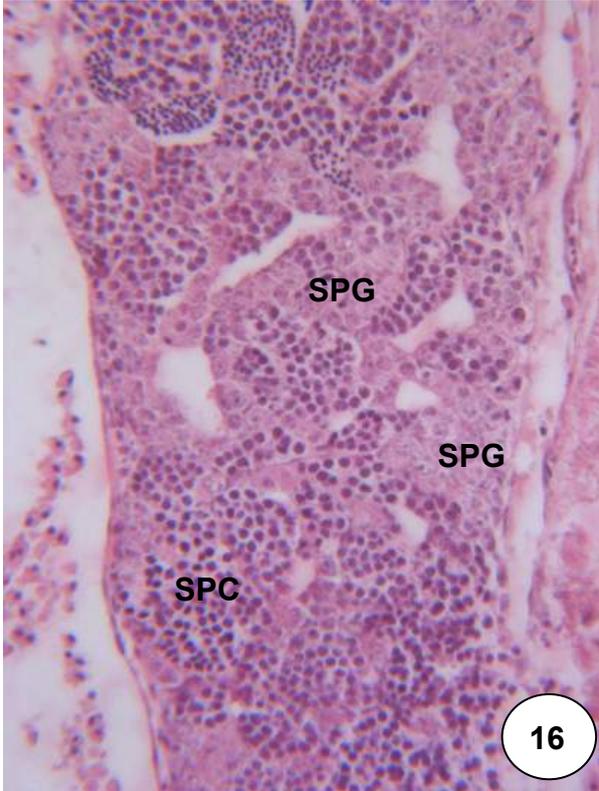
---

**Abb. 16: Männliche Gonade, Unreif, 0,1 ng/L EE2:** Es sind ausschließlich unreife Zellstadien (SPG - Spermatogonien und SPC - Spermatocyten) vorhanden. Spermatozoen (Spermien) fehlen vollständig. 370 fache Vergrößerung

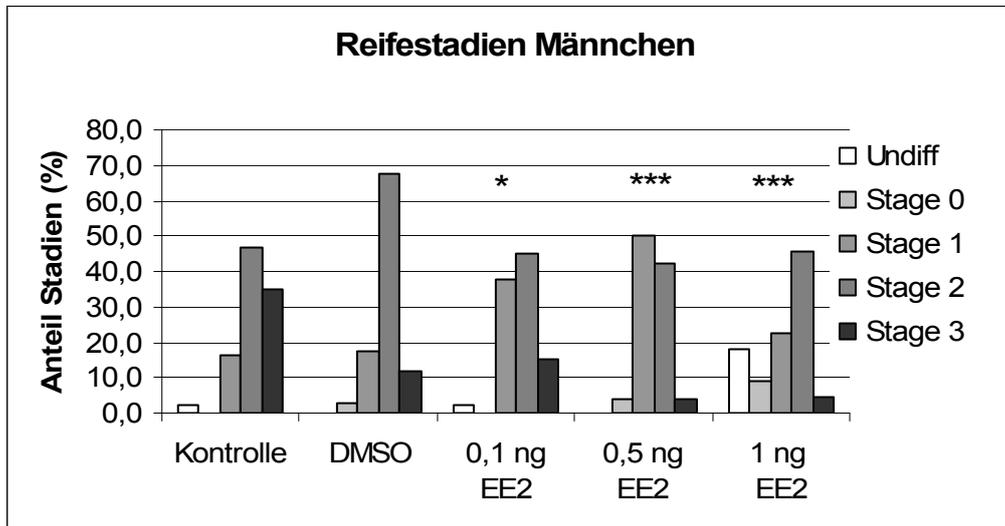
**Abb. 17: Männliche Gonade, Stadium 1, DMSO:** Frühe Spermatogenese - die unreifen Zellstadien überwiegen (SPG - Spermatogonien und SPC - Spermatocyten und SPT - Spermatidien), jedoch können vereinzelt bereits Spermatozoen (SPZ) auftreten. 370 fache Vergrößerung

**Abb. 18: Männliche Gonade, Stadium 2, DMSO:** Mittlere Spermatogenese: - Spermatocyten (SPC), Spermatidien (SPT) und Spermatozoen (SPZ) sind zu etwa gleichen Anteilen vorhanden die Gonade besteht überwiegend aus perinukleoläre Follikel, einige weiterentwickelte Stadien (CAO, *cortical alveolar oocytes*) sind jedoch ebenfalls vorhanden. 370 fache Vergrößerung

**Abb. 19: Männliche Gonade, Stadium 3, DMSO:** Späte Spermatogenese - alle Stadien können vorhanden sein, jedoch dominieren die Spermatozoen. 370 fache Vergrößerung



Bei den Männchen war diese Veränderung sogar noch deutlicher (**Abb. 20**). Hier bewirkte die Belastung mit EE2 im Vergleich zu den Kontrollen eine verringerte Hodenreife, die bereits bei der niedrigsten Expositionsgruppe signifikant (\* $p = 0,02$ ) war. So war in der Kontrolle der Anteil der Männchen mit einem Hoden im Stadium 3 fast 8-mal höher als in der höchsten Konzentration. Umgekehrt stieg die Anzahl der undifferenzierten Gonaden in der höchsten Konzentration fast um das siebenfache.



**Abb. 20:** Reife der Gonaden der Zebrafischmännchen im FSOT nach Belastung mit EE2. Die Hodenreife sinkt mit steigender EE2-Konzentration. (Signifikanzen mit *One-Way-Anova* \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )

### 3.8 Histopathologische Veränderungen

Die Untersuchung der Fischgonaden ergab nach Belastung mit EE2 einige geringgradige bis deutliche histopathologische Veränderungen (**Tab. 12**). Die Anzahl der gefundenen Einzelveränderungen (ohne Berücksichtigung der Schwere der Veränderung) unterschied sich bei den Weibchen ab einer Konzentration  $\geq 0,5$  ng/L EE2 hochsignifikant (\*\* $p < 0,001$ ) von den Kontrolltieren. Bei den Männchen war die Anzahl der Einzelfunde nur bei der gegenüber 0,5 ng/L EE2 exponierten Gruppe signifikant erhöht (\* $p = 0,025$ ).

#### **Kontrolle**

Männliche wie auch weibliche Kontrolltiere zeigten nur vereinzelt geringfügige Veränderungen (Schweregrad 1).

Bei den männlichen Kontrolltieren konnte vereinzelt eine minimale Fibrotisierung des Hodengewebes beobachtet werden. Ansonsten waren die Kontrollmännchen unauffällig.

Bei 10 % der Kontrollweibchen konnte eine geringfügige Ansammlung von proteinartiger Flüssigkeit im Ovar beobachtet werden, welches vermutlich auf den Abbau nicht abgelaichter

Eier zurückzuführen ist. Ein geringfügiges Auftreten von als „Cysten“ bezeichnete Hohlräume in der Gonade, konnte bei 16 % der Kontrollweibchen beobachtet werden. Diese Hohlräume waren entweder mit proteinartiger Flüssigkeit gefüllt oder leer; wahrscheinlich handelt es sich um die Reste zerstörter Eier. Solche Cysten sind deswegen als Sonderform der Atresie von Eiern zu betrachten.

**Tab. 12:** Histopathologische Veränderungen nach Exposition gegenüber EE2 im FSDT nach Schweregraden in %. (Signifikanzberechnung mit *One-Way-Anova* \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001)

|  | Schweregrad   | Kontrolle   | DMSO        | 0,1 ng/L EE2 | 0,5 ng/L EE2   | 1 ng/L EE2     |
|--|---------------|-------------|-------------|--------------|----------------|----------------|
| <b>Mittel Effekte pro Tier</b>         |               | <b>0,2</b>  | <b>0,1</b>  | <b>0,3</b>   | <b>0,7 *</b>   | <b>0,5</b>     |
| <b>Zunahme Spermatozyten</b>           | 1             | <b>2,3</b>  | <b>2,9</b>  |              |                |                |
| <b>Zunahme Spermatozoen</b>            | 1             | 4,7         |             |              | 3,8            | 4,5            |
|  | 2             |             |             |              |                | 4,5            |
|  | <b>gesamt</b> | <b>4,7</b>  |             |              | <b>3,8</b>     | <b>9,1</b>     |
| <b>Abnahme Spermatozoen</b>            | 1             | <b>2,3</b>  |             |              |                |                |
|  | 1             | 2,3         | 2,9         |              | 7,7            | 4,5            |
|  | 2             |             |             |              |                | 4,5            |
|  | 3             |             |             |              | 19,2           | 9,1            |
|  | <b>gesamt</b> | <b>2,3</b>  | <b>2,9</b>  |              | <b>26,9 *</b>  | <b>18,2</b>    |
| <b>Testes ova</b>                      | 1             | 2,3         |             | 7,5          | 7,7            |                |
|  | 2             |             |             | 5            | 3,8            | 4,5            |
|  | 3             |             |             | 2,5          |                |                |
|  | 4             |             |             | 2,5          |                |                |
|  | <b>gesamt</b> | <b>2,3</b>  |             | <b>17,5</b>  | <b>11,5</b>    | <b>4,5</b>     |
| <b>Zunahme Sertolizellen</b>           | 1             | <b>7,0</b>  |             |              |                | <b>4,5</b>     |
| <b>Fibrose</b>                         | 1             | <b>2,3</b>  |             | <b>5,0</b>   |                |                |
| <b>Hodendegeneration</b>               | 1             |             |             |              | 15,4           |                |
|  | 2             |             |             | 2,5          |                |                |
|  | <b>gesamt</b> |             |             | <b>2,5</b>   | <b>15,4</b>    |                |
| <b>Mittel Effekte pro Tier</b>         |               | <b>0,5</b>  | <b>0,4</b>  | <b>0,9</b>   | <b>1,5 ***</b> | <b>1,8 ***</b> |
| <b>Atresie unreife Follikel</b>        | 1             | 19,4        |             | 22,6         | 13,5           | 18,2           |
|  | 2             | 3,2         |             |              |                |                |
|  | <b>gesamt</b> | <b>22,6</b> |             | <b>22,6</b>  | <b>13,5</b>    | <b>18,2</b>    |
| <b>Atresie reife Follikel</b>          | 1             | <b>3,2</b>  |             | <b>3,2</b>   |                |                |
| <b>Cysten (Sonderform der Atresie)</b> | 1             | 9,7         | 18,2        | 19,4         | 13,5           | 40,9           |
|  | 2             |             | 3,0         | 3,2          | 10,8           | 4,5            |
|  | <b>gesamt</b> | <b>9,7</b>  | <b>21,2</b> | <b>22,6</b>  | <b>24,3**</b>  | <b>45,5</b>    |
| <b>Proteinartige Flüssigkeit</b>       | 1             | 9,7         | 9,1         | 22,6         | 24,3           | 50,0           |
|  | 2             |             | 3,0         |              | 8,1            | 9,1            |
|  | <b>gesamt</b> | <b>9,7</b>  | <b>12,1</b> | <b>22,6</b>  | <b>32,4</b>    | <b>59,1 **</b> |
| <b>Interstitielle Fibrose</b>          | 1             | 6,5         |             |              | 32,4           | 40,9           |
|  | 2             |             |             |              | 10,8           | 9,1            |
|  | 3             |             |             |              |                | 4,5            |
|  | <b>gesamt</b> | <b>6,5</b>  |             |              | <b>43,2 **</b> | <b>54,5</b>    |

### **Lösungsmittel (DMSO-)Kontrolle**

Der histologische Befund der Lösungsmittelkontrolle entsprach im Wesentlichen dem der Wasserkontrolle. Bei den Männchen war das einzig Auffällige die minimale Ausbildung von Zwittergonaden (*Testis-ova*) bei 6 % der Tiere.

Bei den Weibchen konnte eine geringfügige Ansammlung von proteinartiger Flüssigkeit im Ovar bei 12 % der Tiere beobachtet werden; eine geringgradige Cystenbildung trat jedoch bei 21 % der Weibchen und somit mehr als doppelt so häufig wie bei den Wasserkontrollen auf.

### **0,1 ng/L Ethinylöstradiol**

Die Männchen dieser Versuchsgruppe zeigten als auffälligste Veränderung das starke Auftreten von *Testis-ova* in unterschiedlich starker Ausprägung (**Abb. 23** und **24**). So konnte hier das einzige *Testis-ovum* mit Schweregrad 4 (**Abb. 23**) beobachtet werden. Außerdem zeigte ein Individuum eine deutliche Degeneration des Hodens (**Abb. 24**). Das Hodengewebe dieses Fisches wies große Hohlräume auf, die etwa 25% des Hodenquerschnitts ausmachten. Bei den perinuklären Follikeln waren die Kerne sehr uneinheitlich und die charakteristischen Nucleoli in der Peripherie des Kerns fehlten. Das Cytoplasma erschien uneinheitlich und weniger dicht. Möglicherweise handelt es sich hierbei jedoch um den Zustand bei einer im Umbau von Ovar zu Hoden befindlichen Gonade nach der juvenilen Ovarialphase.

