

Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Ökologische Chemie und Umweltanalytik
der Technischen Universität München

Effekte von 17 α -Ethinylestradiol und Trenbolon auf das Zooplankton aquatischer Modellökosysteme

Dipl.- Biol. Univ. Wolfgang Jaser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.Prof. Dr. rer. nat. Dr. agr. habil. H. Parlar
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. h.c. (RO) A. Kettrup
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. W. Huber
3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. agr. habil. K.-W. Schramm

Die Dissertation wurde am 22.09.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 13.12.2003 angenommen.

Publikationsliste

Journals

Jaser Wolfgang, Severin Gabriele F., Jütting Uta, Jüttner Ingrid, Schramm Karl-Werner, Kettrup Antonius 2003. Effects of 17α -ethinylestradiol on the reproduction of the cladoceran species *Ceriodaphnia reticulata* and *Sida crystallina*. Environment International, **28**: 633-638.

Reports

Hense B.A., Severin G.F., Jüttner I., Jaser W., Welzl G., Schramm K.-W. 2002. Effects of the Endocrine Disruptors Nonylphenol and Ethinylestradiol on the Phytoplankton Community in Aquatic Model Ecosystems. GSF-Report 02/02, 25-33, ISSN 0721-1694. Neuherberg, Germany.

Extended Abstracts

Jaser W., Severin G.F., Jütting U., Jüttner I., Schramm K.-W., Kettrup A. 2001. Acute toxicity of 17α -ethinylestradiol and effects on the reproduction of the cladoceran species *Ceriodaphnia reticulata* and *Sida crystallina*. Secotox World Congress and Sixth European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety. Ecotoxicology and Environmental Safety on the Verge of the Third Millenium: Trends, Threats and Challenges. Congress Proceedings, First Edition, 184-187.

Jaser W., Severin G.F., Jütting U., Jüttner I., Schramm K.-W., Kettrup A. 2001. Effects of 17α -ethinylestradiol on the reproduction of *Ceriodaphnia reticulata* and *Sida crystallina*. Organohalogen Compounds, **52**: 132-134.

Höss S., Severin G.F., Jaser W., Schramm K.-W. 2001. A bioassay on the effects of 17α -Ethinylestradiol and Trenbolone on growth and reproduction of *Caenorhabditis elegans*. Secotox World Congress and Sixth European

Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety. Ecotoxicology and Environmental Safety on the Verge of the Third Millennium: Trends, Threats and Challenges. Congress Proceedings, First Edition, 254-257.

Severin G.F., Pfister G., Welzl G., Jaser W., Hense B.A., Schramm K.-W. 2001. Effects of endocrine disruptors on the biocenosis of aquatic model ecosystems. Secotox World Congress and Sixth European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety. Ecotoxicology and Environmental Safety on the Verge of the Third Millennium: Trends, Threats and Challenges. Congress Proceedings, First Edition, 26-28.

Höss S., Severin G.F., Jaser W., Schramm K.-W. 2001. Effects of 17 α -Ethinylestradiol and Trenbolone on the growth and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). Organohalogen Compounds, **53**: 106-108.

Hense B.A., Severin G.F., Jaser W., Welzl G., Pfister G., Schramm K.-W. Investigations on Phytoplankton communities in microcosms exposed to the endocrine disruptor 17 α -ethinylestradiol. Organohalogen Compounds, **52**: 135-138.

Hense BA, Jaser W, Severin GF, Welzl G, Pfister G, Schramm K-W. 2002. Influence of the endocrine disruptor 17 α -ethinylestradiol on phytoplankton diversity in aquatic microcosms. Organohalogen Compounds 57: 447-450.

Poster

Jaser W., Severin G.F., Pfister G., Kettrup A., Schramm K.-W. Effects of 17 α -Ethinylestradiol on the zooplankton of freshwater microcosms. SETAC Europe 11th Annual Meeting, 6-10 May 2001, Madrid, Spain.

Jaser W., Severin G. F., Jütting U., Jüttner I., Schramm K.-W., Kettrup A. Effects of 17 α -Ethinylestradiol on the reproduction of *Ceriodaphnia reticulata* and *Sida crystallina*. SETAC Europe 11th Annual Meeting, 6-10 May 2001, Madrid, Spain.

Jaser W., Severin G.F., Pfister G., Kettrup A., Schramm K.-W. Effects of trenbolone on the zooplankton of aquatic model ecosystems. 2002. SETAC Europe 2002; 12-16.05.02 Vienna, Austria.

Jaser W., Severin G. F., Jütting U., Schramm K.-W., Kettrup A.. Effects of 17 α -Ethinylestradiol on the reproduction of selected freshwater cladocerans. 2nd Asian Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety; 22-26.09.2002, Wuhan, P.R. China.

Jaser W., Severin G.F., Jütting U., Jüttner I., Schramm K.-W., Kettrup A. 2002. Wirkung von 17 α -Ethinylestradiol auf die Reproduktion ausgewählter Cladoceren-Arten. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft der GDCh, May 5-8, Eichstätt, Germany.

Severin G.F., Hense B.A., Pfister G., Welzl G., Jaser W., Schramm K.-W. 2002. Microcosm studies on the effects of endocrine disrupting chemicals on aquatic ecosystems. 2nd Asian Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety; 22-26.09.2002, Wuhan, P.R. China.

Pfister G., Severin G.F., Jaser W., Schramm K.-W., Kettrup A. Controlled Release-Systeme zu Aufbau und Stabilisierung von Wirkstoffkonzentrationen in aquatischen Testvorrichtungen. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft der GDCh, May 5-8, Eichstätt, Germany.

S. Theimer, W. Jaser, G.F. Severin, A. Kettrup, K.-W. Schramm. Investigations on a possible relation of catecholamines in the blood plasma and PCDD/F concentration in the liver of silvercarp (*Hypophthalmichthys molitrix*). 9th Regional Meeting of the Central and East European Section of SECOTOX, 13-16 Oct. 2002, Brno, Czech Republic.

Vorträge

Hense B.A., Severin G.F., Jaser W., Welzl G., Jüttner I., Schramm K.-W., Kettrup A. Effects of the endocrine disruptors nonylphenol and ethinylestradiol on phytoplankton in aquatic microcosms. SETAC Europe 11th Annual Meeting, 6-10 May 2001, Madrid, Spain.

Hense B.A., Welzl G., Severin G.F., Jaser W., Schramm K.-W. 2002. Ecological structures of zoo- and phytoplankton in aquatic microcosms treated with endocrine disruptors. SETAC Europe 2002; 12-16.05.02 Vienna, Austria.

W. Jaser, G.F. Severin, G. Pfister, A. Kettrup, K.-W. Schramm. Effects of trenbolone on the zooplankton of aquatic model ecosystems. 9th Regional Meeting of the Central and East European Section of SECOTOX, 13-16 Oct. 2002, Brno, Czech Republic.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
cdt	canonischer Koeffizient
CE	Chloroformextraktion
Chl- <u>a</u>	Chlorophyll- <u>a</u>
DHBA	3,4-Dihydroxybenzylamin
E	Evenness
EC 50	Effective Concentration (50%)
ED	Elektrochemische Detektion
17 α -EE	17 α -Ethinylestradiol
EPA	Environmental Protection Agency
\bar{H}	Diversitätsindex
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ind/l	Individuen pro Liter
K	Boltzmann-Konstante
LDPE	Low Density Polyethylen
MI	Maturity Index
MK	Mikrokosmos
MS 222	Ethyl 3-aminobenzoatmethansulfonat
MW	Mittelwert
PC	Physikalisch-Chemische Parameter
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PK	Plasmakit
PP	Phytoplankton
PRC	Principal Response Curve
RDA	Redundanzanalyse
SOP	Standardarbeitsanweisung (engl. Standard operating procedure)
STABWN	Standardabweichung
Tab.	Tabelle

Abkürzungsverzeichnis

TB	Trenbolon
UV	Ultraviolett
VA	Edelstahl
WA	Wasseranalytik
ZP	Zooplankton

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	20
1.1. Gefährdung der Umwelt durch Xenobiotika	20
1.2. Testsubstanzen der Mikrokosmenversuche 2000 und 2001	22
1.2.1. Ethinylestradiol	22
1.2.2. Trenbolon	25
1.3. Prinzip der Funktionsweise des endokrinen Systems	27
1.4. Funktion der Katecholamine	28
1.5. Zielsetzung der Arbeit	31
1.5.1. Mikrokosmenversuche	31
1.5.2. Katecholaminanalytik	32
2. MATERIAL UND METHODEN	33
2.1. Mikrokosmenversuche	33
2.1.1. Ethinylestradiol	33
2.1.2. Trenbolon	33
2.1.3. Mikrokosmenanlage	34
2.1.4. Präparation der Zooplanktonproben	50
2.1.5. Zähl- und Bestimmungsmethodik	51
2.1.6. Auswertung der Meiobenthosproben	51
2.1.7. Auswertemethoden	54
2.2. Katecholaminbestimmung	58
2.2.1. HPLC Anlage	58
2.2.2. Präparation der Proben für die Katecholaminbestimmung	63
2.2.2.1. Chloroformextraktion	63
2.2.2.2. Plasmakit	64
2.2.2.3. Kombination Chloroformextraktion mit Plasmakit	65

2.2.3.	Versuche mit <i>Danio rerio</i>	66
2.2.3.1.	Beschreibung des genetischen Stammes.....	66
2.2.3.2.	Systematik, Lebensweise und Verbreitung.....	66
2.2.3.3.	Genetik	67
2.2.3.4.	Hälterung der Versuchstiere	67
2.2.3.5.	Probenahme („Stressfreies Töten“)	67
3.	ERGEBNISSE	69
3.1.	Mikrokosmenversuch mit 17α-EE 2000	69
3.1.1.	Vorversuche mit <i>Caenorhabditis elegans</i>	69
3.1.2.1.	17 α -EE-Konzentrationen in den belasteten Mikrokosmen A bis F (zeitlicher Verlauf).....	71
3.1.5.3.1.	Totale Abundanzen der Cladocera	84
3.1.5.3.2.	Totale Abundanzen der Copepoda.....	85
3.1.5.3.3.	Totale Abundanzen der Rotatoria.....	85
3.1.5.5.1.	Biovolumina der verschiedenen Ernährungstypen Räuber – Algenfresser – Sonstige	90
3.2.	Mikrokosmenversuch mit Trenbolon 2001	94
3.2.1.	Vorversuche mit <i>Caenorhabditis. elegans</i>	94
3.2.2.	Chlorophyll-a-Messung mittels durchflusszytometrischer Methoden	96
3.2.3.	Funktionelle Parameter.....	97
3.2.3.1.	Wassertemperatur	97
3.2.3.2.	pH-Wert	98
3.2.3.3.	Leitfähigkeit	99
3.2.3.4.	Sauerstoffsättigung und -gehalt.....	100
3.2.3.5.	Ammonium	101
3.2.3.6.	Ortho-Phosphat	102
3.2.3.7.	Nitrat	103
3.2.4.	Zooplankton.....	104
3.2.4.1.	Anzahl der Taxa	104
3.2.4.2.	Diversität und Evenness	105

3.2.4.3.	Populationsdynamik	106
3.2.4.3.1.	Totale Abundanzen der Cladocera	106
3.2.4.3.2.	Totale Abundanzen der Copepoda.....	107
3.2.4.3.3.	Totale Abundanzen der Rotatoria.....	108
3.2.4.4.	Biovolumina der verschiedenen Ernährungstypen Räuber – Algenfresser – Sonstige.....	109
3.2.4.5.	Principal Response Curve und Species Score der Gruppen der Cladocera, Rotatoria und Copepoda	112
3.2.4.6.	Principal Response Curve und Species Score der einzelnen Taxa.....	113
3.2.5.	Phytoplankton.....	116
3.2.6.	Meiobenthos	117
3.3.	Versuche zur Katecholaminanalytik	125
3.3.1.	Vergleich verschiedener Methoden beim Einsatz diverser Matrices.....	125
3.3.2.	Messungen mit Danio rerio.....	126
4.	DISKUSSION	130
4.1.	Funktionelle Parameter in den Mikrokosmen	130
4.2.	Populationsdynamik.....	131
4.2.1.	Endokrinologie des Zooplanktons.....	131
4.2.2.	Endokrinologie der Crustacea	132
4.2.3.	Entwicklung der Kontrollmikrokosmen.....	133
4.2.4.	Effekte von Xenobiotika auf das Zooplankton.....	134
4.2.5.	Entwicklung des Zooplanktons, Mikrokosmenversuch 2000, Testsubstanz 17 α -EE	136
4.2.5.1.	Entwicklung der Rotatoria-Populationen.....	136
4.2.5.2.	Entwicklung der Cladocera-Populationen.....	136
4.2.5.3.	Entwicklung der Copepoda-Populationen.....	138
4.2.5.4.	Anzahl der Taxa, Diversität und Evenness	141
4.2.6.	Entwicklung des Zooplanktons, Mikrokosmenversuch 2001, Testsubstanz TB.....	142
4.2.6.1.	Entwicklung der Rotatoria-Populationen.....	142

4.2.6.2.	Entwicklung der Cladocera-Populationen	143
4.2.6.3.	Entwicklung der Copepoda-Populationen.....	144
4.2.6.4.	Anzahl der Taxa, Diversität und Evenness	145
4.2.7.	Intra- und interspezifische Wechselwirkungen in den Mikrokosmen.....	146
4.2.7.1.	Wechselwirkungen im Nahrungsnetz im Versuch mit 17 α -EE	147
4.2.7.2.	Wechselwirkungen im Nahrungsnetz im Versuch mit TB	148
4.3.	Versuche zur Katecholaminanalytik	149
4.3.1.	Methodenvergleich	149
4.3.2.	Versuche mit Danio rerio	149
5.	ZUSAMMENFASSUNG	151
6.	AUSBLICK	155
7.	LITERATURVERZEICHNIS	156

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel des synthetischen Hormons 17 α -Ethinylestradiol	22
Abbildung 2: Strukturformel des natürlich vorkommenden Geschlechtshormon 17 β -Estradiol	22
Abbildung 3: Strukturformel des synthetisches Steroids Trenbolon.	25
Abbildung 4: Strukturformel des Katecholamins Noradrenalin.....	30
Abbildung 5: Strukturformel des natürlichen Botenstoffs Adrenalin	30
Abbildung 6: Strukturformel des Neurotransmitters Dopamin (Hydroxytyramin).....	30
Abbildung 7: Einzelner mit Sediment und Wasser eingerichteter Mikrokosmos mit Dosiereinrichtung.....	34
Abbildung 8: Mikrokosmenanlage der GSF, Standort Neuherberg, mit automatisch schließendem Dach und künstlich angelegtem Teich und den darin installierten Mikrokosmen während der Einrichtung.....	35
Abbildung 9: Sedimententnahme an einer oligo-mesotrophen Litoralstelle des Ammersees bei Schondorf für den Mikrokosmenversuch 2000.....	38
Abbildung 10: Wasserentnahme am Ammersee. Befüllung des 1000 l Rundtanks. Filterung des Wassers mit 63 μ m Gaze.....	39
Abbildung 11: Edelstahl-Dosiereinrichtung in den Versuchen mit 17 α -EE 2000 und TB 2001. Beschreibung siehe Text.....	43
Abbildung 12: Probenehmer aus Edelstahl zur Entnahme von Zooplankton aus den Mikrokosmen; Fassungsvermögen: 0,5 l.....	45
Abbildung 13: Vorrichtung zur Entnahme von Sedimentkernen aus den Mikrokosmen.	47
Abbildung 14: Gemessene Körperlängen von <i>Caenorhabditis elegans</i> nach Exposition mit verschiedenen Konzentrationen Ethinylestradiol.....	69
Abbildung 15: <i>C. elegans</i> : Anzahl der Nachkommen pro Individuum bei einer Ethinylestradiol Exposition bis 250 μ g/l.	70
Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Ethinylestradiolkonzentrationen in den Mikrokosmen A bis F.	71
Abbildung 17: Integrale der Ethinylestradiolkonzentrationen im Versuchsjahr 2000 in den Mikrokosmen A bis F.	72
Abbildung 18: Chlorophyll-a-Werte in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75%	

Quantile liegen werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	73
Abbildung 19: Durchschnittliche Wassertemperatur in den Mikrokosmen im Versuch mit 17 α -EE.....	74
Abbildung 20: pH Wert Messungen in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	75
Abbildung 21 Leitfähigkeitswerte in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	76
Abbildung 22: Gemessene Sauerstoffsättigung in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	78
Abbildung 23: Ammoniumkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	79
Abbildung 24: Nitratkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	80
Abbildung 25: Ortho-Phosphatkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden	

durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	81
Abbildung 26: Anzahl verschiedener Taxa in den Kontrollen und mit 17 α -EE applizierten Mikrokosmen.	82
Abbildung 27: Diversitätsindex nach Shannon und Weaver auf Gruppenniveau.....	83
Abbildung 28: Gleichmäßigkeit (Evenness) für den Vergleich der Gruppen Cladocera, Copepoda und Rotatoria.....	83
Abbildung 29: Totale Abundanzen der Cladocera im Versuch mit Ethinylestradiol. .	84
Abbildung 30: Totale Abundanzen der Copepoda im Versuch mit Ethinylestradiol. .	85
Abbildung 31: Totale Abundanzen der Rotatoria im Versuch mit Ethinylestradiol. Logarithmische Skala.	85
Abbildung 32: Principal Response Curves für Rotatoria, Cladocera und Copepoda im Versuch mit 17 α -EE.....	87
Abbildung 33 Principal Response Curve für die einzelnen Taxa im Versuch mit 17 α -EE.	88
Abbildung 34: Logarithmische Darstellung der Biovolumina der Räuber und Omnivoren in den Mikrokosmen aufgetragen gegen die Zeit.	90
Abbildung 35: Logarithmische Darstellung der Biovolumina der Algenfresser in den Mikrokosmen aufgetragen gegen die Zeit.....	91
Abbildung 36: Logarithmische Darstellung der Biovolumina der Zooplankter („Sonstige“), die weder der Gruppe der Räuber und Allesfresser, noch eindeutig den Phytoplanktonkonsumenten zugeordnet werden konnten gegen die Zeit....	91
Abbildung 37: Gesamtzelldichte des Phytoplanktons in den Kontrollen K1 bis K4 und den mit 17 α -EE belasteten Mikrokosmen A, C, E und F.....	93
Abbildung 38: Biovolumen des Phytoplanktons pro Wasservolumen in den Kontrollen K1 bis K4 und den mit 17 α -EE belasteten Mikrokosmen A, C, E und F.	93
Abbildung 39: Gemessene Körperlängen von <i>Caenorhabditis elegans</i> nach Exposition mit verschiedenen Konzentrationen von Trenbolon.	94
Abbildung 40: <i>C. elegans</i> : Anzahl der Nachkommen pro Individuum bei einer Trenbolon Exposition bis 50 μ g/l.....	95
Abbildung 41: Chlorophyll-a-Werte in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-,	

bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	96
Abbildung 42: Durchschnittliche Wassertemperatur in den Mikrokosmen im Versuch mit TB.	97
Abbildung 43 pH Wert Messungen in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	98
Abbildung 44 Leitfähigkeitswerte in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	99
Abbildung 45: Gemessene Sauerstoffsättigung in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	100
Abbildung 46 Ammoniumkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	101
Abbildung 47 Ortho-Phosphatkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	102
Abbildung 48: Nitratkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.	103