Bei den Weibchen zeigten insgesamt 23 % geringgradige Ansammlungen von proteinartiger Flüssigkeit im Ovar. Im Vergleich zur Kontrolle ist diese Veränderung zwar nicht signifikant, jedoch waren mehr als doppelt so viele Fische wie in der Kontrolle betroffen. Das gleiche galt für das vermehrte Auftreten von Cysten (**Abb. 28**): auch diese traten mehr als doppelt so häufig wie in der Wasserkontrolle auf, allerdings kam die DMSO-Kontrolle auf ähnliche Werte wie die niedrigste EE2-Konzentration. Der Anteil der Individuen mit atretischen unreifen Follikeln im Ovar entsprach dagegen der Kontrolle (**Abb. 25**).

### **0,5 ng/L Ethinylöstradiol**

Die mit 0,5 ng/L EE2 belasteten Männchen zeigten eine signifikante (\*p = 0,045) Abnahme der Spermiedichte in den *Tubuli seminiferi*. Diese Veränderung trat bei fast 20 % aller Fische mit Schweregrad 3 auf.

Das Auftreten von proteinartiger Flüssigkeit im Ovar entsprach in seiner Häufigkeit der der niedrigsten EE2- Versuchsgruppe. Allerdings zeigten die Weibchen in dieser Konzentration signifikant häufiger (\*p=0,024) eine leichte bis mittlere interstitielle Fibrose des Ovars (**Abb. 27**), sowie eine fast doppelt so hohe signifikante (\*\*p = 0,007) Abundanz von Cysten, die im Vergleich zur Kontrolle auch bei 11 % der Weibchen mit Schweregrad 2 deutlich stärker ausgeprägt war.

### **1 ng/L Ethinylöstradiol**

Auch die mit 1 ng/L EE2 belastete Versuchsgruppe zeigte einen leichten Rückgang der Spermienzahl (**Abb. 22**), allerdings war er hier nicht so ausgeprägt wie in der mittleren Konzentration und nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung für diese geringere Ausprägung wäre die unter 3.7 bereits beschriebene generell verringerte Reife der Hoden nach Exposition gegenüber 1 ng/L EE2, sowie die verringerte Anzahl überlebender Fische in dieser Konzentration, welche eine statistische Auswertung erschweren.

Bei den Weibchen dieser Versuchsgruppe waren die auffälligsten Veränderungen eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant (\*\*p = 0,002) erhöhte Anzahl von Weibchen mit leichten bis mittleren Ansammlung von proteinartiger Flüssigkeit in der Gonade und signifikant (\*\* p = 0,003) häufiger auftretende interstitielle Fibrose. Im Gegensatz zur mittleren Konzentration unterschied sich das Auftreten von Cysten hier nicht signifikant von der Kontrolle.

### **Abbildungen nachfolgende Seite (Seite 27)**

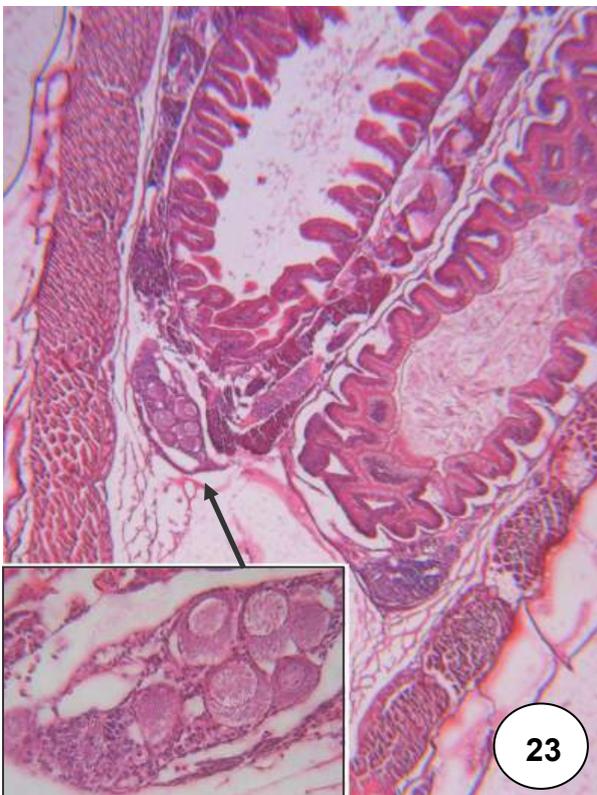
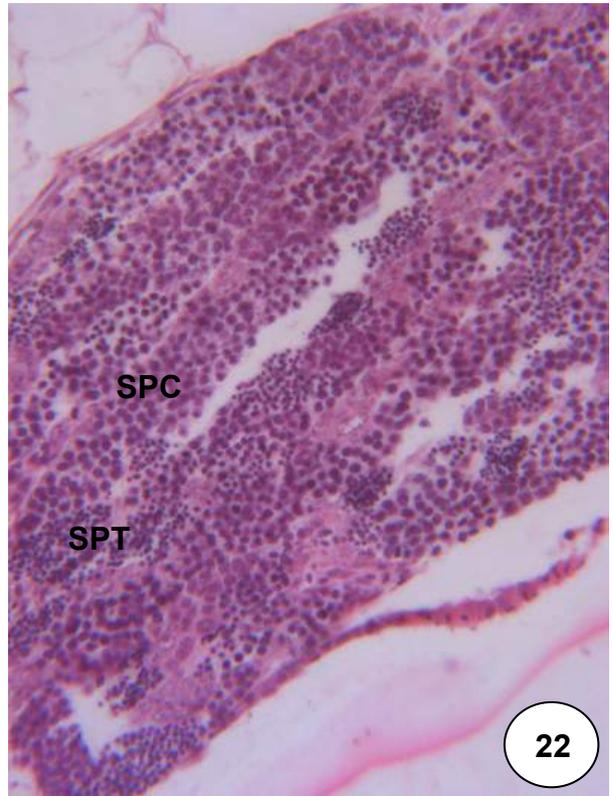
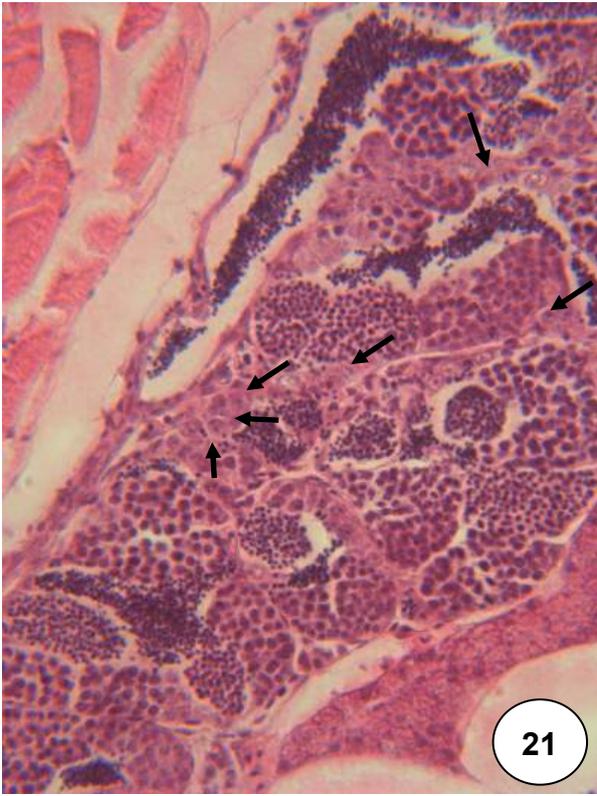
---

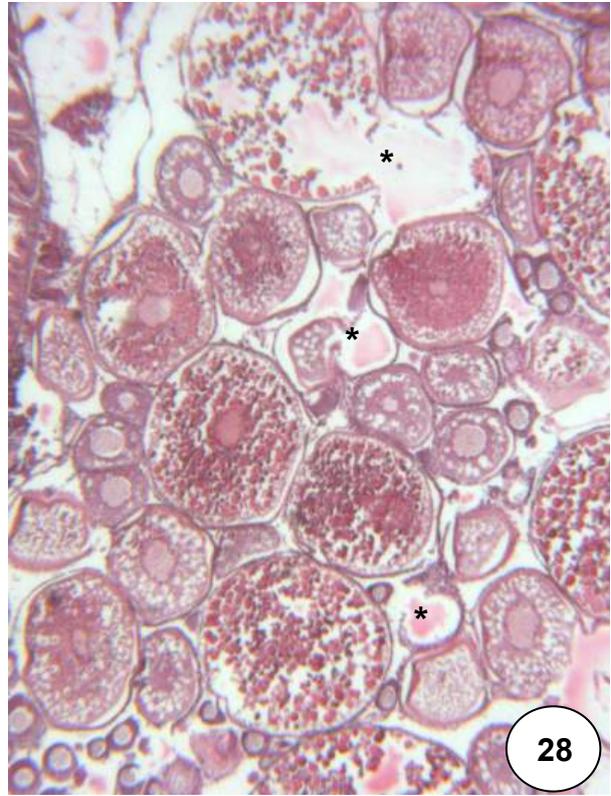
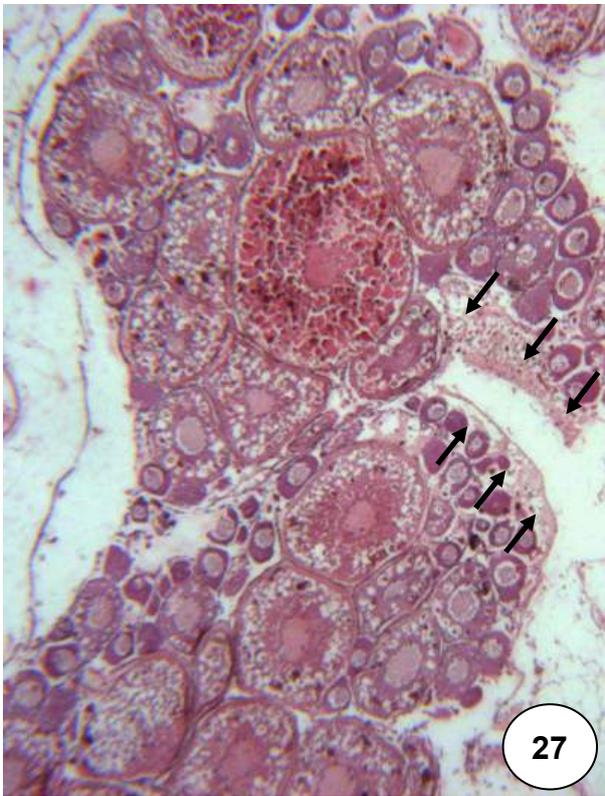
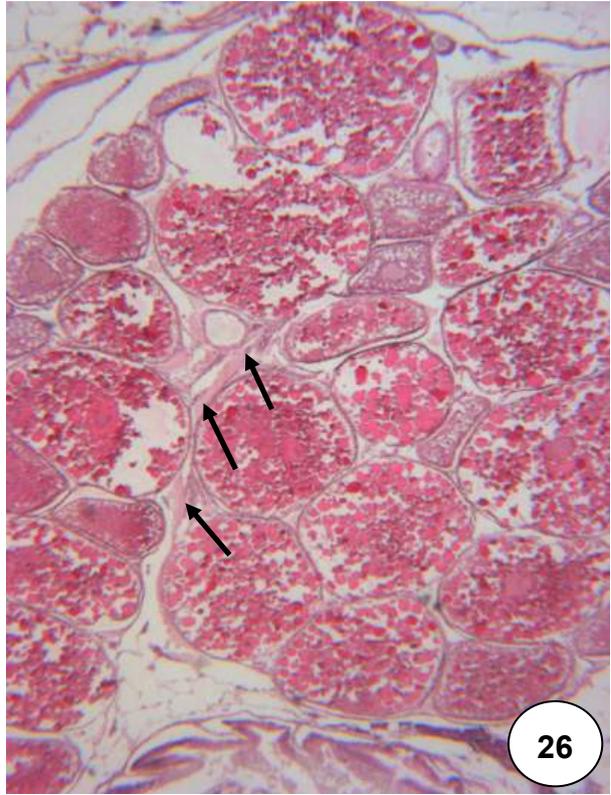
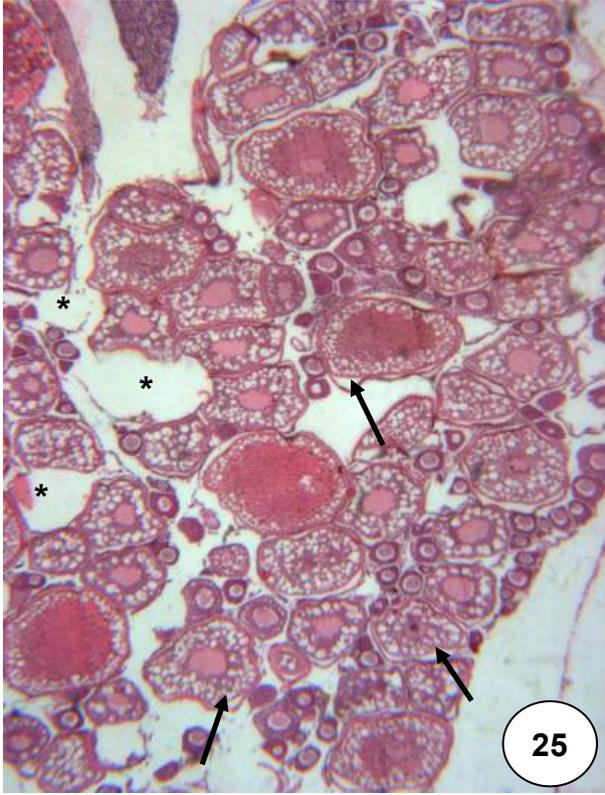
**Abb. 21: Hoden, Zunahme Spermatogonien SG 2, 1 ng/L EE2, Stadium 2:** Auffallend ist der leicht erhöhte Anteil an Spermatogonien (Pfeile). 370 fache Vergrößerung

**Abb. 22: Hoden, Rückgang Spermatozoen SG 3, 1 ng/L EE2, Stadium 2:** Aufgrund des hohen Anteils an Spermatozyten (SPC) und Spermatidien (SPT) ist dieser Hoden dem Stadium 2 zuzuordnen. Allerdings sind so gut wie keine Spermatozoen vorhanden. 150 fache Vergrößerung

**Abb. 23: Hoden, Testis-ova SG 4, 0,1 ng/L EE2, Stadium 0:** In diesem unreifen Hoden sind in der linken Gonade im Verhältnis zur Gesamtgröße ein hoher Anteil an perinukleären Follikeln zu beobachten. 6 fache Vergrößerung, Kasten 150 fache Vergrößerung

**Abb. 24: Hoden, Testis-ova SG 2, Degeneration Hodengewebe SG 2. 0,1 ng/L EE2, Stadium 1:** Größere Areale der *Testis-ova* zeigen Auflösungserscheinungen (Pfeile). Möglicherweise handelt es sich hierbei noch um den Umbau von Ovar zu Hoden nach der juvenilen Ovarialphase. 150 fache Vergrößerung





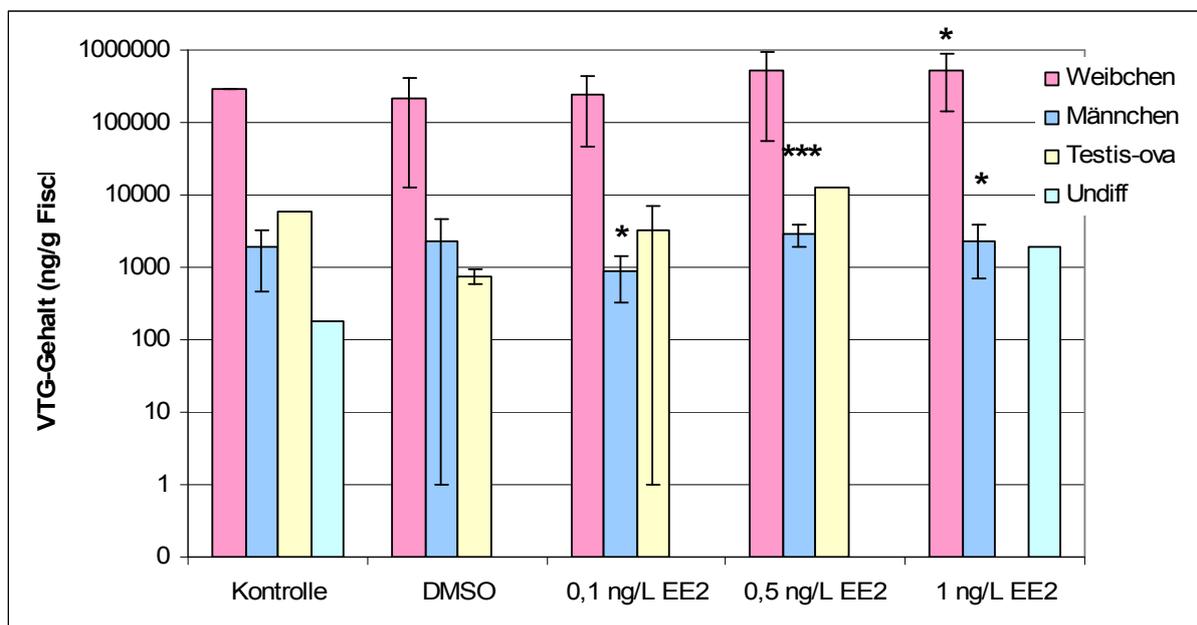
**Abb. 25: Ovar, Atresie unreife Oocyten SG 2, Cysten SG 2, 0,5 ng/L EE2, Stadium 2:** Eine größere Anzahl unreifer Follikel weist Deformationen auf sowie Ablösungen des Dotters vom Chorion (Pfeile). Außerdem sind zahlreiche leere Follikelhüllen (\*) zu beobachten. 60 fache Vergrößerung

**Abb. 26: Ovar, proteinartige Flüssigkeit SG 2, 1 ng/L EE2, Stadium 4:** Vereinzelt sind Ansammlungen proteinartiger Flüssigkeit zu beobachten (Pfeile). 60 fache Vergrößerung

**Abb. 27: Ovar, Fibrose SG 2, 0,5 ng/L EE2, Stadium 2:** In einigen Bereichen des Ovars sind kleinere Ansammlungen von Bindegewebe (Fibrose) zu beobachten (Pfeile). 60 fache Vergrößerung

**Abb. 28: Ovar, Cysten/Atresie unreifer Follikel SG 2, 0,1 ng/L EE2, Stadium 4:** Die Gonade zeigt eine größere Anzahl an cystischen, mit proteinartiger Flüssigkeit gefüllten Gebilden, bei denen es sich bei genauerer Betrachtung um erweiterte Follikel beschädigter Eier handelt (\*). 60 fache Vergrößerung

### 3.9 Vitellogenin



**Abb. 29:** Veränderungen des VTG-Gehalts (ng/ g Fisch) nach Exposition gegenüber EE2. Insgesamt stieg der VTG-Gehalt bei allen Fischen ungeachtet ihres Geschlechts nach Belastung mit EE2 mehr oder weniger stark an. (Signifikanzen mit One-Way-Anova \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001)

Die Vitellogeninmessungen zeigten in beiden Geschlechtern deutliche Veränderungen (**Abb. 29**). Die genauen Werte sind **Tab. 22** im Anhang (Seite 46) zu entnehmen. Bei den

Weibchen konnte ab Konzentrationen  $\geq 0,5$  ng/L EE2 ein leichter, bei 1 ng/L ein signifikanter Anstieg der Vitellogeninwerte beobachtet werden ( $p = 0,030$ ). Diese Veränderungen erklären sich vermutlich im Wesentlichen aus dem steigenden Anteil an Weibchen mit reifen Gonaden in den höheren Konzentrationen.

Auch die Männchen zeigten ab einer Konzentration  $\geq 0,1$  ng/L EE2 signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Allerdings war die VTG-Menge bei den gegenüber 0,1 ng/L EE2 exponierten Männchen weniger als halb so hoch wie in den Kontrollen ( $p = 0,030$ ). Im Gegensatz dazu war der durchschnittliche Vitellogeninwert der mit 0,5 ng/L EE2 belasteten Männchen fast ein Drittel höher als in den Kontrollen. Dieser Unterschied war hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Allerdings zeigte die höchste Konzentration im Vergleich zu den Wasserkontrollen zwar ebenfalls signifikant ( $*p = 0,049$ ) erhöhte VTG-Werte, jedoch war dieser Anstieg nicht so deutlich wie bei Belastung mit 0,5 ng/L EE2. Diese Dosis-Wirkungskurve erscheint zunächst unverständlich, aber anscheinend bewirken geringste Mengen EE2 (0,1 ng/L) zunächst eine geringfügige Suppression des natürlicherweise in Männchen vorkommenden Vitellogenins, während ab einer Konzentration von 0,5 ng/L EE2 tatsächlich eine deutliche Vitellogenininduktion stattfindet.

Da in den Kontrollen nur ein Individuum mit *Testis-ova* gemessen wurde, konnten die Veränderungen im Vitellogeningehalt für diese Tiere nicht statistisch ausgewertet werden. Allerdings stieg auch hier der Vitellogeningehalt dosisabhängig an. Das gleiche Problem stellte sich bei den Fischen mit undifferenzierten Gonaden: hier wurde der VTG-Gehalt nur bei insgesamt zwei Fischen bestimmt (Kontrolle und 1 ng/L EE2); hier war der Wert des gegenüber EE2 exponierten Fisches um mehr als zehnmals so hoch wie beim Fisch aus der Kontrolle.

## 4. Abschließende Bewertung

### 4.1 NOEC und LOEC im FSDT mit Ethinylöstradiol

**Tab. 13:** Zusammenfassung der Ergebnisse der für die einzelnen Parameter ermittelten LOEC und NOEC - Werte nach Exposition gegenüber Ethinylöstradiol im FSDT mit dem Zebrafisch. Die ***kursiv fett*** angegebenen Werte kennzeichnen Parameter, bei denen die höchste Konzentration nicht signifikant verändert war.

| Parameter                                      | NOEC (ng/L) |             | LOEC (ng/L) |             |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|
|  | Weibchen    |             | Männchen    |             |
|  | NOEC (ng/L) | LOEC (ng/L) | NOEC (ng/L) | LOEC (ng/L) |
| Schlüpferfolg und Mortalität                   | -           | -           | -           | -           |
| Geschlechterverhältnis                         | <b>0,1</b>  |             | <b>0,5</b>  |             |
| <b>Überleben</b>                               |             |             |             |             |
| Missbildungen und Verhalten                    | -           | -           | -           | -           |
| <b>Wachstum</b>                                |             |             |             |             |
| Körperlänge                                    | -           | -           | -           | -           |
| Körpergewicht                                  | -           | -           | -           | -           |
| <b>Gonadenentwicklung und –differenzierung</b> |             |             |             |             |
| Reifegrade                                     | 0,1         | 0,5         | < 0,1       | 0,1         |
| <b>Histopathol. Veränderungen</b>              |             |             |             |             |
| Anzahl Effekte pro Tier                        | 0,1         | 0,5         | <b>0,1</b>  | <b>0,5</b>  |
| Proteinartige Flüssigkeit                      | 0,5         | 1,0         | -           | -           |
| Fibrose  | <b>0,1</b>  | <b>0,5</b>  | -           | -           |
| Cysten (Atresie)                               | <b>0,1</b>  | <b>0,5</b>  | -           | -           |
| Abnahme Spermatozoen                           | -           |             | <b>0,1</b>  | <b>0,5</b>  |
| <b>Biochemische Parameter</b>                  |             |             |             |             |
| Vitellogenininduktion                          | 0,5         | 1,0         | 0,1 (< 0,1) | 0,5         |

Die Gegenüberstellung der untersuchten Parameter zeigt, dass für die meisten der untersuchten Endpunkte der NOEC bei 0,1 ng/L EE2, der LOEC bei 0,5 ng/L EE2 liegt. Dies gilt insbesondere für die Endpunkte Reifegrade und Anzahl der histologischen Veränderungen pro Tier bei den Weibchen. Das Auftreten von proteinartiger Flüssigkeit bei den Weibchen

zeigte ebenfalls eine Dosis-Wirkungs-Beziehung, allerdings lag hier die NOEC bei 0,5 ng/L und die LOEC bei 1 ng/L.

Die Veränderungen des Vitellogeningehalts ergab zunächst eine signifikante Abnahme bei einer Belastung mit 0,1 ng/L EE2, bevor der Wert nach Belastung mit 0,5 ng/L EE2 signifikant anstieg.

Leider war die statistische Auswertung der gegenüber 1 ng/L EE2 exponierten Fische aufgrund der hohen Mortalität für einige Parameter wie das Geschlechterverhältnis, die Veränderungen in den männlichen Gonaden und das Auftreten von Cysten (Sonderform der Atresie) und Fibrosen bei den Weibchen nicht aussagekräftig genug, um signifikante Unterschiede zu zeigen.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen erwiesen sich Schlüpfertag und Mortalität sowie Wachstumsparameter bei den verwendeten EE2 - Konzentrationen als ungeeignete Endpunkte.

## **4.2 Literaturvergleich**

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen zu den adversen Effekten von EE2 durchgeführt, welche je nach Versuchsdesign zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sind. Daher soll in diesem Abschnitt der Fokus im Wesentlichen auf Studien mit ähnlichem Versuchsdesign und ähnlicher EE2-Konzentration und Expositionsdauer mit dem Zebrafisch gelegt werden. Problematisch ist hierbei jedoch, dass in den meisten Fällen nur deutlich höhere EE2-Konzentrationen getestet wurden.