Abbildung 49: Anzahl verschiedener Taxa in den Kontrollen und den mit Trenbolon applizierten Mikrokosmen.	104
Abbildung 50: Gleichmäßigkeit (Evenness) für den Vergleich der Gruppen Cladocera, Copepoda und Rotatoria.....	105
Abbildung 51: Diversitätsindex nach Shannon und Weaver auf Gruppenniveau....	105
Abbildung 52: Totale Abundanzen der Cladocera in den Kontrollen und TB belasteten Mikrokosmen A bis F. Logarithmische Skala.....	106
Abbildung 53: Totale Abundanzen der Copepoda in den Kontrollen und TB belasteten Mikrokosmen A bis F. Logarithmische Skala.....	107
Abbildung 54: Totale Abundanzen der Rotatoria in den Kontrollen und TB belasteten Mikrokosmen A bis F. Logarithmische Skala.	108
Abbildung 55: Logarithmische Darstellung der Biovolumina der Räuber und Omnivoren in den Mikrokosmen aufgetragen gegen die Zeit	109
Abbildung 56: Logarithmische Darstellung der Biovolumina der Algenfresser in den Mikrokosmen aufgetragen gegen die Zeit.....	111
Abbildung 57: Logarithmische Darstellung der Biovolumen der Zooplankter („Sonstige“), die weder der Gruppe der Räuber und Allesfresser, noch eindeutig den Phytoplankton-konsumenten zugeordnet werden konnten, gegen die Zeit.....	111
Abbildung 58: Principal Response Curve berechnet über den gesamten Versuchszeitraum aus den absoluten Abundanzen der Gruppe der Cladocera, Copepoda und Rotatoria im Versuch mit Trenbolon.....	112
Abbildung 59: Principal Response Curve der einzelnen Taxa im Mikrokosmenversuch mit Trenbolon. Die Mittelwerte der Kontrollen bilden die Nulllinie. Aus den totalen Abundanzen der belasteten Mikrokosmen wurden die Mittelwerte errechnet und den Kontrollen gegenübergestellt.	113
Abbildung 60: Principal Response Curve der einzelnen Taxa (totale Abundanzen). Mittelwerte der Kontrollen als Nulllinie. Belastung der Mikrokosmen mit Trenbolon.	113
Abbildung 61: Gesamtzelldichte des Phytoplanktons in den Kontrollen K1 bis K4 und den mit TB belasteten Mikrokosmen A, C, D, E und F.....	116
Abbildung 62: Biovolumen des Phytoplanktons pro Wasservolumen in den Kontrollen K1 bis K4 und den mit TB belasteten Mikrokosmen A, C, D, E und F.	116
Abbildung 63: Abundanzen aller Organismen der Meiofauna.....	117

Abbildung 64: Abundanzen der Nematoda in Mikrokosmen über einen Zeitraum von 18 Wochen.	118
Abbildung 65: Relative Häufigkeit der Nematoda in Mikrokosmen über einen Zeitraum von 18 Wochen.....	119
Abbildung 66: Principal Response Kurven der meiobenthischen Lebensgemeinschaft in Mikrokosmen (relative Häufigkeiten); Die Mikrokosmen wurden mit verschiedenen Konzentration an Trenbolon angereichert (TB 1-4 entspricht C-F); Nulllinie repräsentiert die Kontrollen.	120
Abbildung 67: Zusammensetzung der Meiofauna (Nematoda, Ostracoda, Copepoda, Tardigrada, Chironomidae Phyllopoda, Sonstige) in Mikrokosmen, Woche 7; Links sind die vier Replikate der Kontrolle (K 1-4), rechts die unterschiedlich belasteten TB-Behandlungen (C-F) abgebildet.	120
Abbildung 68: Zusammensetzung der Meiofauna (Nematoda, Ostracoda, Copepoda, Tardigrada, Chironomidae Phyllopoda, Sonstige) in Mikrokosmen, Woche 10; Links sind die vier Replikate der Kontrolle (K 1-4), rechts die unterschiedlich belasteten TB-Behandlungen (C-F) abgebildet.	121
Abbildung 69: Zusammensetzung der Meiofauna (Nematoda, Ostracoda, Copepoda, Tardigrada, Chironomidae Phyllopoda, Sonstige) in Mikrokosmen, Woche 17; Links sind die vier Replikate der Kontrolle (K 1-4), rechts die unterschiedlich belasteten TB-Behandlungen (C-F) abgebildet.	121
Abbildung 70: Maturity Index für die Nematoda-Lebensgemeinschaft in den Kontrollen K1 bis K4 und in den Mikrokosmen C bis F über einen Zeitraum von 18 Wochen. Die Mikrokosmen wurden mit verschiedenen Konzentration an Trenbolon angereichert.....	122
Abbildung 71: Maturity Index für die Nematoda-Lebensgemeinschaft in den Kontrollen K1 bis K4 und in den Mikrokosmen C und E über einen Zeitraum von 18 Wochen. Die Mikrokosmen wurden mit verschiedenen Konzentration an Trenbolon angereichert.....	122
Abbildung 72: Anteil von Bakterienfressern, Algenfressern und Räubern/Omnivoren in Mikrokosmen über einen Zeitraum von 18 Wochen. Die Mikrokosmen wurden mit verschiedenen Konzentration an Trenbolon angereichert (TB 1-4); rote Kästchen: Mittelwerte der Kontrollen mit Standardabweichung (n = 4).	123
Abbildung 73: Principal Response Kurven der Artenzusammensetzung der Nematoda-Lebensgemeinschaften in Mikrokosmen (relative Häufigkeiten); Die	

Mikrokosmen wurden mit verschiedenen Konzentration an Trenbolon angereichert (TB 1-4); Nulllinie repräsentiert die Kontrollen.	124
Abbildung 74: Katecholaminkonzentrationen in <i>Danio rerio</i> . Die Probanden wurden a) durch Keschern ohne vorheriges Betäubung gefangen (Probenbezeichnung: „Kesch“) und b) durch eine überhöhte Dosis Tricain (350 mg/l, bzw. 500 mg/l) vor der Entnahme aus dem Hälterungsbecken getötet („Tric 350“, bzw. „Tric 500“).	127
Abbildung 75: Katecholaminkonzentrationen in <i>Danio rerio</i> bei verschiedenen Fangmethoden. Die Probanden wurden zum einen durch Keschern ohne vorheriges Betäubung gefangen, zum andern durch eine überhöhte Dosis Tricain (350 mg/l, bzw. 500 mg/l) vor der Entnahme aus dem Hälterungsbecken getötet.	128
Abbildung 76: Nahrungsnetzgefüge in den Modellökosystemen nach Severin 2000, vereinfacht. Durchgezogene Pfeile bedeuten Top Down, gestrichelte Bottom Up Steuerung.	146

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konzentrationen von 17 α -EE in Ausläufen von Kläranlagen. Verändert nach Ying et al. 2002. Es wurden die gemessenen Konzentrationsbereiche aufgelistet. Der jeweilige Medianwert ist in Klammer angegeben. LOD = Limit of detection.	23
Tabelle 2: Toxizitätsdaten für 17 α -EE aus verschiedenen Studien	25
Tabelle 3: Errechnete Schläuchlängen für den Einsatz in den Mikrokosmen im Versuch mit 17 α -EE.....	41
Tabelle 4: LDPE-Schläuche zur Controlled release-Dosierung von Trenbolon in aquatischen 230 l-Mikrokosmen.	42
Tabelle 5: Zusätzlich am 11.07.00 in die belasteten Mikrokosmen eingebrachte Schläuche im Versuch mit Ethinylestradiol 2000.	44
Tabelle 6: Bestandteile bzw. Konzentrationen des Calibration Standards und Nachweisgrenze von Katecholaminen in Plasma von Recipe und Chromsystems	59
Tabelle 7: Verwendete Geräte, Typbezeichnung und Firmensitz	61
Tabelle 8: Funktionelle Parameter des Ammersee bei Schondorf, gemessen am 12.09.01.....	76
Tabelle 9: Nährstoffsituation des Ammersees, gemessen am 12.09.01 an einer meso-oligotrophen Litoralstelle.....	76
Tabelle 10: Species scores für die einzelnen Taxa im Versuch mit Ethinylestradiol.	87
Tabelle 11: Species scores für die einzelnen Taxa im Versuch mit Ethinylestradiol.	89
Tabelle 12: Species Scores für das Zooplankton im Versuch mit Trenbolon, eingeteilt in drei Gruppen (Cladocera, Copepoda, Rotatoria).	112
Tabelle 13: Species Scores der einzelnen Zooplankton- Taxa im Versuch mit Trenbolon.	115
Tabelle 14: Detektierbarkeit von Katecholaminen in verschiedenen Organismen und Geweben. Methoden der Probenaufarbeitung: Chloroformextraktion (CE), Plasmakit von Recipe (PK), Kombination Chloroformextraktion und Plasmakit (CE/PK).	125
Tabelle 15: Gemessene Katecholaminkonzentrationen in <i>D. rerio</i> bei Anwendung verschiedener Fangmethoden.	127

1. Einleitung

1.1. Gefährdung der Umwelt durch Xenobiotika

Seit einigen Jahren ist das Auftreten von Xenobiotika in der Umwelt und Wirkungen auf Organismen Gegenstand zahlreicher Studien. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei den sogenannten endokrinen Disruptoren geschenkt.

Definitionsgemäß sind endokrine Disruptoren von außen zugeführte Stoffe, die die hormonellen Funktionen in einem Organismus verändern und zu schädlichen Effekten auf der Ebene des Organismus, seiner Nachkommen und/oder Populationen führen (EPA 1997).

Koordinierung und Kontrolle der Körperfunktionen erfolgt zum einen durch das nervöse System, das mit Hilfe von elektrischen Impulsen entlang der Nervenbahnen Signale weitergibt und zum anderen durch das endokrine System, in dem Informationen durch chemische Botenstoffe, sog. Hormone, weitergegeben werden. Das endokrine System beeinflusst alle wichtigen Funktionen eines Organismus, wie sexuelle Differenzierung und Reifung, Reproduktion, Wachstum, Metabolismus, Verdauung, kardiovaskuläre Funktionen und Exkretion (WITORSCH 2002).

Endokrine Disruptoren sind meist estrogenen Natur (Xenoestrogene), kommen in verschiedenen Verbindungsklassen (u.a. Pestizide, Industriechemikalien, Schwermetalle, synthetische Hormone) vor und wirken aufgrund ihrer Molekülstruktur (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Effekte wurden bei Säugetieren (z.B. Reproduktionsstörungen beim Menschen, CARLSEN 1992), Reptilien (z.B. Alligatoren, VONIER et al. 1996), Amphibien (z.B. Tigersalamander, CLARK et al. 1997), Fischen (z.B. Regenbogenforellen, JOBLING et al. 1995) und einigen Wirbellosen (z.B. Wasserschnecken, MATTHIESSEN & GIBBS 1997) nachgewiesen. Aufgrund der Vielzahl der inzwischen als endokrin wirksam eingestuft Substanzen ist eine Aufzählung kaum möglich. Eine Zusammenfassung zahlreicher Beispiele, vor allem aus Studien, die Anstoß zu weiterer Forschung gaben, sind in Colburn et al. (1996) zu finden. Anzumerken bleibt noch, dass aus bisher durchgeführten Studien die meisten Beispiele für endokrine Disruptoren Abnormalitäten in der Reproduktion beschrieben (WITORSCH 2002).

Um die Wirkung von Substanzen auf Organismen und Umwelt zu testen, sind verschiedene Ansätze möglich. Mit Single-Species-Tests, die unter konstanten und standardisierten Bedingungen im Labor durchgeführt werden können, werden Effekte auf einzelne ausgewählte Arten gezeigt. Dosis- und zeitabhängige Beziehungen zwischen applizierter Substanz und einzelnen Individuen oder Arten können erkannt und Grenzwerte für Effekte bestimmt werden. Eine Übertragbarkeit auf natürliche Systeme ist allerdings nur bedingt möglich. Mit Hilfe von Mikrokosmen-, und Mesokosmen können aufgrund ihrer, den natürlichen Systemen ähnlichen Heterogenität und der wechselnden biotischen und abiotischen Parameter, welche das Umweltverhalten, Transport und Bioverfügbarkeit, von Chemikalien mit beeinflussen, Effekte auf einzelne Organismen und die Auswirkung direkter Einflüsse auf das gesamte Ökosystem über verschiedene Organisationsebenen hinweg beschrieben werden, wie dies in Single Species Tests nicht möglich ist. Andererseits treten in Single Species Tests gefundene Effekte eventuell in natürlichen oder naturnahen Ökosystemen durch mögliche Modifikationen der Chemikalie und/oder Adaptionprozesse der Organismen und Gesellschaften an einen Stressor nur in abgeschwächter Form auf.

Im Rahmen des Querschnittthemas Ökotoxikologie wurden in der Mikrokosmenanlage der GSF seit 1998 Versuche mit endokrin wirksamen Substanzen durchgeführt, um unter Berücksichtigung inter- und intraspezifischer Wechselwirkungen der Organismen und der Betrachtung verschiedener trophischer Ebenen deren Wirkung auf aquatische Modellökosysteme zu testen. In den in dieser Studie ausgewerteten Versuchen aus den Jahren 2000 und 2001 wurden 17 α -Ethinylestradiol und Trenbolon appliziert.

1.2. Testsubstanzen der Mikrokosmenversuche 2000 und 2001

1.2.1. Ethinylestradiol

17 α -EE ist ein synthetisches Hormon, das als Bestandteil oraler Kontrazeptiva (30 – 50 μg /Pille) Verwendung findet. Bei einer täglichen geschätzten Sekretionsrate von 35 $\mu\text{g}/\text{d}$ *Frau (JOHNSON et al. 2000) lässt sich ein jährlicher Eintrag in Gewässer in Deutschland von 40 – 70 kg 17 α -EE errechnen.

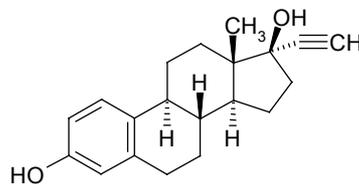


Abbildung 1: Strukturformel des synthetischen Hormons 17 α -Ethinylestradiol

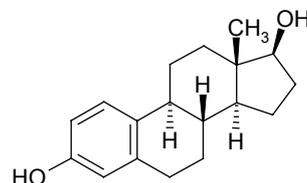


Abbildung 2: Strukturformel des natürlich vorkommenden Geschlechtshormon 17 β -Estradiol

Von der Struktur her ähnelt 17 α -EE dem weiblichen Geschlechtshormon 17 β -Estradiol (Abb. 1 und 2). 17 α -EE wird nach oraler Aufnahme nahezu ohne Metabolisierung ausgeschieden und gelangt über Kläranlagen wieder zurück in den Wasserkreislauf, wobei es sich als persistent in Wasser und Sedimenten erwiesen hat (OEHLMANN et al. 1996). Ternes et al. (1999a) untersuchten Eliminationsraten verschiedener Estrogene in Kläranlagen in Deutschland durch Vergleich der Konzentrationen in Zu- und Abflüssen. Während Estrogen (16 α -Hxdroxyestron) und 17 β -Estradiol zu 68%, bzw. 64% eliminiert wurden, konnten für Estron und 17 α -EE keine nennenswerte Reduktion während der Verweildauer in den Kläranlagen festgestellt werden. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass im Vergleich

zum natürlichen Geschlechtshormon 17β -Estradiol sowohl die biologische Mineralisierung von 17α -EE in Kläranlagen 25 bis 75 fach langsamer vonstatten geht (LAYTON et al. 2000), als auch die Biodegradation in Flüssen in geringerem Ausmaß erfolgt (JÜRGENS et al. 2002). Stumpf et al. (1996) konnten in Kläranlagenausflüssen mittlere 17α -EE Konzentrationen von 17 ng/l messen (Maximum: 62 ng/l), Desbrow et al. (1998) detektierten 17α -EE in einigen englischen Kläranlagenausflüssen in Konzentrationsbereichen zwischen 0,2 und 7,0 ng/l. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse weiterer Studien bezüglich 17α -EE Konzentrationen in Kläranlagenausflüssen dargestellt.

Tabelle 1: Konzentrationen von 17α -EE in Ausläufen von Kläranlagen. Verändert nach Ying et al. 2002. Es wurden die gemessenen Konzentrationsbereiche aufgelistet. Der jeweilige Medianwert ist in Klammer angegeben. LOD = Limit of detection.

Ort	Probenahmedatum	[17α -EE] in ng/l	Referenz
Italien	10/99 – 03/00	<LOD – 1,7 (0,45)	Baronti et al. 2000
Niederlande	10/97, 12/97	<0,2 – 7,5 (<LOD)	Belfroid et al. 1999
Deutschland	11/97	<LOD – 15 (1)	Ternes et al. 1999a
Kanada	11/97	<LOD – 42 (9)	Ternes et al. 1999a
England	05/95 – 01/96	<LOD – 7 (<LOD)	Desbrow et al. 1998
USA	05/97, 10/97	<LOD – 0,759 (0,248)	Snyder et al. 1999
Deutschland	06 – 10/00	<0,10 – 8,9 (0,7)	Kuch und Ballschmiter 2001

In Fließgewässern wurden Werte von weniger als 0,2 ng/l (KALBFUS 1995) und 1 bis 4 ng/l (STUMPF et al. 1996) nachgewiesen. Kuch und Ballschmiter (2001) fanden in deutschen Flüssen 17α -EE Konzentrationen zwischen 0,1 und 5,1 ng/l. In ähnlichen Bereichen liegen auch Messungen aus Italien (Tiber: 0,04 ng/l, BARONTI et al. 2000) und den Niederlanden (<0,1 – 4,3 ng/l, BELFROID et al. 1999). Unter Berücksichtigung von Daten wie Verkaufszahlen und Aufnahmemenge oraler Kontrazeptiva und Präparaten aus der Hormontherapie und jährliche Ausscheidungsraten der aktiven Substanzen, lassen sich 17α -EE Gehalte in Gewässern abschätzen. So berechneten

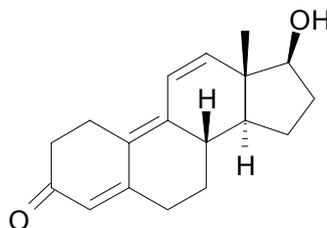
Schweinfurth et al. (1996) eine „Predicted Environmental Concentration (PEC)“ für 17 α -EE basierend auf Daten aus Deutschland von 0,5 ng/l. Arcand-hoy et al. (1998) errechneten für die USA einen EIC-Wert (EIC: Expected Introductory Concentration) für 17 α -EE von 2,16 ng/l. Purdom et al. (1994) stuften 17 α -EE als endokrinen Disruptor mit einem hohen Potential ein. Demnach können bereits geringe Estradiol und Ethinylestradiol Konzentrationen im Wasser zu Veränderungen im endokrinen System von Organismen führen. In Tabelle 2 sind einige Toxizitätsdaten verschiedener Spezies zu 17 α -EE zusammengefasst. Aufgrund der geringen Polarität der Estrogene (log K_{OW} meist zwischen 3 und 6) sind zudem Sorptions- und Akkumulationsprozesse im Sediment wahrscheinlich (PETROVIC 2001). Auch Ying et al. (2002) erwarten aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Estrogene (log K_{OW} für 17 α -EE: 4,15) eine Anreicherung in Boden und Sediment. Lai et al. (2000) wiesen in Laborstudien nach, dass Sedimente als Reservoirs für Estrogene und Progestogene dienen und diese auch wieder bioverfügbar werden können. In untersuchten Flusssedimenten (PETROVIC et al. 2001) wurden 17 α -EE-Konzentrationen von 22,82 ng/g gefunden, wobei saisonale Abweichungen auftraten.

Tabelle 2: Toxizitätsdaten für 17 α -EE aus verschiedenen Studien

Organismus	Testkonzept	Ermittelter Wert	Referenz
Fische	LOEC	10 – 20 $\mu\text{g/l}$	Larsson et al. 1999
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Vitellogenin	> 2 ng/l	Jobling und Sumpter 1993
<i>Daphnia sp.</i>	EC50 (Immobilisation)	5700 $\mu\text{g/l}$	Kopf 1997
<i>Daphnia sp.</i>	21 d (Reproduktion)	100 bzw. 1000 $\mu\text{g/l}$	Jaser et al. 2003
<i>Ceriodaphnia retic.</i>	EC 50 (24 h)	1814 $\mu\text{g/l}$	Jaser et al. 2003
<i>Sida crystallina</i>	EC 50 (24 h)	> 2300 $\mu\text{g/l}$	Jaser et al. 2003
<i>Scenedesmus sub.</i>	EC 50 (Wachstumshemmung)	840 $\mu\text{g/l}$	Kopf 1997
<i>Brachionus calyciflorus</i>	(Reproduktion) EC 50 (72 h)	201 $\mu\text{g/l}$	Radix et al. 2002
Hefetest		2,20 $\mu\text{g/l}$	Rehmann et al. 1999
Leuchtbakterien	(Abnahme der Biolumineszenz)	212000 $\mu\text{g/l}$	Kopf 1997

1.2.2. Trenbolon

Trenbolon (Abb. 3) ist ein synthetisches Steroid mit starken anabolen Eigenschaften. Es besitzt eine 8- bis 10-fach höhere hormonelle Wirksamkeit als das natürlich vorkommende Steroid Testosteron.

**Abbildung 3:** Strukturformel des synthetischen Steroids Trenbolon.

Trenbolon wird seit ca. 30 Jahren neben 17β -Estradiol, Testosteron, Progesteron, Zeranol und Melengestrolacetat in den USA und Kanada als Wachstumsförderer für Kälber, Rinder und seltener für Schafe in der Nutztiermast in Form von Ohrimplantaten eingesetzt; in der EU und der Schweiz ist die Verwendung von Trenbolon für Mastzwecke verboten. Trenbolonacetat wird schnell im Körper von Kälbern und Rindern durch Hydrolyse in 17β -Trenbolon umgewandelt und kann dann vor allem in der Leber und im Muskelgewebe nachgewiesen werden. 17β -Trenbolon agiert mit Androgen-, Progestin- und Glukokorticoide Rezeptoren (MEYER und RAPP 1985) und wirkt aufgrund seiner antiandrogenen und antiglukokorticoide Aktivität als starkes Anabolikum (DANHAIVE und ROUSSEAU 1986). Nach Metabolisierung des 17β -Trenbolon in das weniger aktive 17α -Trenbolon in der Leber, findet die Ausscheidung über Urin statt (DAXENBERGER et al. 2000). Der Verbleib nach der Ausscheidung durch das Tier ist noch weitgehend unbekannt. Schiffer et al. (2001) wiesen Trenbolon-Konzentrationen von 1700 pg/g (Halbwertszeit: 267 Tage), bzw. bis zu 75 ng/g in Gülle und Mist von Rindern, die mit Trenbolonacetat behandelt worden waren, nach. Im Ackerboden von Maisfeldern, die mit Gülle und Dung aus dem Versuch nach mehrmonatiger Lagerung gedüngt worden waren, ließ sich Trenbolon noch bis zu 8 Wochen nach der Düngung nachweisen (SCHIFFER et al 2001). Ein Eintrag in aquatische Systeme ist demnach zu erwarten. In mehreren Studien wurde bereits nachgewiesen, dass estrogene Steroide aus tierischen Ausscheidungsprodukten, welche als Dünger auf Ackerflächen ausgebracht werden, durch Abschwemmung und Versickerung in Oberflächen- und Grundwasser gelangen können (BUSHEE et al. 1998; NICHOLS et al. 1997, 1998; PETERSON et al. 2001; SHORE et al. 1995a).

Obwohl die Umwandlung von Trenbolonacetat im menschlichen Körper derzeit noch weitgehend unbekannt ist und eine Risikoabschätzung bezüglich der Tumoranfälligkeit nicht möglich ist, da für den Menschen noch keinerlei Daten existieren, versichert die amerikanische FDA (Food and Drug Administration), dass bei richtiger Handhabung der Wachstumspräparate in der Mastzucht für den Verbraucher kein Risiko besteht. Es wurden jedoch Toleranzwerte für TBA in Geweben der Masttiere festgelegt (Muskel: 50 mg/kg, Leber: 100 mg/kg, Niere: 150 mg/kg, Fett: 200 mg/kg). Für die tägliche Aufnahme von Menschen wurde ein Höchstwert von 0,7 mg/ Person a 70 kg empfohlen. In der EU ist die Verwendung von natürlichen und synthetischen Hormonen zur Wachstumsförderung untersagt,

lediglich therapeutische Anwendung ist erlaubt. 1995 wurde von der Kommission des Codex Alimentarius, eine gemeinsame Kommission der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation (FAO) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) der Vereinten Nationen, Rückstandsgrenzwerte für Trenbolonacetat (Rinder: Muskelfleisch: 2 µg/kg; Leber: 10 µg/kg) und Zeranol (Rinder: Muskelfleisch: 2 µg/kg; Leber: 10 µg/kg) festgelegt (Codex Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods, aus FAO Statistical Databases, (apps.fao.org/default.htm)).

Aufgrund seiner anabolen Eigenschaft findet Trenbolon ebenfalls breite Anwendung im Kraftsport-Bereich, jedoch wird in reglementierten Wettkampfsport Trenbolon als unerlaubtes Dopingmittel von verschiedenen Sportverbänden und -instanzen eingestuft, wie z.B. der World- Anti-Doping-Agency (Wada) (WADA 2001).

1.3. Prinzip der Funktionsweise des endokrinen Systems

Spezielle Drüsen produzieren und sezernieren Hormone in den Körper. Der regulatorische Effekt dieser Hormone erfolgt bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen an verschiedenen Stellen. Dabei können verschiedene Moleküle als Hormone agieren: z.B. Steroide, Terpenoide oder Peptide. Typischerweise wird die kaskadenartige Funktion des endokrinen Systems durch umweltspezifische oder physiologische Signale ausgelöst und endet mit der Aktion eines terminalen Hormons am Zielorgan. Die Wirkung eines Hormons kann jedoch erst durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor möglich werden. Dabei können diese entweder an der Zelloberfläche lokalisiert sein, wobei nach Bindung an den Rezeptor eine Reihe intrazellulärer Reaktionen ausgelöst werden, welche einen Signal Transduktionsweg schaffen, der schließlich in der Regulation der Transkription spezifischer Gene resultiert. Alternativ bindet das Hormon intrazellulär an seinen Rezeptor, woraufhin dieser Komplex mit der DNA interagiert und so die Transkription entsprechender Gene reguliert (DEFUR et al. 1999).

Der Verdacht auf Störung des endokrinen Systems durch Chemikalien geht auf Beobachtungen zurück, wonach einige Chemikalien die Fähigkeit besitzen an Hormonrezeptoren zu binden und die Aktivitäten dieser Rezeptoren zu modulieren (MCLACHLAN 1993; KELCE et al. 1995).

Generell können endokrine Disruptoren als Agonisten agieren, d.h. entsprechende Rezeptoren werden von Xenobiotika besetzt, die dann wie das Hormon funktionieren. Die Bindung des Xenobiotikums an den Rezeptor resultiert also in der Regulation der Transkription entsprechender Gene. Ebenso ist eine Wirkung als Antagonist möglich. Durch Bindung einer Chemikalie an einen Hormonrezeptor wird dessen Aktivierung nicht stimuliert. Das Xenobiotikum hemmt den Rezeptor kompetitiv. Außerdem können Chemikalien als endokrine Disruptoren fungieren, ohne dass sie an Rezeptoren binden, indem sie die Hormonlevel beeinflussen, z.B. durch Hemmung der Hormon-Synthese (RAJFER et al. 1986).

1.4. Funktion der Katecholamine

Cannon (1914) fand heraus, dass es einen Mechanismus des Organismus gibt, der den Körper in Not- oder Überraschungssituationen auf Kampf oder Flucht vorbereitet und Energie bereitstellt, um blitzschnell zu reagieren. Heute weiß man, dass solche sogenannten Kampf-oder-Flucht-Reaktionen (fight-or-flight-response) durch zwei Vertreter der Katecholamine ausgelöst werden: Noradrenalin (NA) (Abb. 4) und Adrenalin (A) (Abb. 5).

Selye (1950) führt den Begriff „Stress“ in Anlehnung an den Stress-Begriff in der Physik ein. Stress im physikalischen Sinn ist die Kraft, welche auf eine Struktur ausgeübt wird, die - wenn sie über eine bestimmte Intensität hinaus gesteigert wird - zur zeitweisen oder permanenten Verformung der Struktur führt" (UEXKÜLL, 1979).

Übertragen auf den Menschen definiert Selye Stress als eine komplexe Reaktion des menschlichen Organismus auf unspezifische Einwirkungen der Umgebung. Dabei werden drei Phasen unterschieden:

1. Die Phase der Alarmreaktion (auch: Schockstadium): schwere Stress auslösende Faktoren können hier in Stunden oder Tagen zum Tode führen.
2. Die Anpassungs- oder Widerstandsphase: Verschwinden der anfänglichen Symptome. Anpassung des Organismus an die veränderte Umgebung und Entwicklung einer erhöhten Widerstandskraft. Bleibt jedoch die Einwirkung der Stress auslösenden Faktoren, oder erhöht sich sogar noch, führt das schliesslich zu 3.:

3. Phase der Erschöpfung: die Anpassungsreserven des Körpers sind verbraucht und es treten sogenannte Anpassungs-Krankheiten auf (z.B. erhöhter Blutdruck, Magengeschwüre, Rheumatismus, Asthma, allergische Reaktionen, Herz- und Nierenleiden). Nach Selye werden diese Krankheiten durch unzulängliche Anpassungsversuche des Körpers verursacht oder verschlimmert.

Stress wird in der Humanmedizin nicht nur als Folge physischer Schädigung oder psychologischer Spannung oder sozialer Belastung verstanden, sondern als Begleitumstand jeder Handlung. Nach Uexküll ist „ein bestimmtes Ausmaß von Stimulation und Reaktion sogar lebensnotwendig. Zu wenig oder zu viel sind gleichermaßen schädlich“ (UEXKÜLL, 1979).

Im Tierreich werden als Reaktion auf positiven oder negativen Stress Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin ausgeschüttet (CAMPBELL, 1997), welche sowohl als Hormone als auch als Transmitter im Sympatikusanteil des vegetativen Nervensystems wirken. Allgemein formuliert wird ein Lebewesen psychisch und organisch durch Ausschüttung von NA und A auf akute Bedrohungssituationen eingestellt. Während Noradrenalin für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks verantwortlich ist, reguliert Adrenalin neben der Stoffwechselrate auch die Herztätigkeit. Ausserdem versetzt die Ausschüttung in den Blutkreislauf dem Körper einen plötzlichen Energiestoß. Energiequellen können schlagartig genutzt werden, da Glykogen und Fett (die Speicherform der Kohlenhydrate) vermehrt abgebaut werden (CAMPBELL, 1997; ECKERT, 2000). Das überwiegend in der Gehirnregion vorkommende Dopamin (Hydroxytyramin) (Abb. 6) zählt ebenfalls zu den Katecholaminen und steuert als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem emotionale und geistige Reaktionen. Durch Mangel bzw. Überschuss kommt es zu Krankheitsbilder wie Parkinson`sche Krankheit (SOYKA, 1991), bzw. Schizophrenie (COMER, 1995). Eine Verminderung der Dopamin-Ausschüttung beziehungsweise eine verstärkte Wiederaufnahme des Botenstoffs an den dopaminergen Präsynapsen sind verantwortlich für das Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom (ADS). Durch medikamentöse Behandlung kann diese Fehlsteuerung reguliert werden (HÜTHER und BONNEY, 2002).

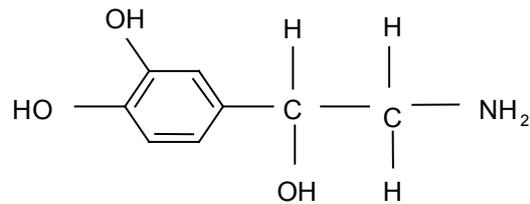


Abbildung 4: Strukturformel des Katecholamins Noradrenalin

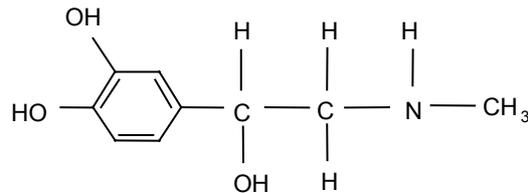


Abbildung 5: Strukturformel des natürlichen Botenstoffs Adrenalin

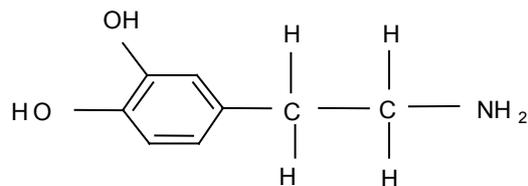


Abbildung 6: Strukturformel des Neurotransmitters Dopamin (Hydroxytyramin)

Die Bildung der Katecholamine erfolgt aus der Aminosäure Tyrosin. Im Gehirn, den sympathischen Nervenendigungen oder in den Zellen des Nebennierenmarks (80% Adrenalin, 20% Noradrenalin) werden über Zwischenstufen Dopa, Dopamin und dann Noradrenalin gebildet, aus welchem dann Adrenalin gebildet wird.

Im humanmedizinischen Bereich wird die Quantifizierung der Katecholamine zur Diagnostik verschiedener Krankheitsbilder genutzt, unter anderem zur Tumorerkennung. Tumore bilden vermehrt Katecholamine und geben diese in die Blutlaufbahn ab. Nach der Metabolisierung im Körper zu Vanillinmandelsäure werden sie aus dem Körper ausgeschieden. In Urin und Plasma können Katecholamine mit speziellen Plasmakits detektiert und dadurch Tumore lokalisiert werden (GRETEN, 2001; RENZ-POLSTER und BRAUN, 2000).