### ***Histopathologische Veränderungen***

Einige Studien konnten bei Konzentrationen ab 3 ng/L EE2 eine komplette Verweiblichung aller Versuchsfische zeigen (Fenske et al., 2005; Nash et al., 2004; Maack & Segner, 2004; Örn et al., 2006). In der vorliegenden Studie war bereits bei einer Belastung mit 0,5 ng/L EE2 eine Zunahme der Weibchen an der Gesamtpopulation zu beobachten, allerdings folgte die höchste Konzentration diesem Trend nicht.

Die in dieser Studie beobachtete signifikante Verringerung der Hodenreife nach Exposition gegenüber EE2 deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen, ab 1 ng/L EE2 (Weber et al., 2003) und 3 ng/L (Fenske et al., 2005, ) bei denen die Fische in partiellen Lifecycle-Studien und in einer Studie adulte Zebrafische in einer Kurzzeitexposition (max. 24 Tage) getestet wurden (van den Belt et al., 2001; LOEC 10 ng/L EE2).

Weitere Übereinstimmungen können bei den histopathologischen Effekten der Weibchen gefunden werden. So berichten auch andere Studien von einer verstärkten Atresie vitellogener Eistadien (Maack & Segner, 2004; van den Belt et al., 2001). Hierbei sei noch einmal

darauf hingewiesen, dass die in der vorliegenden Studie beobachteten Cysten ebenfalls eine Form der Atresie darstellen.

Insgesamt sind somit die histopathologischen Ergebnisse der vorliegenden Studie durchaus mit anderen Studien vergleichbar, zumal nach Kenntnisstand der Autorin keine methodisch vergleichbaren histopathologischen Daten nach Testung mit ähnlich niedrigen Konzentrationen von EE2 existieren.

### ***Vitellogeninmessung***

Obwohl in manchen Studien vergleichbare Konzentrationen und auch vergleichbare Expositionsdesigns wie in der vorliegenden Studie getestet wurden, liegt bei den meisten Studien der LOEC zwischen 1-3 ng/L EE2 (Balch et al., 2004; Segner et al., 2003; van den Belt 2001). Somit liegt die LOEC in diesen Studien zwei bis sechsmal höher als in unserer aktuellen Studie. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der an der Universität Heidelberg verwendete Zebrafischstamm etwas empfindlicher reagiert. Andererseits ist die Dosis-Wirkungskinetik der VTG - Werte mit der Abnahme des VTG-Wertes nach Belastung mit 0,1 ng/L EE2 in der vorliegenden Studie ungewöhnlich. Hier wären weitere Untersuchungen mit niedrigen Konzentrationen von EE2 hilfreich.

## 5. Literatur

- Balch GC, Mackenzie CA, Metcalfe CD. (2004): Alterations to gonadal development and reproductive success in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 alpha-ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(3); 782-791
- Eaton, R. C., Farley, R. D. (1974): Spawning cycle and egg production of Zebrafish (*Brachidanio rerio*) in the laboratory. *Copeia* 1: 195-204
- Fenske, M., Maack, G., Schäfers, C., Segner, H. (2005): An environmental relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 24, No. 5, pp. 1088–1098
- Hill, R. L.; Janz, D. M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success. (2003): *Aquat. Toxicol.*, 63 (4), 417–429. (21)
- Länge, R.; Hutchinson, T. H.; Croudace, C. P.; Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G.H., Sumpter, J.P. (2001): Effects of the synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (6), 1216–1227.
- Maack, G. & Segner, H. (2004) Life-stage-dependent sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) to estrogen exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 139 (2004) 47–55
- Nash, J. P.; Kime, D. E.; van der Ven, L. T. M.; Wester, P. W.; Brion, F.; Maack, G.; Stahl Schmidt-Allner, P.; Tyler, C. R. (2004): Longterm exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives* 112 (17), 1725–1733.
- Nimrod, A. C.; Benson, W. H. (1998): Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. *Aquat. Toxicol.* 44 (1-2), 141–156.
- OECD (1992): Fish, Early-life Stage Toxicity Test. [www.oecd.org/dataoecd/17/62/1948869.pdf](http://www.oecd.org/dataoecd/17/62/1948869.pdf)
- OECD (2010): Fish sexual development test, Draft Guideline. [www.oecd.org/data](http://www.oecd.org/data)
- Örn, S., Yamani, S., Norrgren, L. (2006): Comparison of Vitellogenin Induction, Sex Ratio, and Gonad Morphology between Zebrafish and Japanese Medaka After Exposure to 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and 17 $\beta$ -Trenbolone *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 237–243
- Parrott, J. L.; Blunt, B. R. (2005): Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environ. Toxicol.* 20 (2), 131–141.
- Segner, H., Carroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M., Wenzel, A. (2003). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302–314.
- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H. (2001). Reproductive effects of ethinylestradiol and 4t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 458–467.
- Van den Belt, K.; Verheyen, R.; Witters, H. (2003): Effects of 17 $\alpha$  ethinylestradiol in a partial life-cycle test with zebrafish (*Danio rerio*): effects on growth, gonads and female reproductive success. *Sci. Total Environ.* 309 (1-3), 127–137.
- Van den Belt, K.; Wester, P. W., Van der Van, L. T. M., Verheyen, R.; Witters, H. (2002): Effects of Ethinylestradiol on the reproductive physiology in Zebrafish (*Danio rerio*): Time dependency and reversibility. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 21, No. 4, pp. 767–775,

## 6. Anhänge

**Tab. 14:** Vergleich der experimentelle Bedingungen des FSDT laut Guideline mit dem durchgeführten Test (OECD 2010). Abweichende Parameter sind fett dargestellt.

|   | Guideline  | FSDT Heidelberg   |
|---|--|---|
| 1. Used species                               | Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> )   |   |
| 2. Test type                                  | Flow-through or semi-static  |   |
| 3. Water temperature                          | 27 ± 2°C   |   |
| 4. Illumination quality                       | Fluorescent bulbs (wide spectrum)  |   |
| 5. Light intensity                            | 10-20 µE/M <sup>2</sup> /s, 540-1080 lux, or 50-100 ft-c (ambient lab. levels)   |   |
| 6. Photoperiod                                | 16 h light, 8 h dark   |   |
| 7. Loading rate                               | <5 g per L at any time and not exceeding 0.5 g/L/24h   |   |
| 8. Volume exchanges of test solutions         | Minimum of 5 daily   | <b>3 changes per day</b>  |
| 9. Age of test organisms at start of exposure | Newly fertilised eggs  | < 3 hpf   |
| 10. No. of eggs per treatment                 | Minimum 160  | <b>80</b>   |
| 11. No. of treatments                         | Minimum 3 (plus appropriate controls)  | 3   |
| 12. No. replicates per treatment              | 4 (minimum)  | <b>2</b>  |
| 13. Feeding regime                            | Live <i>Artemia</i> , frozen adult brine shrimp, flake food, etc. It is recommended to feed twice daily  | <b>start with artemia liquid starter and powder food, feeding 3 times per day</b> |
| 14. Aeration                                  | None unless DO concentration falls below 70% saturation  | no aeration   |
| 15. Dilution water                            | Clean surface, well or reconstituted water   |   |
| 16. Chemical exposure duration                | 60-dph   |   |
| 17. Biological endpoints                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hatching success</li> <li>• Survival</li> <li>• Gross- morphology</li> <li>• VTG</li> <li>• Gonadal histology</li> <li>• Sex ratio</li> </ul> |   |
| 18. Test acceptability                        | Hatching success > 80%<br>Post hatch survival ≥ 70% of fish in the controls  |   |

## 6.1 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Tab. 15 Abbildungsverzeichnis

| Abbildungen |   | Seite |
|-------------|---|-------|
| Abb. 1      | Zebrafisch  | 2     |
| Abb. 2      | Molekularstruktur 17 $\alpha$ Ethinylestradiol  | 3     |
| Abb. 3      | Schematischer Aufbau der Durchflussanlage   | 5     |
| Abb. 4      | Schnittschema zur gleichzeitigen Verwendung eines Fisches zur Vtg-Messung und für die Histopathologie | 6     |
| Abb. 5      | Mortalität FSĐT EE2   | 15    |
| Abb. 6      | Länge Fische zu Versuchsende  | 16    |
| Abb. 7      | Gewicht Fische zu Versuchsende  | 16    |
| Abb. 8      | Geschlechterverhältnis  | 17    |
| Abb. 9      | Gonadenreife Zebrafischweibchen im FSĐT EE2   | 19    |
| Abb. 10     | Undifferenzierte Gonade   | 19    |
| Abb. 11     | Weibliche Gonade, Stadium 0   | 19    |
| Abb. 12     | Weibliche Gonade, Stadium 1   | 20    |
| Abb. 13     | Weibliche Gonade, Stadium 2   | 20    |
| Abb. 14     | Weibliche Gonade, Stadium 3   | 20    |
| Abb. 15     | Weibliche Gonade, Stadium 4   | 20    |
| Abb. 16     | Männliche Gonade, Stadium 0   | 22    |
| Abb. 17     | Männliche Gonade, Stadium 1   | 22    |
| Abb. 18     | Männliche Gonade, Stadium 2   | 22    |
| Abb. 19     | Männliche Gonade, Stadium 3   | 22    |
| Abb. 20     | Gonadenreife Zebrafischmännchen im FSĐT EE2   | 23    |
| Abb. 21     | Hoden, 1ng/L, Stadium 2, auffällig hoher Anteil Spermatogonien  | 27    |
| Abb. 22     | Hoden, Rückgang Spermatozoen SG 3, 1 ng/L EE2, Stadium 2,   | 27    |
| Abb. 23     | Hoden, Testis-ova SG 4, 0,1 ng/L EE2, Stadium 0   | 27    |
| Abb. 24     | Hoden, Testis- ova SG 2, Degeneration Hodengewebe SG 2. 0,1 ng/L EE2, Stadium 1                       | 27    |
| Abb. 25     | Ovar, Atresie unreife Oocyten SG 2, 0,5 ng/L EE2, Stadium 2   | 28    |
| Abb. 26     | Ovar, proteinartige Flüssigkeit SG 2, 1 ng/L EE2, Stadium 4   | 28    |
| Abb. 27     | Ovar, Fibrose SG 2, 0,5 ng/L EE2, Stadium 2   | 28    |
| Abb. 28     | Ovar, Cysten/Atresie unreifer Follikel SG 2, 0,1 ng/L EE2, Stadium 4                                  | 28    |
| Abb. 29     | Vitellogeninwerte nach Belastung mit EE2  | 29    |

**Tab. 16:** Tabellenverzeichnis

| <b>Tabellen</b> | <b>Seite</b>  |    |
|-----------------|---|----|
| Tab. 1          | Stammlösungen und verwendete Endkonzentrationen                   | 4  |
| Tab. 2          | Fütterungsschema FSĐT EE2   | 5  |
| Tab. 3          | Histologische Endpunkte gemäß OECD                                | 7  |
| Tab. 4          | Beschreibung der unterschiedlichen Zelltypen im Hoden             | 8  |
| Tab. 5          | Beschreibung der unterschiedlichen Zelltypen im Ovar              | 9  |
| Tab. 6          | Einteilung der Schweregrade histopathologischer Veränderung       | 10 |
| Tab. 7          | Zeitplan zur Entnahme von Wasserproben um FSĐT                    | 12 |
| Tab. 8          | Wasserparameter über den Versuchszeitraum                         | 13 |
| Tab. 9          | Sauerstoffwerte der einzelnen Testbecken im FSĐT EE2              | 13 |
| Tab. 10         | Analytikergebnisse FSĐT EE2                                       | 14 |
| Tab. 11         | Beschreibung der Reifestadien für männliche und weibliche Gonaden | 18 |
| Tab. 12         | Histopathologische Veränderungen im FSĐT EE2                      | 24 |
| Tab. 13         | Zusammenfassung der Ergebnisse, LOEC und NOEC                     | 30 |
| Tab. 14         | Vergleich Test Guideline und durchgeführter Test                  | 33 |
| Tab. 15         | Abbildungsverzeichnis   | 34 |
| Tab. 16         | Tabellenverzeichnis   | 37 |
| Tab. 17         | Temperaturmessung   | 38 |
| Tab. 18         | Rotameterreichung   | 40 |
| Tab. 19         | Pumpeneichung   | 42 |
| Tab. 20         | Boniturdaten von Teststart bis 16.1.2011 (Tag 5)                  | 44 |
| Tab. 21         | Boniturdaten vom 17.1.2011 (Tag 6) bis Testende                   | 44 |
| Tab. 22         | Vitellogeninwerte   | 46 |