Katecholamine spielen in vielen Organismen eine zentrale Rolle. Smith konnte in 44 Pflanzen Katecholamine nachweisen (SMITH, 1977). So besitzt Portulak (*Portulaca oleracea* L.) einen sehr hohen Anteil an Noradrenalin. Es induziert das Blühen in

Lemna paucicostata (YAMAGUCHI et al., 2001). Die Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) weist verschieden hohe Konzentrationen von Noradrenalin und Dopamin in der Knolle und den Blättern auf. Durch mechanische Verletzung der Blätter steigt der Gehalt der beiden Katecholamine an (SMITH, 1977). Untersuchungen über die Wirkungsweise der Katecholamine wurden auch bei den Insekten vorgenommen, wo sie für die Sklerotisierung der obersten Hautschichten verantwortlich sind (HOPKINS, 1995). Bei den Gastropoden steuern sie die Bewegung, die Nahrungsaufnahme und das Wachstum (WALKER, R.J., 1986). Genauere Ergebnisse legten Voronezhskaya et al. (1999) in der Studie über die Wasserschnecke *Lymnaea stagnalis* vor. In der embryonalen Phase wird vermehrt Dopamin gemessen, dessen Konzentration sich kurz vor dem Schlüpfen um mehr als das Doppelte erhöht.

Stefano et al. (1977) wiesen den Einfluss von Stress auf Katecholamine bei der Miesmuschel *Mytilus edulis* und Lacoste et al. (2001) bei der Auster *Crassostrea gigas* nach. Plötzliche Veränderungen von Temperatur oder Salzgehalt und mechanischer Stress führen zu einer Erhöhung der Konzentrationen an Noradrenalin und Dopamin. Als weiterer Stressfaktor im Wasser wären auch Chemikalien denkbar, welche Veränderungen der Katecholaminsituation in Organismen bewirken können.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

1.5.1. Mikrokosmenversuche

In der Mikrokosmenanlage der GSF sollte als Fortführung bereits durchgeführter Versuche Effekte auf Zooplanktonorganismen, die in dem Estrogen wirksamen Inhaltsstoff in Kontrazeptiva 17α -EE, als Positiv-Kontrolle zu dem 1998 getesteten Nonylphenol, untersucht werden. Basierend auf Literaturdaten und Single Species Tests zur schädigenden Wirkung von 17α -EE auf Reproduktion und Entwicklung speziell zooplanktischer Organismen, wurden in der vorliegenden Studie Effekte auf Populationsebene betrachtet und deren Bedeutung für eine Art bei gleichzeitigem Auftreten von inter- und intraspezifischen Beziehungen in den aquatischen Modellökosystemen.

Um Aussagen zu wirkartverschiedenen Substanzen treffen zu können, wurde 2001 in einem Versuch mit Trenbolon eine androgen wirkende Substanz getestet.

1.5.2. Katecholaminanalytik

Zur Einschätzung des Gefährdungspotentials einer Substanz für Organismen, ist die Effektforschung auf verschiedenen Ebenen notwendig. Neben Untersuchungen der Wirkung auf Populationen und Individuen, die meist nur den Einfluss einer Substanz auf das Reproduktionsvermögen oder die Entwicklung zeigen, ist es auch notwendig möglichst genaue Wirkungswege im Einzelorganismus zu kennen.

Stressforschung in Säugetieren, vor allem an Menschen, und die Untersuchung der Auswirkungen verschiedener Stressoren auf physische und psychische Beschaffenheit des Organismus werden seit langem betrieben. Dass Stress durch mannigfaltige Umweltgegebenheiten, unter anderem durch Chemikalienbelastung, ausgelöst werden kann, ist hinreichend bekannt. Die Erfassung stressinduzierter Reaktionen wie die Veränderung des Katecholaminspiegels, kann somit ein wertvolles Hilfsmittel bei der Risikoeinschätzung und Beurteilung potentiell endokriner Substanzen sein.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es demzufolge, Versuche zu Detektion von Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin in diversen aquatischen Vertebraten und Invertebraten durchzuführen, um so die Definition weiterer Endpunkte in der Risikoabschätzung von Xenobiotika zu ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Mikrokosmenversuche

2.1.1. Ethinylestradiol

17 α -Ethinylestradiol, Sigma-Aldrich

Freiname für 17 α -Ethinylestra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol

C₂₀H₂₄O₂

Molekulargewicht: 296,41 g/mol

2.1.2. Trenbolon

17-beta-Trenbolon, Sigma-Aldrich

Freiname für: 17-beta-Hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one

CAS Registry Number: 10161-33-8

Beilstein Reference No.5756203

Last Updated199612

C₁₈H₂₂O₂

Molekulargewicht: 270.40 g/mol

Synonyme / Handelsnamen:

Estra-4,9,11-trien-3-one, 17-hydroxy-, (17-beta)-

Trenbolon

RU 2341

Trienbolon

2.1.3. Mikrokosmenanlage

Design der Gesamtanlage und der einzelnen Mikrokosmen

Als Modellökosysteme (Mikrokosmen) dienten Edelstahlzylinder mit einem Durchmesser von 80 cm und einer Höhe von 60 cm (Abb. 7). Die Zylinder waren an ihrer Unterseite abgeschlossen. Das Fassungsvermögen jedes einzelnen Zylinders betrug ca. 250 l. Während der Versuche wurden die Wände der Mikrokosmen durch einen Streifen Maschendraht um weitere ca. 20 cm erhöht, um zu verhindern, dass größere Tiere wie z.B. im Teich ansässige Amphibien oder auch Insekten in die Systeme gelangen konnten. Weiterhin wurde jeder einzelne Mikrokosmos mit einem Kunststoffnetz mit einer Maschenweite von 1 mm während der Versuchsphase abgedeckt, um einerseits jeglichen Eintrag von außen und andererseits die etwaige Verschleppung der Testsubstanzen aus den belasteten Mikrokosmen in Kontrollen durch z.B. Fluginsekten zu verhindern.

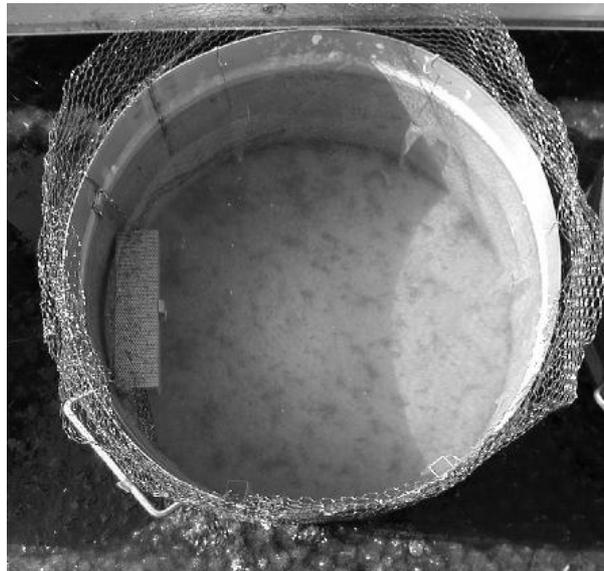


Abbildung 7: Einzelner mit Sediment und Wasser eingerichteter Mikrokosmos mit Dosiereinrichtung.



Abbildung 8: Mikrokosmenanlage der GSF, Standort Neuherberg, mit automatisch schließendem Dach und künstlich angelegtem Teich und den darin installierten Mikrokosmen während der Einrichtung.

16 Mikrokosmen wurden in einem künstlich angelegten Teich (Länge: 9 m, Breite: 6 m, Tiefe: 1,2 m) innerhalb des Geländes des GSF-Forschungszentrums in Neuherberg, nahe München, aufgestellt, um starke Temperaturschwankungen in den Systemen zu vermeiden (Abb. 8). Außerdem konnte durch ein bewegliches Dach die gesamte Versuchsanlage bei Bedarf geschlossen werden, um so z.B. ein Überlaufen der Systeme bei starken Regenfällen zu verhindern. Sowohl im Versuch mit Ethinylestradiol 2000 als auch mit Trenbolon 2001 wurden insgesamt jeweils 12 Edelstahlzylinder beprobt. Kontrollen und belastete Mikrokosmen wurden in alternierender Reihenfolge aufgestellt, die Reihenfolge der belasteten Mikrokosmen untereinander wurde nach dem Zufallsprinzip per Los ausgewählt. Die Kontrollmikrokosmen wurden mit K1 bis K6 bezeichnet, die belasteten mit den Buchstaben A bis F.

Installation der Modellökosysteme

Um biologische Strukturen natürlicher aquatischer Systeme soweit als möglich auf die Mikrokosmen übertragen zu können, wurden Sediment und Wasser an einer von Melzer et al. (1988) als oligo-mesotroph eingestuften Uferregion des Ammersees bei Schondorf entnommen. Eine Liste der bei der Einrichtung verwendeten Geräte findet sich im Anhang.

Ammersee

Mit einer Länge von 16 km und einer Breite von 6 km (43,8 km Uferlänge) bedeckt der Ammersee mit seinem Wasser eine Fläche von 47-Quadratkilometern (Volumen: 1,75 Mrd. m³ Wasser, Wassererneuerungszeit: 2,7 Jahre) in Süddeutschland. Seine größte Tiefe beträgt 81 m, im Mittel 37 m. Der Ammersee, der heute als naturnaher See gilt, ist der drittgrößte See Bayerns und liegt etwa 30 km nördlich der Alpen und 40 km südwestlich von München (<http://www.umweltministerium.bayern.de/>).

Seit 1976 zählen der gesamte See und die im Norden und Süden sich anschließenden Naturschutzgebiete "Ampermoos" (seit 1982) und "Vogelfreistätte Ammersee-Südufer" (seit 1979) zum sogenannten Ramsar-Gebiet. 1971 wurde zum Schutz von Feuchtgebieten das **"Übereinkommen über Feuchtgebiete, insbesondere als Lebensraum für Wasser- und Watvögel, von internationaler Bedeutung"** in der iranischen Stadt Ramsar beschlossen (<http://www.ramsar.org/>). Dieses Übereinkommen ist ein zwischenstaatlicher Vertrag, der die Rahmenbedingungen für die internationale Zusammenarbeit zum Schutz von Feuchtgebietslebensräumen festlegt. Ursprünglich war die Ramsar-Konvention auf den Schutz der ziehenden Wasser- und Watvögel ausgerichtet. Aufgrund der Ergebnisse nachfolgender Konferenzen der Vertragsparteien, liegen nun die Ziele des Ramsar-Übereinkommens im generellen Schutz wichtiger und seltener Feuchtgebiete. Vor allem dem Verlust und der fortschreitenden Beeinträchtigung von Feuchtgebieten soll Einhalt geboten werden. In Bayern liegen 7 solch international bedeutsame Feuchtgebiete, unter anderem das Gebiet Ammersee.

Der Ammersee gehört neben Starnberger See, Wörthsee, Pilsensee und Weißlinger See zum Gebiet der Fünfseenlandschaft. Durch einen noch andauernden Verlandungsprozess, der den See innerhalb der letzten 20.000 Jahre um das

Vierfache hat schrumpfen lassen, verfügt die Landschaft um das Gewässer über eine reichhaltige, teilweise vom Aussterben bedrohte Vogelvielfalt.

Schondorf ist ein anerkannter Luftkurort und liegt am Westufer des Ammersees. Schondorf gehört zum Landkreis Landsberg am Lech des Regierungsbezirks Oberbayern. Der Ort Schondorf befindet sich über 538 m NN und umfasst eine Fläche von 6,56 km². In Schondorf sind derzeit 3665 Einwohner mit ca. 1434 selbstständigen Haushalten. Der Anteil der landwirtschaftlichen Bevölkerung ist auf unter 8 % gesunken, während das produzierende Gewerbe auf 42 % und der Bereich der Dienstleistungsbetriebe auf 52 % gestiegen ist. Die Zahl der Wohnungen stieg von 655 auf rund 1000 in 580 Gebäuden, also meist Ein- und Zweifamilienhäuser (<http://www.schondorf.info/>)

Sedimententnahme aus dem Ammersee

Da ein Eintrag von anaerobem Sediment in die Mikrokosmen vermieden werden sollte, wurde nur die obere Schicht von ca. 20 cm im See abgeschaufelt und in Kunststoffwannen (Abb. 9) gefüllt, wobei außerdem auf Dunkelfärbung und auffallenden Fäulnisgeruch geachtet wurde. Insgesamt wurden ca. 800 l Sediment entnommen. Zusätzlich wurden ca. 100 l Wasser filtriert (Gaze, 63 µm) und in PE Kanister abgepumpt, das für die Homogenisierung des Sedimentes vor der Befüllung der einzelnen Mikrokosmen benötigt wird.



Abbildung 9: Sedimententnahme an einer oligo-mesotrophen Litoralstelle des Ammersees bei Schondorf für den Mikrokosmenversuch 2000.

Befüllung der Mikrokosmen mit Sediment

Die Befüllung der Mikrokosmen mit Sediment erfolgte noch am selben Tag wie die Entnahme am See. Das Sediment sollte möglichst homogen und in gleichen Mengen auf die einzelnen Mikrokosmen aufgeteilt werden. Zu diesem Zweck wurde das Sediment zunächst durch Metallsiebe (Maschenweite: 0,5 cm) gedrückt, um größere Steine, Pflanzenreste und sonstige feste Inhaltsstoffe zu entfernen. Dann wurde je eine Charge für mindestens 5 Minuten in einer Betonmischmaschine unter Zugabe von filtrierte Ammerseewasser gemischt und mit Hilfe von Messbechern gleichmäßig auf alle Mikrokosmen verteilt, solange bis der Endfüllstand des Sediments ca. 10 cm pro Mikrokosmos betrug.

Wasserentnahme aus dem Ammersee

Für die Wasserentnahme am Ammersee wurde eine elektrische Pumpe eingesetzt mit der in drei Entnahmeaktionen je 1000 l Wasser in einen PE Rundtank gefüllt wurden, welches wiederum durch eine 63 µm Gaze am Ende des Füllschlauches filtriert wurde (Abb. 10). Großes Phytoplankton und Zooplankton sollte so zunächst entfernt werden, da erst die fertig eingerichteten Mikrokosmen möglichst homogen angeimpft werden sollten.



Abbildung 10: Wasserentnahme am Ammersee. Befüllung des 1000 L Rundtanks. Filterung des Wassers mit 63 μm Gaze.

Befüllen der Mikrokosmen mit Wasser

Beim Einfüllen des Wassers in die Mikrokosmen sollte die bereits vorhandene Sedimentlage so wenig wie möglich aufgewirbelt werden. Die Sedimentunterlage jedes einzelnen Edelstahlzylinders wurde deswegen mit einer runden Kunststoff-Folie abgedeckt, um Aufwirbelungen möglichst minimal zu halten. Mit 10 l Kunststoffeimern wurden 200 l Wasser in jeden Mikrokosmos in mehreren Durchgängen zugegeben. Beim Abfüllen aus dem Rundtank in die Eimer wurde nochmals mit einer 63 μm Gaze filtriert. Auf die genaue Verteilung exakter Mengen pro Mikrokosmos wurde geachtet.

Animpfen der Mikrokosmen mit Zooplankton

Zooplankton wurde aus dem Ammersee mit einem handelsüblichen Planktonnetz (Maschenweite 63 μm) gefangen. Zu diesem Zweck wurde das Netz hinter einem Ruderboot hergezogen, der Fang dann über ein Analysensieb (Maschenweite 2 mm) in eine weiße Fotoschale gegeben, wo noch eventuell verbleibende „Nicht-Zooplankter“ mit einer Federstahl-Pinzette aussortiert wurden. Das Zooplankton wurde dann in ein Sammelgefäß (PE, 20 l) mit Wasser überführt und noch am selben

Tag auf die einzelnen Mikrokosmen verteilt. Hierzu wurde zunächst in einem Ballonbehälter mit Ablasshahn gemischt und dann definierte Mengen mit transparenten Messbechern in die einzelnen Mikrokosmen überführt.

Da es sich bei diesen Versuchen um Freilandexperimente handelte, wurde der zeitliche Rahmen an die natürliche Vegetationsperiode angepasst. Sowohl der Versuche mit Ethinylestradiol als auch der mit Trenbolon gliederte sich jeweils in vier Phasen (Einrichtungs-, Vorlauf-, Applikations- und Abklingphase). Insgesamt dauerte der 17 α -EE 2000 Versuch 23 Wochen) und TB 2001 20 Wochen. Nach der Einrichtung der Mikrokosmen im Frühjahr (17 α -EE: 22.04. bis 19.05.00; TB: 23.04. bis 22.05.01) wurde in einer 5 Wochen dauernden Vorlaufphase ab dem 22.05.00 (17 α -EE), bzw. 05.06.01 (TB) mit der Probenahme begonnen. Durch Einsetzen der Dosiereinrichtungen am 21.06.00 (17 α -EE), bzw. 04.07.01 (TB) in Woche 6 wurde die 6, bzw. 9 Wochen dauernde Applikationsphase gestartet. In einer sich anschließenden Abklingphase wurden die Mikrokosmen für weitere 12 (17 α -EE), bzw. 6 (TB) Wochen beobachtet (siehe Anhang Tabellen 1 und 2, Zeitlicher Ablauf der Versuche).

Dosierungsplan

Mikrokosmenversuch mit Ethinylestradiol (2000)

Den für 17 α -EE 2000 geplanten Testkonzentrationen (Tabelle 3) lagen Daten aus dem Versuchsjahr 1999 (SEVERIN 2000) sowie umweltrelevante Ethinylestradiol-Konzentrationen und Daten aus verschiedenen Single Species Tests mit Ethinylestradiol zugrunde.

Tabelle 3: Errechnete Schlauchlängen für den Einsatz in den Mikrokosmen im Versuch mit 17 α -EE.

1999			2000	
geplante Konz. (ng/l)	Schlauchlänge (cm)	erreichte mittlere Konz. (ng/l)	Konz. (ng/l)	Schlauchlänge (cm)
10	2,54	153	40	10
30	7,64	63	120	30
60	15,3	46	200	50
100	25,5	97	300	75
500	127,5	40	390	100
-	-	-	500	127

Maximal einsetzbare Gesamtschlauchlänge: 127 cm

Mikrokosmenversuch mit Trenbolon (2001)

Tabelle 4: LDPE-Schläuche zur Controlled release-Dosierung von Trenbolon in aquatischen 230 l-Mikrokosmen.

Mikrokosmos	Tag der Exposition	Dauer, Tage	Schlauchlänge, nominal, cm	Oberfläche, cm ²	Einfüllvolumen, mL	
TB 1	1 - 48	47	1	5,4	0,04	
	48 - 63	15	1	5,4		0,02
TB 2	1 - 48	47	3	16,2	0,12	
	48 - 63	15	3	16,2		0,06
TB 3	1 - 48	47	11	59,4	0,44	
	48 - 63	15	11	59,4		0,22
TB 4	1 - 48	47	36	194,4	1,44	
	48 - 63	15	36	194,4		0,72
TB 5	1 - 48	47	120 (2x 60)	648	4,8	
	48 - 63	15	120 (2x 60)	648		2,4
TB 6	1 - 48	47	240 (4x 60)	1296	9,6	
	48 - 63	15	240 (4x 60)	1296		4,8

Füllung: Dispersion von 5,7 Gew. % Trenbolon in Triolein

* Eine Ableitung von wirksamen Konzentrationen in Wasser und Sedimenten ist aufgrund der Angaben in der Tabelle unzulässig.

Trenbolon-Konzentrationen konnten bislang weder für Wasser noch für Sedimente ermittelt werden.

Dosierung der Testsubstanzen in den Mikrokosmen

Als Testsubstanz wurde 17α -Ethinylestradiol (Sigma-Aldrich), bzw. 17β -Trenbolon (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Dosierung (Controlled release) erfolgte in beiden Versuchen über LDPE-Schläuche, welche in Edelstahl-Dosiereinrichtungen (Abb. 11), die als mechanischer Schutz für die Schläuche dienten, in die Mikrokosmen eingebracht wurden.

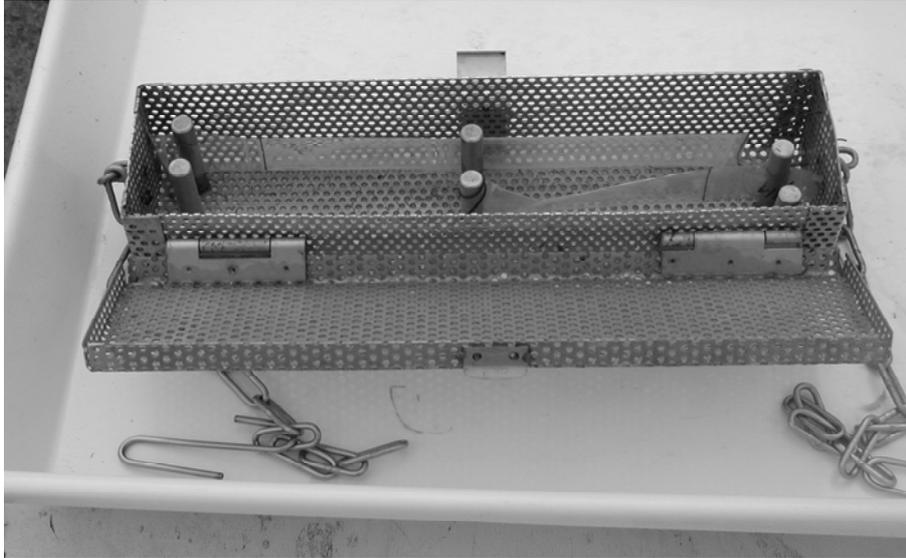


Abbildung 11: Edelstahl-Dosiereinrichtung in den Versuchen mit 17α -EE 2000 und TB 2001. Beschreibung siehe Text.

Die Befüllung der Schläuche, wurde in Anlehnung an Methoden früherer Versuche (SEVERIN 2000, SEVERIN et al. 2003) durchgeführt. Schlauchlängen und die sich daraus ergebenden Konzentrationen wurden auf der Basis von Vortests und Erkenntnissen aus dem 1999 durchgeführten Versuch mit 17α -EE (SEVERIN 2000) bestimmt. Im Versuchsjahr 2000 wurde am 11.07.00 zusätzliche Schläuche mit Ethinylestradiol/Triolein eingebracht (Tab 5). Beim Versuch mit TB 2001 wurde am 20.08.01 die bis dahin eingesetzten Schläuche durch einen komplette neuen Satz in jeden Mikrokosmos ersetzt.

Durch Anwendung der beschriebenen Controlled Release Dosiermethode sollte die kontinuierliche Freisetzung der Chemikalie ins Wasser gewährleistet werden, um einen Eintrag, wie er z.B. dem einer Kläranlage in ein Gewässer entspricht, zu simulieren.

Sowohl im Versuchsjahr mit 17α -EE, als auch mit TB, wurde ein regressiver Konzentrationsansatz mit 6 belasteten Mikrokosmen (A-F) und 6 Kontrollen (K1-K6) gewählt.

Tabelle 5: Zusätzlich am 11.07.00 in die belasteten Mikrokosmen eingebrachte Schläuche im Versuch mit Ethinylestradiol 2000.

Mikrokosmos	Anzahl Schläuche (Stck) (Länge je: 20 cm)	Eingebrachte Schlauchlänge (cm)
A	1	20
B	1	20
C	3	60
D	4	80
E	4	80
F	7	140

Wöchentliche Probenahme in den Mikrokosmen

Um Effekte von Substanzen auf Systeme zu untersuchen, ist es notwendig möglichst viele auf die Sukzession einflussnehmende Parameter zu kennen. Da einerseits kontinuierliche Online Messungen kaum durchführbar sind, andererseits jede Probenahme auch einen störenden Eingriff von außen darstellt, wurde als Abstand zwischen zwei Probenahmen ein Zeitraum von einer Woche gewählt.

Bei der wöchentlichen Beprobung der Mikrokosmen wurden Proben für die Wasser- und Sedimentanalytik erzeugt und biologische Erhebungen bezüglich des Zoo- und Phytoplanktons, Organismen des Meiobenthos (Nematoda) und des Chlorophyll-a-Gehaltes durchgeführt.

Entnahme der Zooplanktonproben

Zur Entnahme des Zooplanktons aus den Mikrokosmen diente ein zylindrisches Edelstahlrohr (Abb 12) mit einem Volumen von 0,5 l. Über ein mechanisches System konnte vom Haltegriff aus eine Klappe an der unteren Rohröffnung geschlossen werden.



Abbildung 12: Probenehmer aus Edelstahl zur Entnahme von Zooplankton aus den Mikrokosmen; Fassungsvermögen: 0,5 L.

Durch die Probenahme sollte ein möglichst repräsentatives Abbild der Artenzusammensetzung einer Mikrokosmenbiozönose erzeugt werden. Obwohl durch die Probenahme bestehende Systeme so wenig wie möglich gestört oder beeinflusst werden sollten, war dennoch ein Durchmischen durch vorsichtiges Rühren (dreimal im, dreimal gegen den Uhrzeigersinn) mit dem Probenehmer notwendig, um einerseits den Fang von Arten zu ermöglichen deren Lebensraum nahe an Pflanzen oder Sediment zu finden ist, und um andererseits sogenannte „Planktonwolken“ zu zerstreuen. Sessile Arten auf z.B. Pflanzen konnten jedoch nicht, oder nur zufällig erfasst werden.

Für jede Probenahme wurden je drei Wassersäulen zu je 0,5 l pro Mikrokosmos entnommen, in einem Edelstahlleimer gemischt und anschließend durch ein 63 µm Gaze zurück in die Mikrokosmen gefiltert. Die auf der Gaze befindlichen Zooplankter wurden mit einem starken Wasserstrahl aus einer PE Spritzflasche in 50 ml Falcon-Tubes überführt und sofort mit 2 ml 4 % iger Procainhydrochlorid Lösung betäubt, um Deformationen der Tiere, durch die die Bestimmung unter dem Mikroskop erschwert werden würde, bei der anschließend Endfixierung mit Zuckerformollösung zu vermeiden.

Für Kontrollen und belastete Mikrokosmen bestand je ein eigener Satz an Probenahmegerätschaften, um Kontaminationen zu vermeiden.

Entnahme der Phytoplanktonproben, Messung chemischer Parameter und Entnahme der Proben für die Wasseranalytik

Mithilfe des Zooplankton-Probenehmers wurden 0,5 l Wasser je Mikrokosmos entnommen. Es wurden zuerst die Kontrollen, dann die belasteten Mikrokosmen in aufsteigender Konzentrationsreihenfolge beprobt. 100 ml der Probe wurden für die Phytoplanktonauswertung in PE Schraubverschlussflaschen abgefüllt und mit ca. 1 bis 2 ml Lugol'scher Lösung (Merck, Darmstadt, 1%) fixiert. Je 20 ml der Probe wurden in Szintillationsgefäße für die Analyse der chemischen Parameter (Nährstoffe) gegeben.

Für die 17 α -EE, bzw. TB-Analytik wurde je Probenahme aus allen belasteten Mikrokosmen und in wöchentlicher alternierender Folge aus zwei Kontrollen je 1 l Wasser entnommen und in 1 l Schott-Glasflaschen überführt und sofort mit internem Standard (17 α -EE 00: β -Estradiol, TB 01: Equilenin) versehen, welcher mit einer Hamilton-Mikroliterspritze zugegeben wurde. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Sedimententnahme zur Beprobung der Meio- und Mikrofauna

Als Sedimentstechrohr diente ein 80 cm langes durchsichtiges Kunststoffrohr mit einem Innendurchmesser von 2,5 cm und einer Wandstärke von 2 mm. Das Rohr wurde an zufällig ausgewählten Stellen in den Mikrokosmosen eingestochen, oben mit einem Gummipfropfen verschlossen, sodann vorsichtig zusammen mit dem Kern entnommen, auf den Kolben gesetzt (Abb. 13) und langsam heruntergedrückt bis die Schneidevorrichtung aus Edelstahl aufgesetzt werden konnte. Überschüssiges Wasser wurde im Fall der belasteten Mikrokosmen mit einer 50 ml Glaspipette in mehreren Schritten vorsichtig abgesaugt, wobei eine Aufwirbelung des Sedimentkernes zu vermeiden war, und als Sondermüll behandelt. Je Mikrokosmos und Probenahme wurden drei Kerne entnommen. Mittels der Schneidevorrichtung wurde jeweils 1 cm der obersten Schicht der drei Kerne abgetrennt, in ein Glasschälchen gegeben und mit einem Spatel homogen vermischt. Die so erhaltene Probe wurde für meiobenthische und mikrobiologische Untersuchungen, sowie für die Sedimentanalytik aufgeteilt. Der Rest des Kernes wurde verworfen.

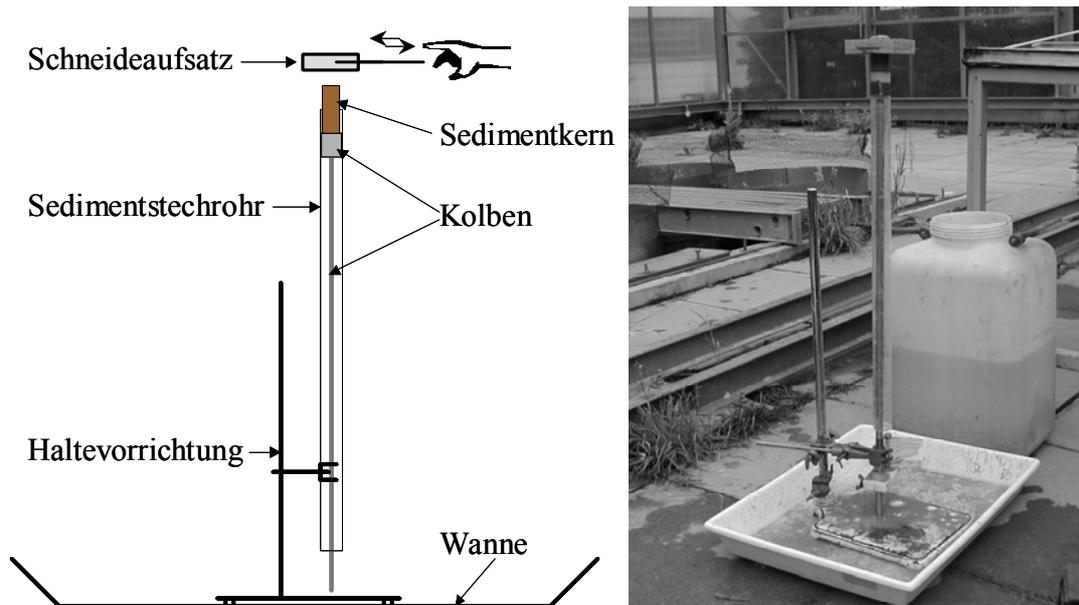


Abbildung 13: Vorrichtung zur Entnahme von Sedimentkernen aus den Mikrokosmen.

Chlorophyll-a-Messungen

17 α -Ethinylestradiol – Chl-a-Bestimmung im DF-Kinetikphotometer

Erfassung des photosynthetisch aktiven Chlorophyll-a-Gehaltes im Wasser erfolgte im Versuch mit 17 α -Ethinylestradiol mit Hilfe eines Chlorophyll-Kinetik-Photometers (Messbereich: 0,2 – 1000 $\mu\text{g/l}$ Chlorophyll-a).

Das DF-Kinetikphotometer dient der Bestimmung des photosynthetisch aktiven Chlorophyllgehalts von Wasserproben. Da die verzögerte Fluoreszenz an das Vorhandensein eines intakten Photosyntheseapparates in den Zellen gebunden ist, werden fluoreszierende Fremdstoffe und abgestorbenes Phytoplankton nicht registriert.

Um den Gehalt an Chlorophyll-a in einer Probe messen zu können, macht man sich die sogenannte verzögerte Fluoreszenz photosynthetisch aktiver Pflanzen zunutze. Bringt man belichtete Algenzellen vom Hellen ins Dunkle, so kann ein im Verlauf von einigen Minuten abklingendes dunkelrotes Nachleuchten gemessen werden.

Die Probe wird hierzu von einer Schlauchpumpe in eine Anregungsküvette gefördert, in der eine 30 Sekunden dauernde Adaption an eine Belichtung mit weißem Licht der Intensität 100 W/m^2 stattfindet. Anschließend wird die Probe in die Abklingküvette weitertransportiert. Dort wird das Abklingen der verzögerten Fluoreszenz durch Photonenzählung mit einem Sekundärelektronenvervielfacher registriert. Ein

angeschlossener Computer berechnet den Chlorophyllgehalt der Probe als Produkt des Integrals über die Abklingkurve mit dem Kalibrierfaktor, welcher durch eine Referenzmethode (photochemische Bestimmung des Chlorophyllgehalts von *Scenedesmus subspicatus*) ermittelt wird. Die Messapparatur besitzt eine hohe Empfindlichkeit und einen großen dynamischen Bereich, d.h. man kann sowohl bei hohen als auch bei relativ niedrigen Algenkonzentrationen noch gut auswertbare Signale erhalten.

Zur Bestimmung des Chlorophyll-a-Gehaltes wurde je Mikrokosmos 500 ml Wasser entnommen und über ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm in lichtgeschützte PE Behälter gegeben und anschließend am Institut für Landespflege und Botanik der Technischen Universität München gemäß der Standardarbeitsanweisung (SOP) LSÖ/015/04, Stand 01.05.1999, gemessen.

Trenbolon – durchflusszytometrische Chl-a-Bestimmung

Für den Versuch mit Trenbolon 2001 wurde der Gesamt-Chlorophyll-a-Gehalt in Proben einerseits in Anlehnung an ein Extraktionsverfahren mit Ethanol nach Nusch (1980), andererseits mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden bestimmt.

1.) Extraktionsverfahren mit Ethanol

30 ml Probe wurden durch einen Polykarbonatfilter (Porengröße 2 µm) mittels einer Vakuumpumpstation gesaugt. Der Filtrerrückstand wurde in 10 ml kochendes Ethanol gegeben und für 24 h extrahiert. Die anschließende Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte mit dem LS-50B Photometer (Perkin Elmer) bei einem Anregungswellenlängenbereich zwischen 435 und 445 nm. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 700 nm detektiert. Wie Untersuchungen an der Spree in den Jahren 1994 bis 1996 (PROCHNOW et al. 1997) gezeigt haben, lässt die so durchgeführte Fluoreszenzmessung eine Abschätzung der Phytoplanktonkonzentration, die durch mikroskopische Zählung ermittelt wurde, mit einem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,83$ zu.

2.) Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden in einem wässrigen Medium suspendierte Zellen mit einer Düse hydrodynamisch fokussiert und passieren so einzeln hintereinander einen Laser von welchem die Photosynthesepigmente der Phytoplanktonzellen zur Aussendung einer Fluoreszenz angeregt werden. Das so

emittierte Licht wird über ein optisches System auf Photomultiplier gelenkt und von diesen in elektrische Signale umgewandelt. Außerdem wird noch die Lichtstreuung zur Differenzierung der Größe und Struktur der Partikel eingesetzt.

2 ml Probe wurden nach Fixation mit 0,2% Glutaraldehyd gemessen. Die Pigmentanalyse wurde bei Excitationswellenlängen zwischen 528 und 632 nm durchgeführt. Die emittierte Fluoreszenz wurde bei 665 nm für jede Anregungswellenlänge gemessen, bzw. bei 575 nm für eine Anregungswellenlänge von 528 nm. Partikel des Phytoplanktons und deren Größenstrukturen wurden über Vorwärts- und Orthogonal- Lichtstreuung detektiert.