---

## 6.2 Rohdaten

Tab. 17: Temperatur (°C) in den einzelnen Versuchsbecken Tag 1 - 37

| Datum      | Becken Nr. |                         |      |      |      |      |      |      |      |                              |      |  |
|------------|------------|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------------|------|--|
|            | Tag        | 1                       | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9                            | 10   |  |
| 11.01.2011 | 1          | Messung im Klimaschrank |      |      |      |      |      |      |      | T = 26,1; Min 25,8; Max 26,9 |      |  |
| 12.01.2011 | 2          | Messung im Klimaschrank |      |      |      |      |      |      |      | T = 26,7; Min 25,9; Max 27,0 |      |  |
| 13.01.2011 | 3          | Messung im Klimaschrank |      |      |      |      |      |      |      | T = 26,3; Min 26,0; Max 26,9 |      |  |
| 14.01.2011 | 4          | Messung im Klimaschrank |      |      |      |      |      |      |      | T = 26,9; Min 25,8; Max 27,0 |      |  |
| 15.01.2011 | 5          | Messung im Klimaschrank |      |      |      |      |      |      |      | T = 26,5; Min 26,1; Max 26,9 |      |  |
| 16.01.2011 | 6          | 25,8                    | 25,3 | 25,5 | 25,9 | 26   | 26,4 | 25,5 | 25,8 | 25,4                         | 24,9 |  |
| 17.01.2011 | 7          | 26,1                    | 25,5 | 25,5 | 25   | 26   | 26,4 | 25,4 | 25,8 | 25,8                         | 24,9 |  |
| 18.01.2011 | 8          | 26,3                    | 25,7 | 25,8 | 26,2 | 26,2 | 25,6 | 25,5 | 25,9 | 25,8                         | 25,2 |  |
| 19.01.2011 | 9          | keine Messung!          |      |      |      |      |      |      |      |                              |      |  |
| 20.01.2011 | 10         | 25,9                    | 25,3 | 25,5 | 25,9 | 25,9 | 25,2 | 25   | 25,7 | 25,5                         | 25   |  |
| 21.01.2011 | 11         | 26,2                    | 25,4 | 25,7 | 26,3 | 26,3 | 25,4 | 25,3 | 25,9 | 25,5                         | 25   |  |
| 22.01.2011 | 12         | 25,4                    | 24,9 | 25,1 | 25,7 | 25,8 | 25,1 | 25,3 | 25,1 | 25                           | 24,9 |  |
| 23.01.2011 | 13         | 26,2                    | 25,3 | 25,5 | 26,1 | 26,1 | 25,4 | 25,3 | 26   | 25,5                         | 25   |  |
| 24.01.2011 | 14         | 26,2                    | 25,3 | 25,5 | 26,2 | 26,1 | 25,4 | 25,3 | 25,9 | 25,5                         | 25   |  |
| 25.01.2011 | 15         | 26,3                    | 25,4 | 25,6 | 26,2 | 26,2 | 25,4 | 25,5 | 26   | 25,8                         | 25,4 |  |
| 26.01.2011 | 16         | 25,6                    | 25,1 | 25,3 | 26   | 26,3 | 25,4 | 25   | 25,8 | 25,4                         | 24,9 |  |
| 27.01.2011 | 17         | 26                      | 25,4 | 25,7 | 26,1 | 26,2 | 25,5 | 25,5 | 26,1 | 25,6                         | 25,7 |  |
| 28.01.2011 | 18         | 26,1                    | 25,1 | 25,5 | 26   | 26,3 | 25,4 | 24,4 | 25,9 | 25,8                         | 25,5 |  |
| 29.01.2011 | 19         | 26,3                    | 25,7 | 25,7 | 25,9 | 26,2 | 25,5 | 25,5 | 26,2 | 26,2                         | 25,8 |  |
| 30.01.2011 | 20         | 26                      | 25,5 | 25,3 | 25,9 | 26,2 | 25,4 | 25,4 | 26   | 25,8                         | 25,5 |  |
| 31.01.2011 | 21         | 26,1                    | 25,4 | 25,7 | 26,1 | 26,2 | 25,4 | 25,5 | 26,1 | 26                           | 25,8 |  |
| 01.02.2011 | 22         | 26,1                    | 25,4 | 25,8 | 26,2 | 26,2 | 25,4 | 25,5 | 26   | 25,7                         | 25,4 |  |
| 02.02.2011 | 23         | 26,1                    | 25,4 | 25,6 | 25,6 | 26,2 | 25,4 | 25,5 | 26   | 26                           | 25,4 |  |
| 03.02.2011 | 24         | 26                      | 25,4 | 25,6 | 26   | 26,1 | 25,4 | 25,8 | 26   | 26                           | 25,7 |  |
| 04.02.2011 | 25         | 26,3                    | 25,7 | 25,9 | 26,3 | 26,2 | 25,7 | 25,8 | 26,3 | 26,3                         | 26,1 |  |
| 05.02.2011 | 26         | 26,3                    | 26   | 25,9 | 26,3 | 26,3 | 26,8 | 25,8 | 26,3 | 26,2                         | 26,1 |  |
| 06.02.2011 | 27         | 26,2                    | 25,9 | 25,9 | 26   | 26,3 | 25,7 | 25,8 | 26,3 | 26,1                         | 26   |  |
| 07.02.2011 | 28         | 26                      | 25,6 | 25,7 | 26,1 | 26,2 | 25,6 | 25,7 | 26,1 | 26                           | 25,6 |  |
| 08.02.2011 | 29         | 26                      | 25,7 | 25,8 | 26,1 | 26,1 | 25,9 | 25,6 | 26   | 25,7                         | 25,6 |  |
| 09.02.2011 | 30         | 25,9                    | 25,6 | 25,7 | 26   | 26,1 | 25,7 | 25,7 | 26,1 | 25,8                         | 25,6 |  |
| 10.02.2011 | 31         | 25,9                    | 25,6 | 25,9 | 26,2 | 26,1 | 25,8 | 25,6 | 26   | 25,9                         | 25,7 |  |
| 11.02.2011 | 32         | 25,9                    | 25,8 | 26,2 | 26,4 | 26,2 | 26,1 | 25,8 | 26,1 | 26,1                         | 25,9 |  |
| 12.02.2011 | 33         | 25,8                    | 25,9 | 26,2 | 26,5 | 26,2 | 26   | 25,8 | 25,9 | 26                           | 26   |  |
| 13.02.2011 | 34         | 25,4                    | 25,5 | 26   | 26,1 | 26,1 | 26   | 25,9 | 26,2 | 26,2                         | 26,3 |  |
| 14.02.2011 | 35         | 26,1                    | 25,9 | 26,3 | 26,5 | 26,1 | 26   | 26,2 | 26,2 | 26,2                         | 26,3 |  |
| 15.02.2011 | 36         | 25,9                    | 25,5 | 25,8 | 26,2 | 26,1 | 25,7 | 25,5 | 25,9 | 25,6                         | 25,4 |  |
| 16.02.2011 | 37         | 25,8                    | 25,4 | 25,7 | 25,8 | 26,3 | 25,7 | 25,5 | 25,9 | 25,6                         | 25,4 |  |

**Tab. 17 (Fortsetzung):** Temperatur (°C) in den einzelnen Versuchsbecken Tag 38 - 60

| Datum      | Becken Nr. |                |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------|------------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|            | Tag        | 1              | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   |
| 17.02.2011 | 38         | 26             | 25,7 | 25,8 | 26   | 26,3 | 25,8 | 25,5 | 26,1 | 25,7 | 25,4 |
| 18.02.2011 | 39         | 25,9           | 25,8 | 25,9 | 25,7 | 26,3 | 25,7 | 25,8 | 26   | 25,5 | 25,3 |
| 19.02.2011 | 40         | 25,8           | 25,7 | 25,8 | 26   | 26   | 25,9 | 26   | 26,1 | 25,7 | 25,5 |
| 20.02.2011 | 41         | 26,1           | 25,4 | 25,6 | 26,1 | 26,1 | 26,3 | 25,5 | 25,9 | 25,8 | 25,6 |
| 21.02.2011 | 42         | 26,1           | 25,4 | 25,6 | 26,2 | 26,2 | 26,2 | 25,5 | 25,9 | 25,7 | 25,6 |
| 22.02.2011 | 43         | 26,1           | 25,7 | 25,8 | 26,1 | 26,2 | 25,7 | 25,7 | 26,1 | 26,1 | 25,9 |
| 23.02.2011 | 44         | 26,1           | 25,7 | 25,8 | 26,2 | 26,3 | 26,6 | 25,7 | 26,1 | 25,9 | 25,6 |
| 24.02.2011 | 45         | 26,2           | 25,8 | 26   | 26,4 | 26,2 | 25,9 | 25,7 | 26,2 | 26,1 | 26,1 |
| 25.02.2011 | 46         | 26             | 25,6 | 25,9 | 26,1 | 26,3 | 25,6 | 25,7 | 26,1 | 25,9 | 25,6 |
| 26.02.2011 | 47         | 26,2           | 25,8 | 26,1 | 26,4 | 26,2 | 25,9 | 25,9 | 26,2 | 26,1 | 25,9 |
| 27.02.2011 | 48         | 26,1           | 25,7 | 26,2 | 26,2 | 26,3 | 25,8 | 25,8 | 26,1 | 26,1 | 25,9 |
| 28.02.2011 | 49         | 26,1           | 25,8 | 26,1 | 26,3 | 26,2 | 25,9 | 25,8 | 26,2 | 26   | 26   |
| 01.03.2011 | 50         | 25,9           | 25,8 | 26,1 | 26,3 | 26,3 | 25,9 | 25,9 | 26,3 | 26,2 | 25,9 |
| 02.03.2011 | 51         | 26,2           | 25,9 | 25,9 | 25,9 | 26,3 | 26,4 | 25,8 | 25,8 | 26,3 | 26,2 |
| 03.03.2011 | 52         | keine Messung! |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 04.03.2011 | 53         | 26             | 25,8 | 26   | 26,2 | 26,3 | 25,8 | 25,7 | 26,1 | 26   | 25,9 |
| 05.03.2011 | 54         | 26,2           | 25,9 | 26,1 | 26,1 | 26,4 | 25,9 | 25,8 | 26   | 26   | 25,8 |
| 06.03.2011 | 55         | 26             | 25,8 | 26,1 | 26,4 | 26,3 | 25,9 | 25,8 | 26,2 | 26   | 26,1 |
| 07.03.2011 | 56         | 26,2           | 25,8 | 25,9 | 26,4 | 26,3 | 25,7 | 25,8 | 26,2 | 25,8 | 25,7 |
| 08.03.2011 | 57         | 26,2           | 25,8 | 25,9 | 26,3 | 26,3 | 25,8 | 25,7 | 26,2 | 26   | 25,9 |
| 09.03.2011 | 58         | 26,1           | 25,8 | 25,8 | 26,2 | 26,2 | 25,9 | 25,8 | 26,1 | 26   | 25,9 |
| 10.03.2011 | 59         | 26             | 25,8 | 26,1 | 26,1 | 26,3 | 25,9 | 25,8 | 26,2 | 26   | 25,9 |
| 11.3.2011  | 60         | keine Messung  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |

**Tab. 18:** Rotametermessungen vor und nach der täglichen Eichung. Sollwert: 500 ml/24 min, Max. Abweichung  $\pm 10\%$  (450 - 550 ml); Gelbe Felder kennzeichnen Werte außerhalb der Toleranzgrenzen.