Messung funktioneller Parameter

In wöchentlichen Intervallen wurden folgende physikalische Parameter gemessen: Wassertemperatur, Leitfähigkeit, pH-Wert, Sauerstoffsättigung und -gehalt mit dem WTW Multiline P4 sowie Nitrat-, Ammonium-, und Orthophosphat-Konzentrationen.

pH Wert

Der pH Wert wurde mit der WTW Einstabmesskette SenTix 41 mit integriertem Temperaturmessfühler gemessen, in welcher Mess- und Referenzelektrode ineinander geschachtelt sind. Diese pH Messkette ist eine ionensensitive Elektrode mit der die Potenzialdifferenz, die durch den Austausch von H⁺ Ionen in der Glasmembran entsteht, bestimmt wird.

In den Mikrokosmen wurde bei einer Eintauchtiefe von ca. 10 cm gemessen.

Leitfähigkeit

Als Messelektrode wurde die Standard-Leitfähigkeitsmesszelle TetraCon 325 mit Graphitelektroden verwendet, deren Messbereich zwischen 1µS/cm und 2 S/cm liegt.

Die Eintauchtiefe in den Mikrokosmen betrug ca. 10 cm.

Sauerstoff

Unter Berücksichtigung der aktuellen Wassertemperatur wurden mit dem Sauerstoffsensor CellOx 325 Sauerstoffgehalt und –sättigung gemessen.

Grundprinzip: Sauerstoff reagiert elektrochemisch zwischen einer Goldkathode und Anode aus Blei oder Silber. Dadurch kommt es zu einem Stromfluss, der proportional zur Konzentration des Sauerstoffs in einer Probe ist.

Zur Messung wurde die Elektrode ca. 10 cm tief in den Wasserkörper der Mikrokosmen getaucht. Durch Bewegen des Sensors in den Mikrokosmen und einem daraus resultierenden stetigem Anströmen wurde der Einfluss sauerstoffarmer Zonen, welche durch Diffusion der Sauerstoffmoleküle in den Sensorkopf entsteht und welche eine zu niedrige Sauerstoffkonzentration vortäuschen würde, auf eine korrekte Sauerstoffmessung verhindert.

Chemische Parameter

Im Labor wurden Wasserproben mit Macherey und Nagel GmbH Rundküvetten tests entsprechend der Anleitung im beiliegenden Handbuch „Analysen von Trink-, Oberflächen-, Grund-, Brauch- und Abwasser mit dem Spektralphotometer Nanocolor 300 D“ aufbereitet und der Gehalt an Ortho-Phosphat, Nitrat und Ammonium photometrisch erfasst.

2.1.4. Präparation der Zooplanktonproben

Die in 50 ml Falcon-Tubes aufbewahrten Proben wurden über 63 µm Gaze filtriert und der Durchlauf aufgefangen. Mit einem kräftigen Wasserstrahl wurde das Zooplankton von der Gaze in die Zählgläschen (Petrischalen) mit einem Durchmesser von 8 cm gespült, die an der Unterseite mit einer Millimeterrasterung versehen waren, um Größenabschätzung einzelner Individuen unter dem Binokular zu ermöglichen. Durch die Zugabe von 1 bis 2 Tropfen Spülmittel wurde die Oberflächenspannung des Wassers verringert, so dass auch kleine Zooplankter auf den Boden des Glases sinken und mikroskopisch erfasst werden konnten.

2.1.5. Zähl- und Bestimmungsmethodik

Zooplankton

Um die Anzahl verschiedener Taxa möglichst genau bestimmen zu können, wurden für diese Untersuchungen die Proben vollständig ausgezählt. Das entsprechende Zählglas wurde unter dem Mikroskop dabei so verschoben, dass entlang der Millimeterrasterung ausgezählt werden konnte (bahnenweise). Die Bestimmung und Auszählung der Individuen erfolgte bei maximal 62 facher Vergrößerung. Drei große Gruppen, deren ökologische Parameter zur Auswertung herangezogen wurden, wurden unterschieden: Cladocera, Copepoda und Rotatoria. Individuen wurden nach Möglichkeit bis zur taxonomischen Einheit der Art bestimmt. In einigen Fällen konnte nur auf Gruppenniveau bestimmt und gezählt werden. Teilweise wurden auch einzelne Entwicklungsstadien als eigenes Taxon gewertet, z.B. Nauplia (Larvenstadium der Copepoda), da hier eine Zuordnung zu einer bestimmten Art nicht möglich ist. Soweit als möglich wurden Individuen innerhalb eines Taxons in Größenklassen eingeteilt. In einer Gruppe „Sonstige“ wurden Spezies wie Muschelkrebse, Insekten und Insektenlarven etc. erfasst.

Phytoplankton

Die Phytoplanktonproben wurden für Identifizierung und Quantifizierung im Umkehrmikroskop (Inversmikroskop Fa. Leica, Typ Leica DM IRBE HC mit Bildanalysesoftware Q500/W-E und Hardware) mittels kombinierter Plattenkammern mit Sedimentationsröhren (Fa. Hydro-Bios, Nr. 435 025) nach Utermöhl (1958) präpariert (UTERMÖHL 1958). Das Biovolumen wurde kalkuliert nach Höhn (HOEHN et al. 1998). Die Bestimmung der Phytoplanktonproben erfolgte analog zu Methoden aus den in den Jahren 1998 und 1999 mit Nonylphenol, bzw, Ethinylestradiol durchgeführten Versuchen (SEVERIN 2000, SEVERIN et al. 2003).

2.1.6. Auswertung der Meiobenthosproben

Bisher wurden nur die Proben für den Versuch 2001 mit Trenbolon untersucht. Die Untersuchungen wurden im Auftrag der GSF von der Fa. Ecosa, München, durchgeführt und die Ergebnisse in Form eines Schlussberichtes (ECOSSA 2003) übergeben. Nachfolgende Methodenbeschreibung wurde diesem entnommen:

Die Untersuchung der benthischen Meiofauna und speziell der Nematoda ist für die Erfassung von schadstoffinduzierten Änderungen benthischer Lebensgemeinschaften aus folgenden Gründen gut geeignet (HEIP 1980, HÖSS und TRAUNSPURGER 2003):

- (1) Zur Meiofauna gehören fast ausschließlich Tiergruppen, die ihren gesamten Lebenszyklus im Sediment verbringen. Pelagische Lebensformen wie bei vielen makrobenthischen Gruppen kommen so gut wie nicht vor. Sie sind also Schadstoffen während ihres gesamten Lebenszyklus ausgesetzt.
- (2) Die Organismen der Meiofauna sind relativ klein und haben kurze Generationszeiten. Es ist also möglich, Reaktionen von Lebensgemeinschaften in räumlich und zeitlich begrenzten Skalen zu messen. Die Meiofauna ist also gerade für Untersuchungen in Mikrokosmen sehr gut geeignet.
- (3) Die Nematoda, Vertreter der Meiofauna, sind die individuen- und artenreichste Gruppe der Metazoen in Sedimenten. Durch die hohen Abundanzen werden experimentelle Daten erstens aussagekräftiger, zweitens besitzen sie eine hohe ökologische Relevanz.

In dieser Studie wurde die Meiofauna und speziell die Nematoda-Lebensgemeinschaften in Mikrokosmen über einen Zeitraum von 18 Wochen untersucht, die über 9 Wochen mit Trenbolon (TB) behandelt wurden. Neben vier Kontrollen (K1-K4) (ohne TB), wurden vier TB applizierte Mikrokosmen (C, D, E und F) ausgewertet. Zu 13 verschiedenen Zeitpunkten (2 in der Präapplikationsphase, 9 in der Applikationsphase, 2 in der Postapplikationsphase) wurden aus diesen Mikrokosmen mit Hilfe eines Stechrohres Sedimentproben entnommen, die dann in Formalin fixiert aufbewahrt wurden.

Die mit Formalin fixierte Probe wurde (unter dem Abzug) mit Wasser in ein großvolumiges Zentrifugegefäß gespült. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und das Sediment mit Ludox ($\rho = 1,13$, ca. 3 faches Volumen des Sediments) gut durchmischt. Durch Zentrifugation setzten sich die Sedimentpartikel im Bodensatz ab, während die Organismen (und organischen Partikel) auf Grund ihrer ähnlichen Dichte im Überstand blieben. Der Überstand wurde durch eine 10 μm Gaze gefiltert, um die Organismen vom Ludox zu trennen. Die Ludox-Extraktion wurde dreimal wiederholt.

Die Organismen wurden vom Filter in eine Petrischale gespült und unter einem Binokular bei 20-facher Vergrößerung in die wichtigsten Gruppen eingeteilt: Nematoda, Annelida, Tardigrada, Copepoda, Nauplia-Larven, Ostracoda, Chironomida-Larven, Gastrotricha und Phyllopora. Pro Probe wurden 50 Nematoda zufällig aussortiert und für die Bestimmung präpariert. Die Präparation der Nematoda erfolgt nach SEINHORST 1959).

Folgende Parameter wurden zur Bewertung des Einflusses von TB auf die Meiofauna bzw. die Nematoda-Lebensgemeinschaft betrachtet:

1. **Abundanzen:** gesamte Meiofauna, Nematoda
2. **Zusammensetzung** der Meiofauna
3. **Maturity Index:** Durch die Bestimmung der Nematoda auf Gattungsebene kann der *Maturity Index* (MI) nach BONGERS (1990) für die Bewertung angewendet werden. Die Relation zwischen „Kolonisten,, (viele kleine Eier; können schnell ein Habitat besiedeln) und „Persisters,, (wenige große Eier, sind gut an ein Habitat angepaßt) wird durch diesen Index ausgedrückt. Eine gute Korrelation des Index mit der Schwermetall- und organischen Belastung konnte bereits gezeigt werden (z.B. BONGERS et al. 1991, BONGERS et al. 2001, CANTELMO und RAO 1978, KORTHALS et al. 1996).
4. **Verteilung der Ernährungstypen:** Ein Monitoring kann auch auf Grund der Verteilung der Ernährungstypen durchgeführt werden. Je nach Belastungszustand erhält man eine bestimmte Verteilung der Ernährungstypen (LAMBSHEAD 1986, VRANKEN et al. 1988, ZULLINI 1976) . Für die Zuordnung der Nematoda zu Ernährungstypen sind keine systematischen Kenntnisse erforderlich. Sie erfolgt an Hand morphologischer Merkmale der Mundhöhle.
5. **Artenzusammensetzung:** Oft reicht es nicht aus die Nematoda-Lebensgemeinschaften nur auf Gattungsniveau zu betrachten, wie dies zur Errechnung des Maturity-Index geschieht, da Änderungen der Lebensgemeinschaften erst auf Artniveau sichtbar werden (WARWICK und CLARK 1991).

2.1.7. Auswertemethoden

Numerische Verfahren

Anzahl der Taxa

Mit Taxon werden in dieser Studie unterschiedliche Gattungen, Spezies und Entwicklungsstadien bezeichnet. Die Anzahl der Taxa in den verschiedenen Mikrokosmen wurde im zeitlichen Verlauf bestimmt.

Diversität und Evenness

Definitionsgemäß ist Diversität die im Verlauf entstandene Vielfalt an Lebensformen von den Genen über Chromosomen, Individuen und Arten bis hin zu den Lebensgemeinschaften und Ökosystemen (WILSON 1994).

Biodiversität zeigt sich also aufgrund der hierarchischen Strukturierung von Ökosystemen auf allen Ebenen. Zwei Hauptkomponenten spielen bei der Erfassung der Diversität eine Rolle: die Anzahl der Einheiten (Arten, Gene, etc.) = Abundanz und die Verteilung der Einheiten = Dominanz.

In dieser Studie soll der Schwerpunkt auf die Arten- oder besser Taxadiversität der Zooplankter in aquatischen Modellökosystemen gelegt werden. Da oft auch mit der Artenvielfalt eine strukturelle Vielfalt korreliert (Bestände mit vielen Arten sind auch stärker strukturiert), können darüber bedingt Aussagen getroffen werden.

Zur Bestimmung der Diversität soll hier der Diversitätsindex nach Shannon verwendet werden, welcher auf der Beobachtung beruht, dass mit zunehmender störungsfreien Entwicklungsdauer die Artenvielfalt zunimmt. Aus dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik (Entropiesatz) heraus, welcher besagt, dass jede Zustandsänderung in Systemen mit einer Zunahme der Entropie (=Unordnung) verbunden ist, wird die Formel für den Diversitätsindex nach Shannon abgeleitet (PFADENHAUER 1997):

$$\bar{H} = -(K) * \sum p_i \ln p_i$$

mit

\overline{H} : Diversitätsindex

K: Boltzmann-Konstante

p_i : Wahrscheinlichkeit des Auftretens der Art i , wird aus dem Bedeutungswert (hier Abundanz der Art) dieser Art n_i durch die Summe der Bedeutungswerte N . $p_i = n_i/N$.

Die so berechnete Diversität steigt also auch mit der Anzahl berücksichtigter Arten. Um Systeme mit verschiedenen Artenzahlen bezüglich ihrer Strukturierung miteinander vergleichen zu können, ist es sinnvoll die Evenness als Artenzahl unabhängiges Maß für die Gleichverteilung der Arten innerhalb eines Bestandes heranzuziehen. Die Evenness gibt an wie viel Prozent der theoretisch maximalen Diversität tatsächlich erreicht werden.

E = Prozentanteil von H an H_{\max}

$$E = \frac{\overline{H}}{H_{\max}} * 100$$

Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichung

Mittelwerte und Standardabweichung wurden nach KREYSZIG (1979) berechnet.

Mittelwert:

$$MW = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_j$$

MW Mittelwert

n Anzahl der Werte

x_j Messwert

Standardabweichung:

$$STABWN = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$$

STABWN Standardabweichung

n Anzahl der Werte

x Messwert

Statistik

Zur Auswertung der erhobenen Daten und zur Untersuchung von Effekten auf die Entwicklung der Biozönosen in den Mikrokosmen wurden statistische Methoden angewandt, die sowohl zeitliche Verläufe in den Systemen, als auch Abweichungen der belasteten Mikrokosmen von den Kontrollen berücksichtigen. Ausgangspunkt der statistischen Analyse sind dabei Matrices in Form von Objekt x Deskriptor (mit Objekt = Zeit und Belastung; Deskriptor = Abundanzen der einzelnen Taxa).

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA) wurde zur Vereinfachung der Darstellung der hochdimensionalen ökologischen Daten als Verfahren zur Dimensionsreduktion auf eine Ebene verwendet. Varianz ist wichtigste Größe zur Beschreibung der Datenstruktur. Als erste Achse wird diejenige Linearkombination der ursprünglichen Variablen bestimmt, die die meiste Varianz erklärt. Sukzessive werden weitere Komponenten extrahiert. Die Darstellung erfolgt dann in Form eines Biplots.

Durch Redundanzanalyse (RDA) können im Gegensatz zur PCA gleichzeitig zwei Datenmatrices, Objekt x Umweltvariable, ausgewertet werden, wobei durch die Umweltvariable z.B. Zugehörigkeit zu einer Belastungsgruppe (MK A bis MK F) oder chemische Parameter berücksichtigt werden. Die Varianz dieser Umweltvariablen wird durch die RDA beschrieben und durch Anwendung einer PCA erklärt. Zur Darstellung und Interpretation der Ergebnisse wird nach der Principal Response Curve (PRC) nach Van den Brink und Ter Braak (1999) in Form des Computerprogrammes CANOCO Version 4.0 verfahren. Basierend auf einer RDA werden bei dieser Methode Unterschiede in den Biozönosen der Kontrollen und chemikalienbelasteten Mikrokosmen im zeitlichen Verlauf hervorgehoben und durch die PRCs dargestellt werden. Durch die mit Hilfe dieser Methode ermittelten Species

Scores kann zudem der Anteil der einzelnen Taxa an den Komponenten betrachtet werden. Durch Multiplikation der Funktionswerte der PRCs (Canonische Koeffizienten (cdt-Werte)) mit den Species Scores wird eine Abschätzung der multiplikativen Änderung der Abundanzen einer Art in den belasteten Mikrokosmen gegenüber der Kontrollen möglich.