|            | 1             |      | 2             |      | 3        |      | 4        |      | 5            |      | 6            |      | 7            |      | 8            |      | 9          |      | 10         |      |
|------------|---------------|------|---------------|------|----------|------|----------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|------------|------|------------|------|
|            | Kontrolle (1) |      | Kontrolle (2) |      | DMSO (1) |      | DMSO (2) |      | 0,1 ng/L (1) |      | 0,1 ng/L (2) |      | 0,5 ng/L (1) |      | 0,5 ng/L (2) |      | 1 ng/L (1) |      | 1 ng/L (2) |      |
|            | vor           | nach | vor           | nach | vor      | nach | vor      | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor        | nach | vor        | nach |
| 06.01.2011 | 460           | 500  | 430           | 500  | 360      | 500  | 390      | 500  | 410          | 500  | 450          | 500  | 480          | 500  | 250          | 500  | 485        | 500  | 490        | 500  |
| 07.01.2011 | 470           | 500  | 480           | 500  | 455      | 500  | 480      | 500  | 430          | 500  | 470          | 500  | 480          | 500  | 410          | 500  | 480        | 500  | 480        | 500  |
| 08.01.2011 | 470           | 500  | 480           | 500  | 450      | 500  | 475      | 500  | 420          | 500  | 470          | 500  | 490          | 500  | 445          | 500  | 460        | 500  | 490        | 500  |
| 09.01.2011 | 490           | 500  | 490           | 500  | 445      | 500  | 480      | 500  | 450          | 500  | 480          | 500  | 480          | 500  | 460          | 500  | 465        | 500  | 480        | 500  |
| 10.01.2011 | 475           | 500  | 485           | 500  | 460      | 500  | 485      | 500  | 460          | 500  | 478          | 500  | 474          | 500  | 440*         | 500  | 490        | 500  | 470        | 500  |
| 11.01.2011 | 460           | 500  | 470           | 500  | 485      | 500  | 490      | 500  | 485          | 500  | 464          | 500  | 490          | 500  | 310          | 500  | 489        | 500  | 460        | 500  |
| 12.01.2011 | 480           | 500  | 480           | 500  | 475      | 500  | 485      | 500  | 435          | 500  | 450          | 500  | 487          | 500  | 460          | 500  | 485        | 500  | 495        | 500  |
| 13.01.2011 | 473           | 500  | 483           | 500  | 477      | 500  | 489      | 500  | 475          | 500  | 468          | 500  | 473          | 500  | 470          | 500  | 460        | 500  | 468        | 500  |
| 14.01.2011 | 490           | 500  | 470           | 500  | 460      | 500  | 450      | 500  | 460          | 500  | 470          | 500  | 475          | 500  | 480          | 500  | 468        | 500  | 475        | 500  |
| 15.01.2011 | 470           | 500  | 470           | 500  | 465      | 500  | 475      | 500  | 465          | 500  | 475          | 500  | 463          | 500  | 490          | 500  | 450        | 500  | 465        | 500  |
| 16.01.2011 | 475           | 500  | 471           | 500  | 470      | 500  | 480      | 500  | 478          | 500  | 478          | 500  | 475          | 500  | 485          | 500  | 454        | 500  | 490        | 500  |
| 17.01.2011 | 473           | 500  | 485           | 500  | 473      | 500  | 483      | 500  | 479          | 500  | 490          | 500  | 483          | 500  | 488          | 500  | 464        | 500  | 480        | 500  |
| 18.01.2011 | 480           | 500  | 468           | 500  | 454      | 500  | 495      | 500  | 490          | 500  | 495          | 500  | 479          | 500  | 490          | 500  | 470        | 500  | 483        | 500  |
| 19.01.2011 | 463           | 500  | 470           | 500  | 478      | 500  | 480      | 500  | 475          | 500  | 483          | 500  | 468          | 500  | 451          | 500  | 440        | 500  | 480        | 500  |
| 20.01.2011 | 489           | 500  | 485           | 500  | 479      | 500  | 469      | 500  | 473          | 500  | 487          | 500  | 475          | 500  | 490          | 500  | 460        | 500  | 477        | 500  |
| 21.01.2011 | 487           | 500  | 473           | 500  | 485      | 500  | 470      | 500  | 460          | 500  | 479          | 500  | 481          | 500  | 485          | 500  | 475        | 500  | 480        | 500  |
| 22.01.2011 | 467           | 500  | 478           | 500  | 473      | 500  | 471      | 500  | 451          | 500  | 464          | 500  | 489          | 500  | 479          | 500  | 473        | 500  | 484        | 500  |
| 23.01.2011 | 458           | 500  | 481           | 500  | 453      | 500  | 490      | 500  | 449          | 500  | 473          | 500  | 475          | 500  | 461          | 500  | 484        | 500  | 463        | 500  |
| 24.01.2011 | 473           | 500  | 480           | 500  | 460      | 500  | 480      | 500  | 460          | 500  | 470          | 500  | 480          | 500  | 490          | 500  | 480        | 500  | 475        | 500  |
| 25.01.2011 | 468           | 500  | 491           | 500  | 473      | 500  | 475      | 500  | 475          | 500  | 470          | 500  | 483          | 500  | 499          | 500  | 483        | 500  | 475        | 500  |
| 26.01.2011 | 454           | 500  | 475           | 500  | 476      | 500  | 476      | 500  | 480          | 500  | 479          | 500  | 490          | 500  | 505          | 500  | 489        | 500  | 460        | 500  |
| 27.01.2011 | 455           | 500  | 471           | 500  | 460      | 500  | 463      | 500  | 471          | 500  | 479          | 500  | 485          | 500  | 500          | 500  | 460        | 500  | 471        | 500  |
| 28.01.2011 | 470           | 500  | 498           | 500  | 485      | 500  | 499      | 500  | 491          | 500  | 487          | 500  | 485          | 500  | 500          | 500  | 479        | 500  | 495        | 500  |
| 29.01.2011 | 480           | 500  | 480           | 500  | 500      | 500  | 500      | 500  | 493          | 500  | 495          | 500  | 490          | 500  | 495          | 500  | 465        | 500  | 480        | 500  |
| 30.01.2011 | 480           | 500  | 483           | 500  | 500      | 500  | 500      | 500  | 499          | 500  | 490          | 500  | 487          | 500  | 500          | 500  | 470        | 500  | 473        | 500  |
| 31.01.2011 | 470           | 500  | 490           | 500  | 487      | 500  | 470      | 500  | 500          | 500  | 500          | 500  | 498          | 500  | 500          | 500  | 490        | 500  | 470        | 500  |
| 01.02.2011 | 485           | 500  | 499           | 500  | 490      | 500  | 498      | 500  | 489          | 500  | 495          | 500  | 500          | 500  | 495          | 500  | 499        | 500  | 467        | 500  |
| 02.02.2011 | 483           | 500  | 497           | 500  | 500      | 500  | 470      | 500  | 493          | 500  | 500          | 500  | 500          | 500  | 500          | 500  | 493        | 500  | 478        | 500  |
| 03.02.2011 | 490           | 500  | 500           | 500  | 498      | 500  | 491      | 500  | 494          | 500  | 498          | 500  | 497          | 500  | 499          | 500  | 500        | 500  | 480        | 500  |
| 04.02.2011 | 495           | 500  | 500           | 500  | 500      | 500  | 495      | 500  | 499          | 500  | 487          | 500  | 499          | 500  | 500          | 500  | 487        | 500  | 491        | 500  |
| 05.02.2011 | 500           | 500  | 500           | 500  | 500      | 500  | 494      | 500  | 500          | 500  | 483          | 500  | 500          | 500  | 500          | 500  | 500        | 500  | 495        | 500  |
| 06.02.2011 | 500           | 499  | 500           | 500  | 503      | 500  | 500      | 500  | 500          | 500  | 490          | 500  | 487          | 500  | 501          | 500  | 500        | 500  | 496        | 500  |
| 07.02.2011 | 500           | 491  | 500           | 500  | 495      | 500  | 487      | 500  | 490          | 500  | 500          | 500  | 493          | 500  | 503          | 500  | 490        | 500  | 481        | 500  |
| 08.02.2011 | 500           | 495  | 500           | 500  | 500      | 500  | 490      | 500  | 495          | 500  | 498          | 500  | 483          | 500  | 510          | 500  | 493        | 500  | 484        | 500  |
| 09.02.2011 | 495           | 500  | 489           | 500  | 500      | 500  | 500      | 500  | 500          | 500  | 498          | 500  | 487          | 500  | 503          | 500  | 498        | 500  | 493        | 500  |
| 10.02.2011 | 498           | 500  | 470           | 500  | 490      | 500  | 500      | 500  | 500          | 500  | 497          | 500  | 485          | 500  | 499          | 500  | 500        | 500  | 491        | 500  |
| 11.02.2011 | 500           | 479  | 500           | 500  | 495      | 500  | 497      | 500  | 495          | 500  | 497          | 500  | 473          | 500  | 500          | 500  | 489        | 500  | 495        | 500  |
| 12.02.2011 | 499           | 500  | 485           | 500  | 478      | 500  | 480      | 500  | 500          | 500  | 470          | 500  | 480          | 500  | 500          | 500  | 493        | 500  | 495        | 500  |
| 13.02.2011 | 489           | 500  | 481           | 500  | 491      | 500  | 476      | 500  | 500          | 500  | 463          | 500  | 460          | 500  | 500          | 500  | 498        | 500  | 499        | 500  |
| 14.02.2011 | 485           | 500  | 495           | 500  | 500      | 500  | 481      | 500  | 487          | 500  | 475          | 500  | 487          | 500  | 497          | 500  | 495        | 500  | 489        | 500  |
| 15.02.2011 | 491           | 500  | 500           | 500  | 500      | 500  | 485      | 500  | 473          | 500  | 480          | 500  | 480          | 490  | 483          | 500  | 500        | 500  | 483        | 500  |
| 16.02.2011 | 500           | 500  | 500           | 500  | 497      | 500  | 491      | 500  | 470          | 500  | 491          | 500  | 479          | 500  | 491          | 500  | 500        | 500  | 491        | 500  |
| 17.02.2011 | 500           | 499  | 500           | 500  | 494      | 500  | 495      | 500  | 469          | 500  | 493          | 500  | 471          | 505  | 497          | 500  | 495        | 500  | 493        | 500  |
| 18.02.2011 | 500           | 501  | 500           | 500  | 489      | 500  | 493      | 500  | 476          | 500  | 499          | 500  | 460          | 498  | 497          | 500  | 490        | 500  | 497        | 500  |
| 19.02.2011 | 500           | 489  | 500           | 500  | 485      | 500  | 499      | 500  | 471          | 500  | 500          | 500  | 445          | 495  | 498          | 500  | 499        | 500  | 499        | 500  |
| 20.02.2011 | 499           | 500  | 490           | 500  | 499      | 500  | 500      | 500  | 483          | 500  | 500          | 500  | 430          | 490  | 500          | 500  | 485        | 500  | 489        | 500  |
| 21.02.2011 | 500           | 497  | 500           | 500  | 496      | 500  | 500      | 500  | 478          | 500  | 496          | 500  | 443*         | 495  | 500          | 500  | 485        | 500  | 500        | 500  |

**Tab. 18 (Fortsetzung):** Rotametermessungen vor und nach der täglichen Eichung. Sollwert: 500 ml/24 min, Max. Abweichung  $\pm 10\%$  (450 - 550 ml); Gelbe Felder kennzeichnen Werte außerhalb der Toleranzgrenzen.

|            | 1             |      | 2             |      | 3        |      | 4        |      | 5            |      | 6            |      | 7            |      | 8            |      | 9          |      | 10         |      |
|------------|---------------|------|---------------|------|----------|------|----------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|------------|------|------------|------|
|            | Kontrolle (1) |      | Kontrolle (2) |      | DMSO (1) |      | DMSO (2) |      | 0,1 ng/L (1) |      | 0,1 ng/L (2) |      | 0,5 ng/L (1) |      | 0,5 ng/L (2) |      | 1 ng/L (1) |      | 1 ng/L (2) |      |
|            | vor           | nach | vor           | nach | vor      | nach | vor      | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor        | nach | vor        | nach |
| 22.02.2011 | 495           | 500  | 500           |      | 483      | 500  | 500      |      | 474          | 500  | 487          | 500  | 450          | 499  | 497          | 500  | 500        |      | 500        |      |
| 23.02.2011 | 591           | 500  | 499           | 500  | 491      | 500  | 500      |      | 486          | 500  | 493          | 500  | 487          | 500  | 501          | 500  | 473        | 500  | 498        | 500  |
| 24.02.2011 | 504           | 500  | 497           | 500  | 493      | 500  | 500      |      | 487          | 500  | 490          | 500  | 490          | 500  | 500          |      | 479        | 500  | 495        | 500  |
| 25.02.2011 | 493           | 500  | 493           | 500  | 499      | 500  | 501      | 500  | 499          | 500  | 498          | 500  | 490          | 500  | 494          | 500  | 481        | 500  | 499        | 500  |
| 26.02.2011 | 485           | 500  | 483           | 500  | 500      |      | 473      | 500  | 499          | 500  | 500          |      | 480          | 500  | 483          | 500  | 475        | 500  | 477        | 500  |
| 27.02.2011 | 483           | 500  | 475           | 500  | 500      |      | 479      | 500  | 498          | 500  | 501          | 500  | 487          | 500  | 485          | 500  | 479        | 500  | 483        | 500  |
| 28.02.2011 | 478           | 500  | 473           | 500  | 500      | 500  | 475      | 500  | 493          | 500  | 508          | 500  | 483          | 500  | 491          | 500  | 481        | 500  | 480        | 500  |
| 01.03.2011 | 491           | 500  | 481           | 500  | 498      | 500  | 473      | 500  | 497          | 500  | 508          | 500  | 477          | 500  | 497          | 500  | 497        | 500  | 491        | 500  |
| 02.03.2011 | 499           | 500  | 473           | 500  | 493      | 500  | 483      | 500  | 491          | 500  | 500          |      | 480          | 500  | 499          | 500  | 483        | 500  | 494        | 500  |
| 03.03.2011 | 500           |      | 490           | 500  | 495      | 500  | 485      | 500  | 489          | 500  | 500          |      | 485          | 500  | 500          |      | 497        | 500  | 499        | 500  |
| 04.03.2011 | 500           |      | 492           | 500  | 487      | 500  | 475      | 500  | 500          |      | 499          | 500  | 490          | 500  | 483          | 500  | 500        |      | 500        |      |
| 05.03.2011 | 510           | 500  | 498           | 500  | 483      | 500  | 491      | 500  | 493          | 500  | 491          | 500  | 497          | 500  | 498          | 500  | 493        | 500  | 498        | 500  |
| 06.03.2011 | 501           | 500  | 500           |      | 499      | 500  | 497      | 500  | 473          | 500  | 483          | 500  | 498          | 500  | 497          | 500  | 497        | 500  | 500        |      |
| 07.03.2011 | 498           | 500  | 500           |      | 500      |      | 499      | 500  | 481          | 500  | 489          | 500  | 500          |      | 483          | 500  | 580        | 500  | 501        | 500  |
| 08.03.2011 | 489           | 500  | 497           | 500  | 483      | 500  | 498      | 500  | 494          | 500  | 487          | 500  | 500          |      | 484          | 500  | 589        | 500  | 487        | 500  |
| 09.03.2011 | 480           | 500  | 483           | 500  | 487      | 500  | 500      |      | 499          | 500  | 493          | 500  | 499          | 500  | 500          |      | 588        | 500  | 491        | 500  |
| 10.03.2011 | 490           | 500  | 485           | 500  | 493      | 500  | 483      | 500  | 498          | 500  | 499          | 500  | 491          | 500  | 500          |      | 573        | 500  | 497        | 500  |
| 11.03.2011 | 490           | 500  | 490           | 500  | 497      | 500  | 487      | 500  | 500          |      | 487          | 500  | 493          | 500  | 498          | 500  | 579        | 500  | 496        | 500  |