2.2. Katecholaminbestimmung

2.2.1. HPLC Anlage

Geräte und Materialliste

Probenvorbereitung

Poly Vials 0,5 ml mit Vial Filtercaps, Dionex (P/N 038011)

Kompakt Kit von Recipe (Probensäule für die Messung von Katecholaminen in Plasma, Elution Buffer, Washing Buffer, Sample Preparation Columns für Katecholamine, Interner Standard, Calibration Standard, Lyophilisierender Kalibrator)

ClinRep Sample Preparation Columns for Catecholamines in Plasma (Recipe, Bestellnr. 1020), (Abb. 1)

Chemikalien

Stickstoff

Summenformel: N₂

Molekulargewicht: 28,01 g/mol

Schmelzpunkt: -209,95°C, erstarrt bei dieser Temperatur

Siedepunkt: -195,86°C, wird bei dieser Temperatur flüssig

1 l flüssiger Stickstoff entsprechen 800 l Stickstoffgas

Dampfdichte: 0,967 kg/m³

Methanol

Summenformel: CH₄O

Molekulargewicht: 32,04 g/mol

Schmelzpunkt.: -98°C

Siedepunkt: 64,6°C

Verdunstungspunkt: 4,6°C

Flammpunkt: 12°C

Dichte: 0,791 g/cm³

Dampfdichte: 1,11 kg/m³

Dampfdruck: 16,8 Pa

Reinheit: 99,8 %

Firma Merck KGaA, Darmstadt

Chloroform

Summenformel: CHCl₃

Molekulargewicht: 119,37 g/mol

Firma Merck KGaA, Darmstadt

DHBA

3,4 – Dihydroxybenzylamin

Interner Standard (Recipe: 10 pg/μl; Chromsystems: 1,5 ng/μl)

Summenformel: (HO)₂C₆H₃NH₂

Molekulargewicht: 125,13 g/mol

Schmelzpunkt: 192-195°C

Firma Chromsystems, München; Firma Recipe, München

Calibration Standard, Standardlösung

Tabelle 6: Bestandteile bzw. Konzentrationen des Calibration Standards und Nachweisgrenze von Katecholaminen in Plasma von Recipe und Chromsystems

Firma	Noradrenalin	Adrenalin	DHBA	Dopamin	Nachweisgrenze Plasma (jedes Katecholamin)
Chromsystems	25 μg/l	5 μg/l	50 μg/l	100 μg/l	10 ng/l
Recipe	10 pg/μl	6 pg/μl	10 pg/μl	6 pg/μl	<5 ng/l

MS 222

Ethyl 3-aminobenzoatmethansulfonat

Synonyme: Tricain-Methansulfonat, Metacain,

CAS : 886-86-2

Summenformel : $C_9H_{11}O_2N+CH_3SO_3H$

Molekulargewicht : 261,3 g/mol

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany

Adrenalin

Synonym: Epinephrine

Summenformel: $C_9H_{13}NO_3$

Molekulargewicht: 183,21 g/mol

Noradrenalin

Synonym: Norepinephrine

Summenformel: $C_8H_{11}NO_3$

Molekulargewicht: 169,18 g/mol

Dopamin

Synonym: 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethylamine

Summenformel: $C_8H_{11}NO_2$

Molekulargewicht: 153,18 g/mol

Schmelzpunkt: 245°C

Geräteliste

Tabelle 7: Verwendete Geräte, Typbezeichnung und Firmensitz

Gerät	Typ	Firma
Rotationsverdampfer	Labo Rota 5300	Resona technics, Schweiz
Biofuge	Biofuge 22R, Hereaeus Sepatech	Firma Kendro, D- München
Zentrifuge	Gyofuge 8500, Hereaeus Sepatech	Firma Kendro, D- München
Ultraschallbad	Sonorex RK 510 S	Bandelin electronic, D- Berlin
Analysenwaage	R 200 D	Sartorius AG, D- Göttingen
HPLC	Dionex-IC Gerät	Firma Dionex, CH- Basel
Vortex	Heidolph Reax 2000	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Schüttler	Infors-Type AJ 117	Infors AG, CH- Bottmingen

Beschreibung der verwendeten HPLC Anlage

Detektionsmodul: Dionex ED 40

Zelle: amperometrisch, Dionex

Säule: phased reverse, Recipe

Pumpe: Dionex GP 40

Autosampler.

Eine Geeignete Methode zur Messung von Katecholaminen ist die Elektrochemische Detektion (ED). Ein elektrochemischer Detektor misst dabei den Verlauf einer Spannung, die an Elektroden in einer Durchflusszelle angelegt wird. Mehrere verschiedenen Eigenschaften der durchfließenden Lösung können bestimmt werden. Dadurch kann eine Qualifizierung und eine Quantifizierung von Stoffen erfolgen.

Vorteil der elektrochemischen Detektion gegenüber anderen Detektortypen und – methoden, wie z.B. einem UV-visible absorbance Detektor, Kurzwellen UV Detektion oder Refractive index Detektion, ist die Fähigkeit einen weiten Bereich sogenannter

nicht chromophorer Moleküle mit einer sehr guten Sensitivität und Selektivität detektieren zu können.

Diese Moleküle beinhalten Carbon-, Sulfon- und Phosphonsäuregruppen; Alkohole, Glykole, Aldehyde und Kohlehydrate; primäre, sekundäre, tertiäre und quartäre Amine; Sulfate, Sulfoxide, Thiole, Sulfide, Mercaptan und anorganische Anionen und Kationen. Außerdem liefert die elektrochemische Detektion eine beträchtliche Verbesserung bezüglich Sensitivität und Selektivität gegenüber UV Absorption bei Aminen und hydroxy-substituierten Aromaten wie es die Katecholamine sind.

Haupttypen der ED:

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde ein Dionex Ionenchromatograph ED 40 verwendet, welcher mit einer amperometrischen Zelle ausgestattet war.

Amperometrische Zelle

Als amperometrische Zelle wurde eine elektrochemische Miniatur-Durchflusszelle verwendet, die drei Elektroden beinhaltet:

- 1) Arbeitselektrode aus Glassy Carbon
- 2) Counter-Titanium (Teil des Zellkörpers)
- 3) Dual Referenzelektrode: Silber/Silberchlorid und pH, bei ED 40: Referenzelektrode der amperometrischen Zelle ist eine kombinierte pH-Silber/Silberchlorid-Elektrode.

Die Oxidation oder Reduktion der Analyte wird erreicht, indem ein Potential zwischen Arbeits- und Referenzelektrode angelegt wird.

Pumpe und Laufmittel

Das eingesetzte Laufmittel (mobile Phase, Recipe) wurde mit einer Dionex GP 40 Pumpe im geschlossenen Kreislauf gepumpt. Bei Verunreinigung der mobilen Phase („unruhige“ Basislinie) wurde diese komplett erneuert. Ein Vorfilter (Porengröße 3 µm) diente als mechanischer Schutz der Säule vor Verschmutzung.

2.2.2. Präparation der Proben für die Katecholaminbestimmung

Im Rahmen einer Diplomarbeit (THEIMER 2002, unveröffentlicht) wurden an verschiedenen Matrices unterschiedliche nachfolgend beschriebene Methoden bezüglich ihrer Eignung für die Messung von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin getestet.

2.2.2.1. Chloroformextraktion

In Anlehnung an eine Veröffentlichung von Szopa et al. (2001), in der Blätter und Knollen der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) erfolgreich nach Katecholaminen untersucht wurden, wurde nachfolgende Methode auf Fischgehirn, *Lymnaea stagnalis* und *Daphnia magna* übertragen. Einige dieser Verfahrensschritte findet man auch bei Roessner et al. (2000).

- [1] die jeweilige Probe an der Waage abwägen und in eine Reibschale geben
- [2] mit flüssigem Stickstoff mehrmals übergießen und mit einem Pistill zu feinem Pulver zermahlen
- [3] das feine Pulver mit einem Spatel in einen Erlenmeyerkolben einfüllen, pro Gramm Frischgewicht 4 ml Methanol dazugeben, mit einem Deckel lose verschließen und für 15 Min. bei 70°C mit einem Magnetfischchen auf einer Magnetheizplatte erhitzen; so werden Enzyme aus dem Pflanzenmaterial deaktiviert (ROESSNER et al., 2000), bzw. die Hämolymphe deproteiniert (HOPKINS et al., 1995).
- [4] die Flüssigkeit in kleine Reagenzgläser überführen und für 25 Min. bei 5500 g zentrifugieren
- [5] Überstand (selektive Methanolphase) im Messzylinder abmessen und mit einer Glaspipette in einen Scheidetrichter dekantieren
- [6] das gleiche Volumen an Milliporewasser dazugeben
- [7] Internen Standard zugeben
- [8] in mehreren Schritten Chloroform entsprechend dem Volumen der aufbereiteten Probe (1:1) dazugeben; bei jedem Schritt Chloroform unter dem Abzug in den Scheidetrichter geben, diesen vorsichtig schütteln und über das untere Ventil entgasen; mehrmals wiederholen; den Scheidetrichter für 10-20 Min. stabil lagern und untere Chloroformphase in einem Gefäß auffangen; die gesammelte Chloroformphase besitzt mit 1,47 g/cm³ eine größere Dichte als Methanol mit

0,79 g/cm³. Chloroform ist ein stärker polares Lösungsmittel als Methanol, weshalb sich die Katecholamine aufgrund ihrer höheren Affinität darin besser lösen

[9] Chloroformphase mit einer Glaspipette in einen Spitzkolben geben und am Rotationsverdampfer (250, 300, 500 mbar) bis auf einen kleinen Rest eindampfen

[10] Mit 1 ml der folgenden Lösungen rücklösen:

[10a] Mobile Phase

[10b] Elution Buffer

[11] 50 µl des Eluats in die HPLC Anlage injizieren

2.2.2.2. Plasmakit

Die zum Einsatz kommenden Plasmakits wurden für den humanmedizinischen Bereich entwickelt, finden aber auch bei der Detektion von Katecholaminen in Blut von Legehennen (CHENG et al., 2001) und in der Hämolymphe der Auster *Crassostrea gigas* (LACOSTE et al., 2001) Anwendung.

Die Probenvorbereitungssäulchen aus dem Plasmakit sind mit Aluminiumoxid und Pufferlösung gefüllt. Das Aluminiumoxid bindet Katecholamine aus der aufbereiteten Probe aufgrund seiner starken Polarität an sich. Nach mehreren Waschschritten mit Washing Buffer werden mit Elution Buffer die Katecholamine vom Säulchen eluiert.

Für die Messungen werden Fischgehirn, Fischblut, Humanblut, Humanplasma, *Daphnia magna*, *Lymnaea stagnalis*, *Danio rerio* und *Scenedesmus subspicatus* verwendet. Die Mengenangaben sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

[1] feste Proben (*Lymnaea stagnalis* und *Daphnia magna*, *Danio rerio*) werden an der Analysenwaage abgewogen, in ein Porzellanschälchen gegeben, mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit einem Pistill zu feinem Pulver zermahlen

[2] flüssige Proben (Humanblut, Plasma, Fischblut, *Scenedesmus subspicatus*) müssen nicht bearbeitet werden; optimaler Einsatz 1 ml

[3] Proben auf das Säulchen geben

[4] Internen Standard dazu geben

[5] die Kartusche kopfüber für 15 Min. schütteln

[6] die untere Verschlusskappe entfernen, in ein Reagenzglas stecken und bei 1000 g für 1 Min. zentrifugieren

[7] 1 ml Washing Buffer von Recipe hinzugeben, Deckel verschließen, bei 1000 g für 1 Min. zentrifugieren und Eluat verwerfen; noch 2 mal wiederholen

[8] die untere Verschlusskappe anbringen, 510 µl Elution Buffer von Recipe auftragen und 1 Min. am Vortex schütteln

[9] untere Verschlusskappe entfernen, Säulchen in ein Reagenzglas geben und bei 1000 g für 1 Min. zentrifugieren

[10] 50 µl des Eluats in die HPLC Anlage injizieren

2.2.2.3. Kombination Chloroformextraktion mit Plasmakit

Mit dieser Methode werden *Lymnaea stagnalis* und *Daphnia magna* bearbeitet.

[1] die jeweilige Probe an der Waage abwägen und in eine Reibschale geben

[2] mit flüssigem Stickstoff mehrmals übergießen und mit einem Pistill zu feinem Pulver zermahlen

[3] das feine Pulver mit einem Spatel in einen Erlenmeyerkolben überführen, pro Gramm Frischgewicht 4 ml Methanol dazu geben, mit einem Deckel lose verschließen und für 15 Min. bei 70 °C mit einem Magnetfischchen auf einer Magnetheizplatte erhitzen

[4] die Flüssigkeit mit einer Glaspipette in kleine Reagenzgläser überführen und für 25 Min. bei 5500 g zentrifugieren

[5] den Überstand (selektive Methanolphase) im Messzylinder abmessen und mit einer Glaspipette in einen Scheidetrichter dekantieren

[6] das gleiche Volumen an Milliporewasser dazugeben

[7] 1 ml der Probe aus [5] unverdünnt oder [6] verdünnt auf eine Probenvorbereitungskartusche von Recipe geben

[8] 250 µl Interner Standard von Recipe dazugeben

[9] die Kartusche kopfüber für 15 Min. schütteln

[10] die untere Verschlusskappe entfernen, in ein Reagenzglas stecken und bei 1000 g für 1 Min. zentrifugieren

[11] 1 ml Washing Buffer von Recipe hinzugeben, Deckel verschließen, bei 1000 g für 1 Min. zentrifugieren und Eluat verwerfen; noch 2 mal wiederholen

[12] die untere Verschlusskappe anbringen, 510 µl Elution Buffer von Recipe auftragen und 1 Min. am Vortex schütteln

[13] untere Verschlusskappe entfernen, Säulchen in ein Reagenzglas geben und bei 1000 g für 1 Min. zentrifugieren

[14] 50 µl des Eluats in die HPLC Anlage injizieren

2.2.3. Versuche mit *Danio rerio*

2.2.3.1. Beschreibung des genetischen Stammes

Für die in dieser Studie durchgeführten Messungen mit *Danio rerio* wurden Fische des genetischen Stammes AB verwendet. Die AB Linie stammt von zwei Linien, A und B, ab, die von Streisinger in einer Zoohandlung in Albany, Oregon zu verschiedenen Zeiten gekauft wurden. Die originalen A und B Stämme gehen wahrscheinlich auf eine Zucht in Florida zurück. Von 1970 bis in die 90er wurden die AB Stämme in den Laboratorien in Oregon gehalten, indem haploide, nach gutem Gesundheitszustand und intaktem Aussehen der Embryonen selektierte weibliche AB Nachkommen mit unselektierten männlichen Tieren gekreuzt wurden. Diese Vorgehensweise reduzierte die Anzahl lethaler Mutationen, so dass diese Linie auch für parthenogenetische Fortpflanzung (Entwicklung aus unbefruchteten Eiern) genutzt werden konnte.

Seit Juni 1992 wird als AB Stamm die von Charline Walker erschaffene *AB Linie bezeichnet. Walker selektierte aufgrund der Phänotypen der Embryonen aus 180 weiblichen AB Tieren 21 aus, deren Nachkommen schließlich Grundlage für den *AB Stamm waren.

2.2.3.2. Systematik, Lebensweise und Verbreitung

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) ist ein Vertreter aus der Familie der Weißfische (Cyprinidae) in der Ordnung der Karpfenartigen (Cypriniformes) und zählt damit zur Klasse der Knochenfische (Osteichthyes) und zum Unterstamm der Wirbeltiere (Vertebraten) Zu dieser Familie gehören z.B. auch der Karpfen, die Rotfeder und der Schleie.

Zebrafische sind tropische Süßwasserbewohner mit Verbreitungsgebieten in Indien, Pakistan, Nepal und Südostasien.

2.2.3.3. Genetik

Das Genom umfasst ca. $1,7 \times 10^9$ Basenpaare auf 25 Chromosomen. Es gibt keine Geschlechtschromosomen, der Vorgang der Geschlechtsdetermination ist noch weitgehend unbekannt. Das Genom wird derzeit vom Sanger Centre (Cambridge/UK) und dem Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie (Tübingen) sequenziert, die vollständige Sequenz soll noch 2003 vorliegen.

2.2.3.4. Hälterung der Versuchstiere

Nach Übernahme der Fische aus dem Bestand der Versuchstierzucht und -haltung des GSF-Forschungszentrums, Institut für Säugetiergenetik, wurden jeweils 10 bis maximal 20 Versuchstiere in 20 l Aquarien in einer Klimakammer bei konstanten Bedingungen (26° C Raumtemperatur, 20-50% Luftfeuchte, 12 h Hell-Dunkel Zyklus) gehalten. In den Aquarien wurde Luft über Sprudelsteine zugeführt um so die Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Durch Heizstäbe wurde die Wassertemperatur bei für die Fische geeigneten 26 °C gehalten. Die Fütterung mit handelsüblichem Fisch Flockenfutter der Fa. Sera Vipan, Heinsberg, erfolgte einmal täglich über Futterautomaten. Die Fische verbrachten mindestens zwei Tage in den Aquarien, bevor mit der Probenahme begonnen wurde.

2.2.3.5. Probenahme („Stressfreies Töten“)

Da der Katecholaminspiegel in gesunden, nicht gestressten Fischen bestimmt werden sollte, wurde darauf geachtet, dass Stressfaktoren bei Hälterung und vor allem während der Probenahme für die Probanden soweit als möglich vermieden wurden. Vor allem artifizielle, also vom Menschen verursachte Stressoren, wie z.B. Transport, Sortieren, Umsetzen und Fang, spielen bei Fischen eine besondere Rolle (ANDERSON 1990). So wurden an Silberlachsen und Regenbogenforellen Kennzeichen von akutem Stress nach Keschern aus dem Becken und kurzem Transport festgestellt werden (WEDEMEYER 1972). Melotti et al. (1992) beobachteten bei Bachforellen erhöhte Glukosekonzentrationen bei Tieren, die mit Keschern gefangen wurden.

Die Tötung der Tiere erfolgte mit MS 222 (Tricain) gemäß den „Richtlinien über das fachgerechte und tierschutzkonforme Töten von Versuchstieren“ des Bundesamtes

für Veterinärwesen (Richtlinie Tierschutz 3.01, 12. Juli 1993 (1), 3003 Bern, Jk/Vo/re-800.116-3.01). Basierend auf Literaturdaten (STOSKOPF 1993) wurde in eigenen Versuchen Tricainkonzentrationen ausgetestet, um möglichst schnelle Induktionszeiten des Narkosemittels auf die Fische zu erreichen. Zu lange Betäubungszeiten rufen bei Fischen Reaktionen hervor, die denen akut einwirkender Stressoren ähneln. So fanden Strange und Schreck (1978) sowie Barton und Peter (1982) als Antwort auf eine leichte Behandlung mit einer wässrigen Tricain-Lösung eine Erhöhung der Kortisolwerte, wie sie auch unter Einwirkung akuter Stressoren festzustellen war. Ab Konzentrationen von 100 mg/l blieb die Erhöhung der Blutkortisolkonzentration aus.

Die Aquarien der Testtiere waren mit ca. 1 m langen Schläuchen versehen, die bereits vor dem Besatz mit Fischen angebracht worden waren. Über diese Schläuche konnte mittels einer Einwegspritze eine Tricain –Lösung (Konzentration: 500 mg/l) eingebracht werden ohne dass die ausführende Person von den Testtieren bemerkt wurde. Innerhalb weniger Minuten wurden die Fische betäubt und schließlich durch eine Überdosis Tricain getötet.

Die toten Testtiere wurden einzeln aus dem Aquarium entnommen und sofort mit flüssigem Stickstoff gefroren, in PE Schraubgefäße gegeben und bis zur Probenvorbereitung bei –80 °C aufbewahrt.