\* Rotameter ausgetauscht

**Tab. 19:** Pumpenleistung vor und nach der Eichung. Sollwert 50 ml/30 min, Max. Abweichung  $\pm 10\%$  (45-55 ml)

|            | 3        |      | 4        |      | 5            |      | 6            |      | 7            |      | 8            |      | 9          |      | 10         |      |
|------------|----------|------|----------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|------------|------|------------|------|
|            | DMSO (1) |      | DMSO (2) |      | 0,1 ng/L (1) |      | 0,1 ng/L (2) |      | 0,5 ng/L (1) |      | 0,5 ng/L (2) |      | 1 ng/L (1) |      | 1 ng/L (2) |      |
|            | vor      | nach | vor      | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor        | nach | vor        | nach |
| 06.01.2011 | 47       | 49   | 48       | 50   | 50           |      | 46           | 49   | 48           | 50   | 50           |      | 49         | 50   | 47         | 49   |
| 07.01.2011 | 47       | 50   | 49       | 50   | 50           |      | 48           | 49   | 47           | 49   | 50           |      | 48         | 48   | 48         | 50   |
| 08.01.2011 | 48       | 49   | 49       | 50   | 50           |      | 48           | 50   | 48           | 50   | 50           |      | 48         | 50   | 49         | 49   |
| 09.01.2011 | 47       | 49   | 48       | 50   | 50           |      | 47           | 49   | 50           |      | 50           |      | 47         | 50   | 49         | 49   |
| 10.01.2011 | 48       | 49   | 49       | 50   | 50           |      | 48           | 50   | 50           |      | 50           |      | 50         |      | 47         | 50   |
| 11.01.2011 | 49       | 50   | 49       | 50   | 50           |      | 49           |      | 47           | 50   | 50           |      | 50         |      | 48         | 49   |
| 12.01.2011 | 48       | 50   | 49       |      | 49           |      | 49           | 49   | 49           |      | 48           | 50   | 49         |      | 49         | 49   |
| 13.01.2011 | 48       | 50   | 49       |      | 50           |      | 48           | 50   | 48           |      | 49           |      | 45         | 50   | 47         | 50   |
| 14.01.2011 | 48       | 50   | 49       | 48   | 50           |      | 51           | 50   | 47           | 50   | 49           |      | 46         | 50   | 48         | 48   |
| 15.01.2011 | 50       |      | 49       |      | 48           | 48   | 49           | 50   | 49           | 50   | 48           | 50   | 45         | 50   | 46         | 50   |
| 16.01.2011 | 50       |      | 49       |      | 47           | 47   | 50           |      | 50           |      | 50           |      | 51         | 50   | 47         | 50   |
| 17.01.2011 | 50       |      | 48       | 49   | 47           | 50   | 50           |      | 49           | 50   | 50           |      | 49         |      | 49         | 50   |
| 18.01.2011 | 49       | 50   | 47       | 50   | 48           | 49   | 48           | 50   | 50           |      | 50           |      | 48         | 50   | 48         | 49   |
| 19.01.2011 | 50       |      | 48       |      | 49           |      | 46           | 49   | 50           |      | 46           | 50   | 49         | 50   | 47         | 50   |
| 20.01.2011 | 50       |      | 46       | 49   | 49           |      | 47           | 50   | 50           |      | 48           | 49   | 50         |      | 48         | 50   |
| 21.01.2011 | 48       | 50   | 47       | 50   | 47           | 50   | 48           | 50   | 49           | 50   | 48           | 50   | 50         |      | 49         |      |
| 22.01.2011 | 49       | 50   | 48       | 50   | 49           |      | 48           | 49   | 48           | 50   | 49           |      | 49         |      | 48         | 50   |
| 23.01.2011 | 49       |      | 50       |      | 48           |      | 49           |      | 50           |      | 49           | 50   | 49         |      | 47         | 50   |
| 24.01.2011 | 49       |      | 50       |      | 45           | 50   | 49           |      | 50           |      | 47           | 50   | 48         | 50   | 49         | 49   |
| 25.01.2011 | 48       | 50   | 50       |      | 49           | 50   | 47           | 50   | 50           |      | 49           | 50   | 49         | 50   | 45         | 50   |
| 26.01.2011 | 49       | 50   | 47       | 49   | 48           | 50   | 50           |      | 49           |      | 50           |      | 46         | 50   | 46         | 50   |
| 27.01.2011 | 50       |      | 48       | 50   | 50           |      | 50           |      | 48           | 50   | 50           |      | 49         | 50   | 50         |      |
| 28.01.2011 | 50       |      | 49       | 50   | 50           |      | 50           |      | 49           | 50   | 50           |      | 48         | 50   | 50         |      |
| 29.01.2011 | 50       |      | 50       |      | 50           |      | 48           | 49   | 49           |      | 50           |      | 49         | 50   | 50         |      |
| 30.01.2011 | 50       |      | 48       | 50   | 47           | 50   | 49           |      | 46           | 50   | 49           | 50   | 49         | 50   | 50         |      |
| 31.01.2011 | 49       | 50   | 48       | 50   | 50           |      | 49           |      | 49           | 50   | 50           |      | 50         |      | 50         |      |
| 01.02.2011 | 47       | 50   | 49       | 50   | 46           | 50   | 48           | 50   | 48           | 50   | 49           | 50   | 50         |      | 47         | 50   |
| 02.02.2011 | 49       | 50   | 50       |      | 49           | 49   | 50           |      | 49           | 50   | 49           | 50   | 47         | 50   | 49         | 50   |
| 03.02.2011 | 48       | 50   | 50       |      | 49           | 50   | 49           | 50   | 50           |      | 49           | 50   | 50         |      | 49         |      |
| 04.02.2011 | 50       |      | 48       | 50   | 46           | 50   | 50           |      | 50           |      | 46           | 50   | 50         |      | 48         | 50   |
| 05.02.2011 | 50       |      | 46       | 50   | 49           | 50   | 50           |      | 49           | 50   | 45           | 50   | 50         |      | 50         |      |
| 06.02.2011 | 50       |      | 50       |      | 48           | 50   | 50           |      | 48           | 50   | 49           | 50   | 48         | 50   | 47         | 50   |
| 07.02.2011 | 49       | 50   | 50       |      | 49           | 50   | 50           |      | 50           |      | 49           | 50   | 50         |      | 48         | 50   |
| 08.02.2011 | 48       | 50   | 50       |      | 48           | 50   | 49           | 50   | 48           | 50   | 49           | 50   | 49         | 50   | 50         |      |
| 09.02.2011 | 49       | 50   | 48       | 50   | 50           |      | 50           |      | 47           | 50   | 48           | 50   | 49         | 50   | 48         | 50   |
| 10.02.2011 | 47       | 50   | 47       | 50   | 50           |      | 49           | 50   | 50           |      | 49           | 50   | 47         | 50   | 49         | 50   |
| 11.02.2011 | 50       |      | 49       | 49   | 48           | 50   | 48           | 50   | 49           |      | 50           |      | 50         |      | 49         | 50   |
| 12.02.2011 | 50       |      | 50       | 50   | 47           | 50   | 49           |      | 49           | 50   | 47           | 50   | 50         |      | 50         |      |
| 13.02.2011 | 50       |      | 48       | 50   | 49           | 50   | 50           |      | 48           | 50   | 50           |      | 48         | 50   | 48         | 50   |
| 14.02.2011 | 49       | 50   | 49       | 50   | 50           |      | 49           | 50   | 50           |      | 48           | 50   | 47         | 50   | 46         | 50   |
| 15.02.2011 | 49       | 50   | 49       | 50   | 50           |      | 50           |      | 48           | 50   | 49           | 50   | 48         | 50   | 49         | 50   |
| 16.02.2011 | 50       |      | 46       | 50   | 48           | 50   | 49           | 49   | 50           |      | 47           | 50   | 49         | 50   | 48         | 50   |
| 17.02.2011 | 48       | 50   | 49       | 50   | 49           | 50   | 48           | 50   | 47           | 50   | 48           | 50   | 49         |      | 47         | 50   |
| 18.02.2011 | 49       | 50   | 48       | 50   | 47           | 50   | 49           | 50   | 49           | 50   | 49           |      | 47         | 50   | 46         | 50   |
| 19.02.2011 | 47       | 50   | 49       | 50   | 50           |      | 50           |      | 48           | 50   | 49           | 50   | 48         | 50   | 50         |      |
| 20.02.2011 | 50       |      | 49       |      | 48           | 50   | 48           | 50   | 47           | 50   | 48           | 50   | 46         | 50   | 50         |      |
| 21.02.2011 | 49       |      | 49       | 50   | 49           |      | 47           | 50   | 48           | 50   | 46           | 50   | 47         | 50   | 49         | 50   |
| 22.02.2011 | 49       | 50   | 50       |      | 49           | 50   | 49           | 50   | 46           | 50   | 47           | 50   | 49         | 50   | 49         | 50   |

**Tab. 19 (Fortsetzung):** Pumpenleistung vor und nach der Eichung. Sollwert 50 ml/30 min, Max. Abweichung  $\pm 10\%$  (45-55 ml)

|            | 3        |      | 4        |      | 5            |      | 6            |      | 7            |      | 8            |      | 9          |      | 10         |      |
|------------|----------|------|----------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|------------|------|------------|------|
|            | DMSO (1) |      | DMSO (2) |      | 0,1 ng/L (1) |      | 0,1 ng/L (2) |      | 0,5 ng/L (1) |      | 0,5 ng/L (2) |      | 1 ng/L (1) |      | 1 ng/L (2) |      |
|            | vor      | nach | vor      | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor          | nach | vor        | nach | vor        | nach |
| 23.02.2011 | 49       | 50   | 50       |      | 50           |      | 50           |      | 50           |      | 50           |      | 49         | 50   | 47         | 50   |
| 24.02.2011 | 50       |      | 51       | 50   | 50           |      | 47           | 50   | 49           | 50   | 48           | 50   | 48         | 50   | 49         | 50   |
| 25.02.2011 | 50       |      | 49       | 50   | 48           | 50   | 48           | 50   | 48           | 50   | 49           |      | 47         | 50   | 48         | 50   |
| 26.02.2011 | 50       |      | 48       | 50   | 47           | 50   | 45           | 50   | 50           |      | 49           |      | 48         | 50   | 48         | 50   |
| 27.02.2011 | 48       | 50   | 49       | 50   | 49           | 49   | 47           | 50   | 49           | 50   | 46           | 50   | 48         | 50   | 47         | 50   |
| 28.02.2011 | 49       | 50   | 48       | 50   | 48           | 50   | 49           | 50   | 49           | 50   | 49           | 50   | 48         | 50   | 49         | 50   |
| 01.03.2011 | 50       |      | 49       | 50   | 50           |      | 50           |      | 48           | 48   | 49           | 50   | 49         | 50   | 50         |      |
| 02.03.2011 | 50       |      | 49       | 50   | 47           | 50   | 49           | 50   | 49           | 49   | 50           |      | 50         |      | 50         |      |
| 03.03.2011 | 49       | 50   | 47       |      | 45           | 50   | 49           | 50   | 50           |      | 48           | 49   | 49         | 50   | 50         |      |
| 04.03.2011 | 49       | 50   | 50       |      | 48           | 50   | 48           | 50   | 48           | 50   | 50           |      | 47         | 50   | 48         | 50   |
| 05.03.2011 | 47       | 50   | 50       | 50   | 50           |      | 49           | 50   | 49           | 50   | 49           |      | 46         | 50   | 49         | 50   |
| 06.03.2011 | 48       | 50   | 49       | 50   | 49           | 50   | 50           |      | 49           | 50   | 49           |      | 49         | 50   | 48         | 50   |
| 07.03.2011 | 50       |      | 47       | 50   | 48           | 50   | 50           |      | 47           | 50   | 49           | 50   | 49         | 50   | 47         | 50   |
| 08.03.2011 | 50       |      | 48       | 50   | 49           | 50   | 49           | 50   | 48           | 50   | 47           | 50   | 50         |      | 48         | 50   |
| 09.03.2011 | 50       | 50   | 46       | 50   | 49           | 50   | 47           | 50   | 49           | 50   | 50           |      | 49         | 50   | 50         |      |
| 10.03.2011 | 48       | 50   | 49       |      | 48           | 50   | 46           | 50   | 49           | 50   | 50           |      | 49         | 50   | 50         |      |
| 11.03.2011 | 49       |      | 50       |      | 48           | 50   | 49           | 50   | 50           |      | 50           |      | 48         | 50   | 50         |      |

**Tab. 20:** Boniturdaten des FSDT EE2 mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) im Zeitraum Teststart bis zum Einsatz in die Versuchsbecken

| Datum      | Tag | Kontrolle |         |    | DMSO    |         |   | 0,1 ng/L EE2 |         |    | 0,5 ng/L EE2 |         |    | 1,0 ng/L EE2 |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|------------|-----|-----------|---------|----|---------|---------|---|--------------|---------|----|--------------|---------|----|--------------|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|            |     | Repl. 1   | Repl. 2 |    | Repl. 1 | Repl. 2 |   | Repl. 1      | Repl. 2 |    | Repl. 1      | Repl. 2 |    | Repl. 1      | Repl. 2 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 11.01.2011 | 0   | 40        | 40      |    | 40      | 40      |   | 40           | 40      |    | 40           | 40      |    | 40           | 40      |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 12.01.2011 | 1   | 40        | 40      |    | 40      | 40      |   | 40           | 40      |    | 40           | 40      | 1  | 40           | 40      |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 13.01.2011 | 2   | 39        | 40      | 1  | 40      | 39      | 1 | 40           | 40      |    | 40           | 39      |    | 40           | 40      |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 14.01.2011 | 3   | 39        | 40      | 5  | 40      | 39      | 2 | 40           | 40      | 11 | 40           | 13      | 2  | 40           | 12      | 39 | 5  | 40 | 9  | 40 | 13 |    |    |    |    |
| 15.01.2011 | 4   | 39        | 40      | 28 | 40      | 30      |   | 40           | 19      | 39 | 21           |         | 40 | 33           | 38      | 28 | 40 | 35 | 39 | 27 | 40 | 31 | 40 | 38 |    |
| 16.01.2011 | 5   | 39        | 40      | 39 | 40      | 40      |   | 40           | 40      |    | 39           | 39      |    | 40           | 40      |    | 40 | 40 | 39 | 39 |    | 40 | 40 | 40 | 40 |

**Tab. 21:** Boniturdaten des FSDT EE2 mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) vom 17.1.2011 (Tag 6) bis Testende

| Becken | Datum      | Tag | Kontrolle |         | DMSO    |         | 0,1 ng/L EE2 |         | 0,5 ng/L EE2 |         | 1,0 ng/L EE2 |         |    |    |   |    |   |    |    |
|--------|------------|-----|-----------|---------|---------|---------|--------------|---------|--------------|---------|--------------|---------|----|----|---|----|---|----|----|
|        |            |     | Repl. 1   | Repl. 2 | Repl. 1 | Repl. 2 | Repl. 1      | Repl. 2 | Repl. 1      | Repl. 2 | Repl. 1      | Repl. 2 |    |    |   |    |   |    |    |
|        |            |     | 1         | 2       | 3       | 4       | 5            | 6       | 7            | 8       | 9            | 10      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 17.01.2011 | 6   | 39        | 40      | 40      | 39      | 40           | 38      | 40           | 39      | 40           | 40      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 18.01.2011 | 7   | 39        | 40      | 40      | 39      | 40           | 38      | 40           | 39      | 40           | 40      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 19.01.2011 | 8   | 39        | 40      | 40      | 39      | 40           | 38      | 40           | 39      | 40           | 40      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 20.01.2011 | 9   | 39        | 40      | 40      | 39      | 40           | 38      | 40           | 39      | 40           | 40      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 21.01.2011 | 10  | 39        | 40      | 40      | 39      | 40           | 38      | 40           | 39      | 40           | 40      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 22.01.2011 | 11  | 39        | 40      | 40      | 39      | 40           | 38      | 40           | 39      | 40           | 40      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 23.01.2011 | 12  | 36        | 3       | 40      | 36      | 4            | 39      | 40           | 36      | 2            | 32      | 8  | 36 | 3 | 34 | 6 | 30 | 10 |
|        | 24.01.2011 | 13  | 36        | 40      | 35      | 1       | 37           | 2       | 38           | 2       | 36           | 32      | 36 | 32 | 2 | 30 |   |    |    |
|        | 25.01.2011 | 14  | 36        | 39      | 1       | 35      | 32           | 5       | 38           | 36      | 32           | 35      | 1  | 30 | 2 | 30 |   |    |    |
|        | 26.01.2011 | 15  | 36        | 39      | 35      | 32      | 38           | 36      | 32           | 35      | 29           | 1       | 29 | 1  |   |    |   |    |    |
|        | 27.01.2011 | 16  | 35        | 1       | 39      | 35      | 32           | 37      | 1            | 36      | 32           | 35      | 29 | 29 |   |    |   |    |    |
|        | 28.01.2011 | 17  | 35        | 39      | 35      | 32      | 37           | 36      | 32           | 35      | 29           | 29      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 29.01.2011 | 18  | 35        | 39      | 35      | 32      | 37           | 36      | 32           | 35      | 29           | 29      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 30.01.2011 | 19  | 35        | 39      | 35      | 32      | 37           | 36      | 32           | 35      | 29           | 29      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 31.01.2011 | 20  | 35        | 39      | 35      | 32      | 37           | 36      | 32           | 34      | 1            | 29      | 29 |    |   |    |   |    |    |
|        | 01.02.2011 | 21  | 35        | 39      | 35      | 32      | 37           | 36      | 32           | 33      | 1            | 29      | 27 | 2  |   |    |   |    |    |
|        | 02.02.2011 | 22  | 35        | 39      | 35      | 32      | 37           | 36      | 32           | 33      | 28           | 1       | 27 |    |   |    |   |    |    |
|        | 03.02.2011 | 23  | 35        | 39      | 35      | 32      | 37           | 36      | 32           | 33      | 28           | 27      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 04.02.2011 | 24  | 35        | 39      | 35      | 32      | 37           | 35      | 1            | 32      | 33           | 28      | 27 |    |   |    |   |    |    |
|        | 05.02.2011 | 25  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 1       | 35           | 32      | 33           | 28      | 27 |    |   |    |   |    |    |
|        | 06.02.2011 | 26  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 33      | 28           | 27      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 07.02.2011 | 27  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 33      | 27           | 1       | 27 |    |   |    |   |    |    |
|        | 08.02.2011 | 28  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 1            | 27      | 27 |    |   |    |   |    |    |
|        | 09.02.2011 | 29  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 27           | 26      | 1  |    |   |    |   |    |    |
|        | 10.02.2011 | 30  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 27           | 26      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 11.02.2011 | 31  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 27           | 26      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 12.02.2011 | 32  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 27           | 26      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 13.02.2011 | 33  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 27           | 26      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 14.02.2011 | 34  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 26           | 1       | 25 | 1  |   |    |   |    |    |
|        | 15.02.2011 | 35  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 26           | 25      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 16.02.2011 | 36  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 26           | 25      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 17.02.2011 | 37  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 26           | 25      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 18.02.2011 | 38  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 26           | 25      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 19.02.2011 | 39  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 32      | 26           | 25      |    |    |   |    |   |    |    |
|        | 20.02.2011 | 40  | 35        | 39      | 35      | 32      | 36           | 35      | 32           | 31      | 1            | 26      | 24 | 1  |   |    |   |    |    |

**Tab. 21 (Forts.):** Boniturdaten des FSDT EE2 mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*) vom 17.1.2011 (Tag 6) bis Testende

| Becken     | Datum | Kontrolle |   |         |   | DMSO    |   |         |   | 0,1 ng/L EE2 |   |         |   | 0,5 ng/L EE2 |   |         |   | 1,0 ng/L EE2 |   |         |   |
|------------|-------|-----------|---|---------|---|---------|---|---------|---|--------------|---|---------|---|--------------|---|---------|---|--------------|---|---------|---|
|            |       | Repl. 1   |   | Repl. 2 |   | Repl. 1 |   | Repl. 2 |   | Repl. 1      |   | Repl. 2 |   | Repl. 1      |   | Repl. 2 |   | Repl. 1      |   | Repl. 2 |   |
|            |       | n         | † | n       | † | n       | † | n       | † | n            | † | n       | † | n            | † | n       | † | n            | † | n       | † |
| 21.02.2011 | 41    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 26           |   | 24      |   |
| 22.02.2011 | 42    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 25           | 1 | 23      | 1 |
| 23.02.2011 | 43    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 24           | 1 | 23      |   |
| 24.02.2011 | 44    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 24           |   | 23      |   |
| 25.02.2011 | 45    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 24           |   | 23      |   |
| 26.02.2011 | 46    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 24           |   | 23      |   |
| 27.02.2011 | 47    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           | 1 | 22      | 1 |
| 28.02.2011 | 48    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      | 1 |
| 01.03.2011 | 49    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      |   |
| 02.03.2011 | 50    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      |   |
| 03.03.2011 | 51    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      |   |
| 04.03.2011 | 52    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      |   |
| 05.03.2011 | 53    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      |   |
| 06.03.2011 | 54    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      |   |
| 07.03.2011 | 55    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      |   |
| 08.03.2011 | 56    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      |   |
| 09.03.2011 | 57    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      |   |
| 10.03.2011 | 58    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      |   |
| 11.03.2011 | 59    | 35        |   | 39      |   | 35      |   | 32      |   | 36           |   | 35      |   | 32           |   | 31      |   | 23           |   | 21      |   |

**Tab. 22:** Ergebnisse der Vitellogeninmessungen aus dem Homogenat von Kopf und Schwanz von Zebrafischen nach Belastung mit Ethinylöstradiol (EE2). Werte in ng/g Körpergewicht (KG)

|                        |                      | Kontrolle      | DMSO           | 0,1 ng/L EE2   | 0,5 ng/L EE2   | 1 ng/L EE2     |
|------------------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Weibchen</b>        | <b>VTG (ng/g KG)</b> | <b>294.632</b> | <b>216.892</b> | <b>247.901</b> | <b>509.164</b> | <b>512.848</b> |
|                        | Min                  | 376            | 23.776         | 2.341          | 1.792          | 1.618          |
|                        | Max                  | 754.000        | 952.000        | 645.000        | 1.940.000      | 1.160.000      |
|                        | SD                   | 1.619          | 204.045        | 202.698        | 453.007        | 373.768        |
|                        | <b>n</b>             | <b>19</b>      | <b>25</b>      | <b>22</b>      | <b>31</b>      | <b>21</b>      |
| <b>Männchen</b>        | <b>VTG (ng/g KG)</b> | <b>1.877</b>   | <b>2.244</b>   | <b>892</b>     | <b>2.963</b>   | <b>2.308</b>   |
|                        | Min                  | 50             | 596            | 151            | 1.178          | 767            |
|                        | Max                  | 5.541          | 10.891         | 2.526          | 4.550          | 6.316          |
|                        | SD                   | 1.424          | 2.383          | 573            | 1.026          | 1.163          |
|                        | <b>n</b>             | <b>30</b>      | <b>24</b>      | <b>24</b>      | <b>17</b>      | <b>19</b>      |
| <b>Testis-ova</b>      | <b>VTG (ng/g KG)</b> | <b>5.903</b>   | <b>757</b>     | <b>3.265</b>   | <b>12.873</b>  | -              |
|                        | Min                  | -              | 639            | 1.335          | 4.050          | -              |
|                        | Max                  | -              | 875            | 10.181         | 21.695         | -              |
|                        | SD                   | -              | 167            | 3.875          | 12477          | -              |
|                        | <b>n</b>             | <b>1</b>       | <b>2</b>       | <b>5</b>       | <b>2</b>       | -              |
| <b>Undifferenziert</b> | <b>VTG (ng/g KG)</b> | <b>179</b>     | -              | -              | -              | <b>1.927</b>   |
|                        | Min                  | -              | -              | -              | -              | -              |
|                        | Max                  | -              | -              | -              | -              | -              |
|                        | SD                   | -              | -              | -              | -              | -              |
|                        | <b>n</b>             | <b>1</b>       | -              | -              | -              | <b>1</b>       |