Für die Probenvorbereitung wurde je ein vollständiger Fisch in flüssigem Stickstoff unter Zugabe von ausgeglühtem Seesand in einem Mörser zermahlen. Die weitere Aufarbeitung der Probe erfolgte nach der oben beschriebenen Methode „Plasmakit“.

3. Ergebnisse

3.1. Mikrokosmenversuch mit 17 α -EE 2000

3.1.1. Vorversuche mit *Caenorhabditis elegans*

Bei Exposition von *Caenorhabditis elegans* in 17 α -Ethinylestradiol konnten im Vergleich zu den Kontrollen in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,025 und 25 $\mu\text{g/l}$ 17 α -EE signifikant größere Körperlängen gemessen werden (Abb. 14). Bei einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/l}$ konnte kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen festgestellt werden.

Ebenfalls in den beiden niedrigen Konzentrationen (0,025 und 0,5 $\mu\text{g/l}$) ging im Vergleich zu den Kontrollen die Anzahl der Nachkommen pro Wurm von über 100 deutlich auf unter 70 zurück (Abb. 15). In den hochdosierten Versuchsreihen mit 25 und 250 $\mu\text{g/l}$ EE dagegen waren die Unterschiede zu den Kontrollen weniger deutlich ausgeprägt. Hier wurden 95, bzw. 84 Nachkommen pro Wurm gezählt.

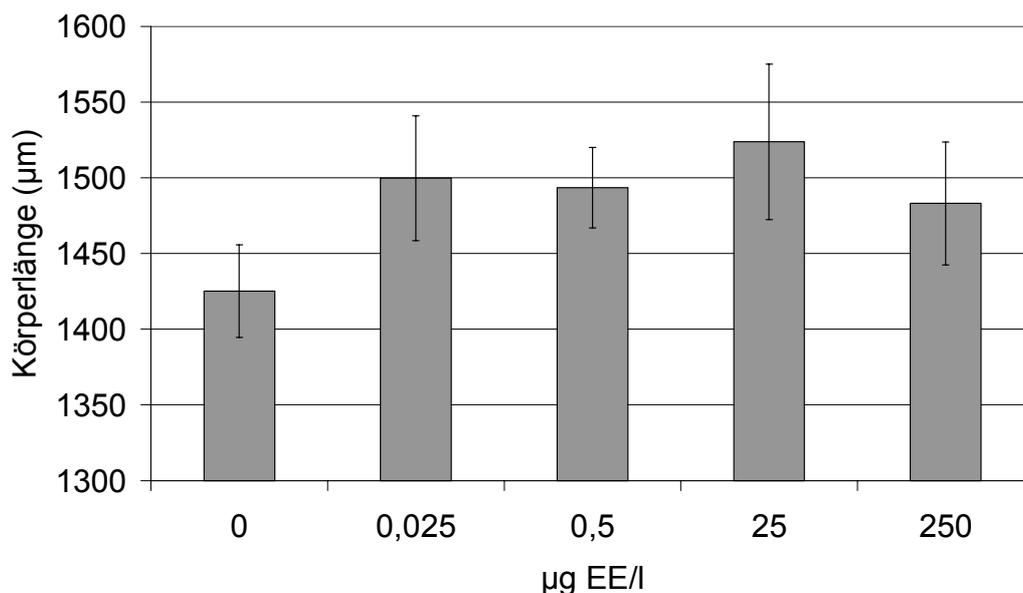


Abbildung 14: Gemessene Körperlängen von *Caenorhabditis elegans* nach Exposition mit verschiedenen Konzentrationen Ethinylestradiol.

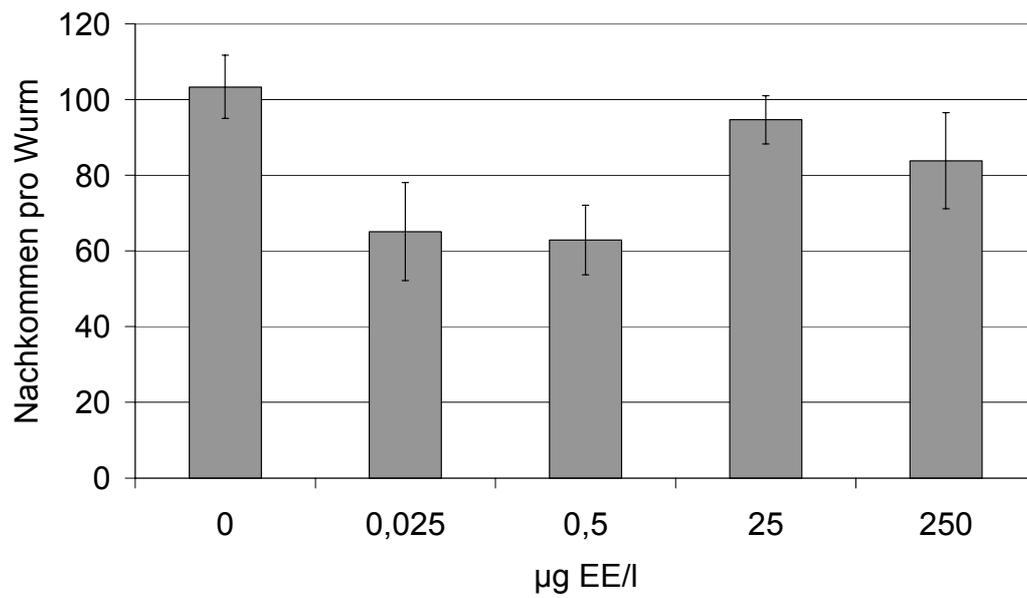


Abbildung 15: *C. elegans*: Anzahl der Nachkommen pro Individuum bei einer Ethinylestradiol Exposition bis 250 µg/l.

3.1.2. Wasseranalytik

3.1.2.1. 17α -EE-Konzentrationen in den belasteten Mikrokosmen A bis F (zeitlicher Verlauf)

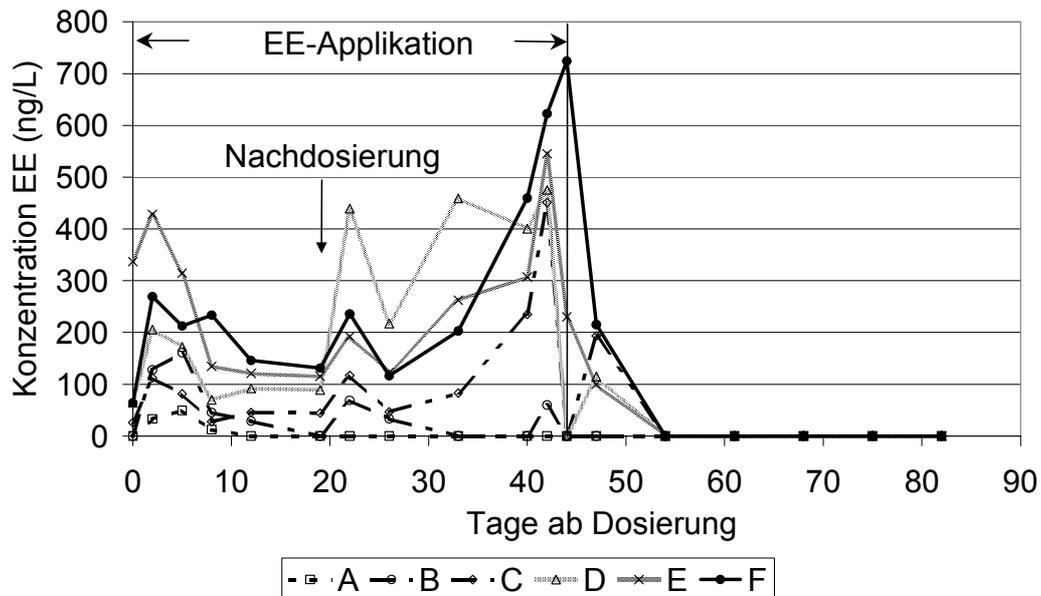


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Ethinylestradiolkonzentrationen in den Mikrokosmen A bis F.

Mit Einbringen der LDPE-Schläuche erfolgte ein rascher Anstieg der 17α -EE-Konzentrationen in allen Mikrokosmen (MK) mit vorläufigen Maximalwerten zwischen 50 ng/l (MK A) und 428 ng/l in MK E in den ersten 2, bzw. 5 Tagen (Abb. 16). Bis Versuchstag 19 fällt der 17α -EE-Gehalt dann aber in den Mikrokosmen C bis F, am deutlichsten in MK E, auf Werte zwischen 44 und 131 ng/l. In A und B kann an Tag 19 kein 17α -EE nachgewiesen werden. Durch das Einbringen weiterer Schläuche in die MK an Tag 22 ab Dosierungsbeginn zeigt sich in den Folgetagen ein erneut rascher Anstieg der 17α -EE-Konzentrationen in allen Mikrokosmen, außer A auf das Niveau bei Dosierungsbeginn (B: 68 ng/l bis F: 458 ng/l). Nach einem Rückgang der 17α -EE-Konzentrationen an Tag 26 steigen diese in den MK C bis F bis Tag 44 kontinuierlich an, wobei in F ein Maximalwert an von 724 ng/l erreicht wird. Nach Entnahme der Dosiereinrichtungen an Tag 42 fallen die 17α -EE-Konzentrationen ab Tag 44, bzw. 47 rasch ab. Ab Tag 54 sanken die Konzentrationen in den belasteten Mikrokosmen unter die Nachweisgrenze“ (3,5 ng/l).

3.1.2.2. 17 α -EE-Konzentrationen in den belasteten Mikrokosmen A bis F (Integrale über die Zeit)

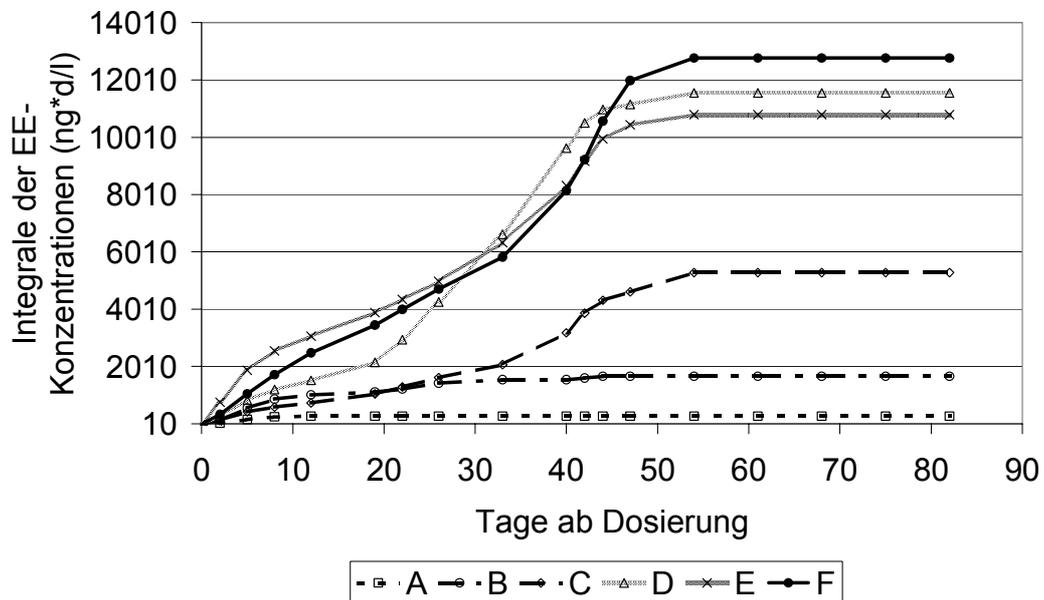


Abbildung 17: Integrale der Ethinylestradiolkonzentrationen im Versuchsjahr 2000 in den Mikrokosmen A bis F.

Betrachtet man die Integrale der 17 α -EE-Konzentrationen im Wasser (Abb. 17), lassen sich die Mikrokosmen in 5 Belastungsstufen einteilen: mit einer Gesamtbelastung von 274 ng*d/l war in MK A kaum 17 α -EE im Wasser vorhanden, MK B zeigte eine leichte Gesamtbelastung von 1664 ng*d/l. In MK C war ein Anstieg von Tag 0 bis 47 auf eine mittlere Belastung von 5289 ng*d/l zu verzeichnen und in den MK D, E und F stiegen die 17 α -EE-Konzentrationen bis Tag 54 auf Werte zwischen 11155 ng*d/l und 12772 ng*d/l. Als 5. Gruppe können die über den gesamten Versuchszeitraum unbelasteten Kontrollen betrachtet werden.

3.1.3. Chlorophyll-a Messungen mittels eines DF-Kinetikphotometers

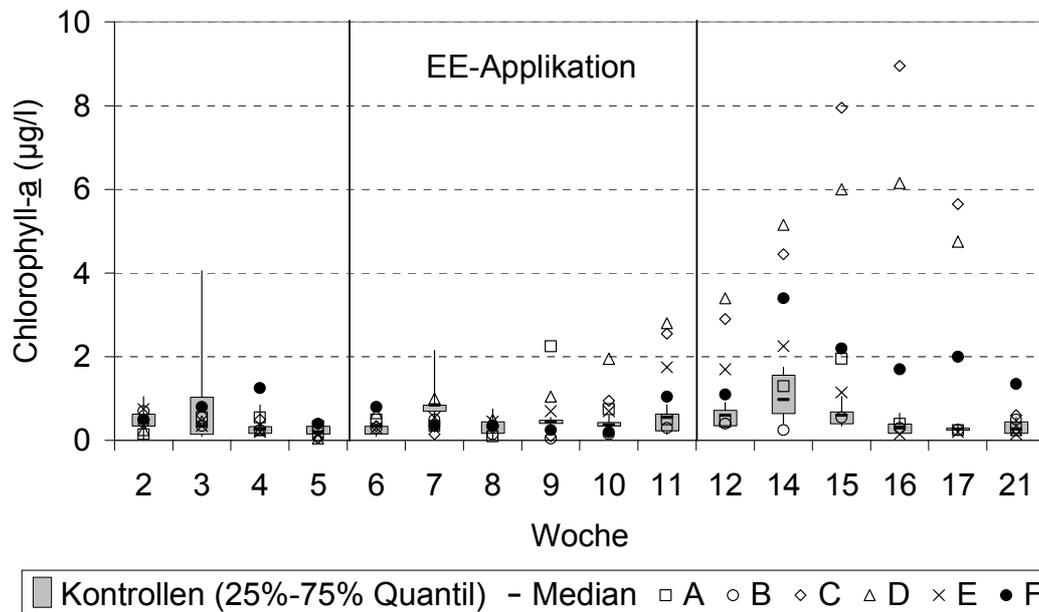


Abbildung 18: Chlorophyll-a-Werte in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

In den Kontrollen bleiben die gemessenen Chlorophyll-a-Werte während des gesamten Versuches unter 2 µg/l (Abb. 18). Nur in Woche 3 werden Maximalwerte in einigen Kontrollen bis 4 µg/l erreicht. Ab Mitte der Applikationsphase (Woche 9) konnten im Vergleich zu den Kontrollen in einigen belasteten MK deutlich höhere Werte gemessen werden. Am stärksten ist dies in C, D und F ausgeprägt.

3.1.4. Funktionelle Parameter

3.1.4.1. Wassertemperatur

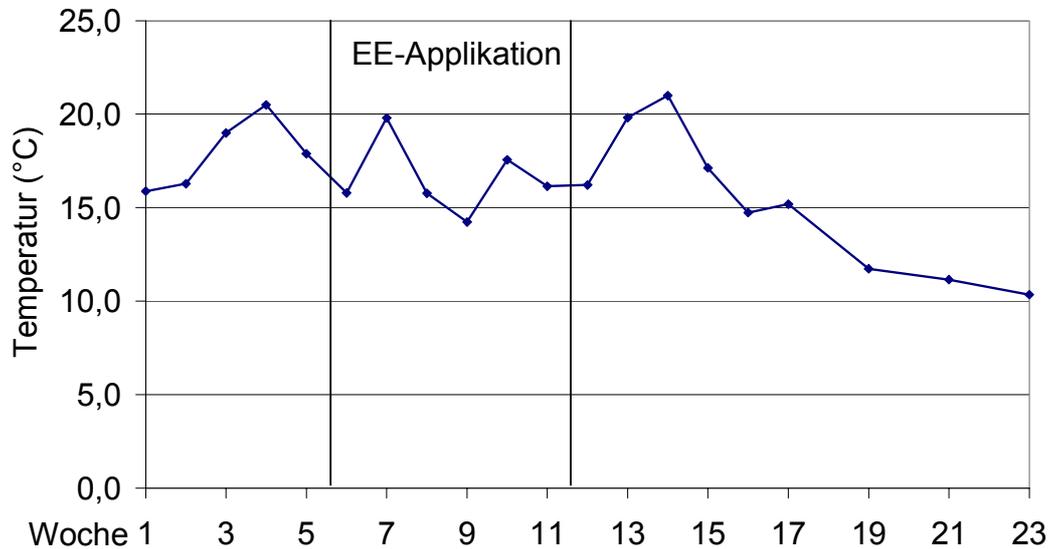


Abbildung 19: Durchschnittliche Wassertemperatur in den Mikrokosmen im Versuch mit 17 α -EE.

Berechnet wurde die Durchschnittstemperatur aus allen gemessenen Mikrokosmen pro Messtag (Abb. 19). Die Abweichung einzelner Mikrokosmen je Messtag vom Durchschnitt betrug maximal 0,5 °C. Von Woche 1 bis 14 schwankte die durchschnittliche Temperatur in den Mikrokosmen zwischen 14 °C und 22 °C. Ab der 14. Woche bis Versuchsende begannen die Wassertemperaturen in Folge einer jahreszeitlich typischen Abkühlung der Lufttemperaturen bis auf 10 °C abzusinken.

3.1.4.2. PH-Wert

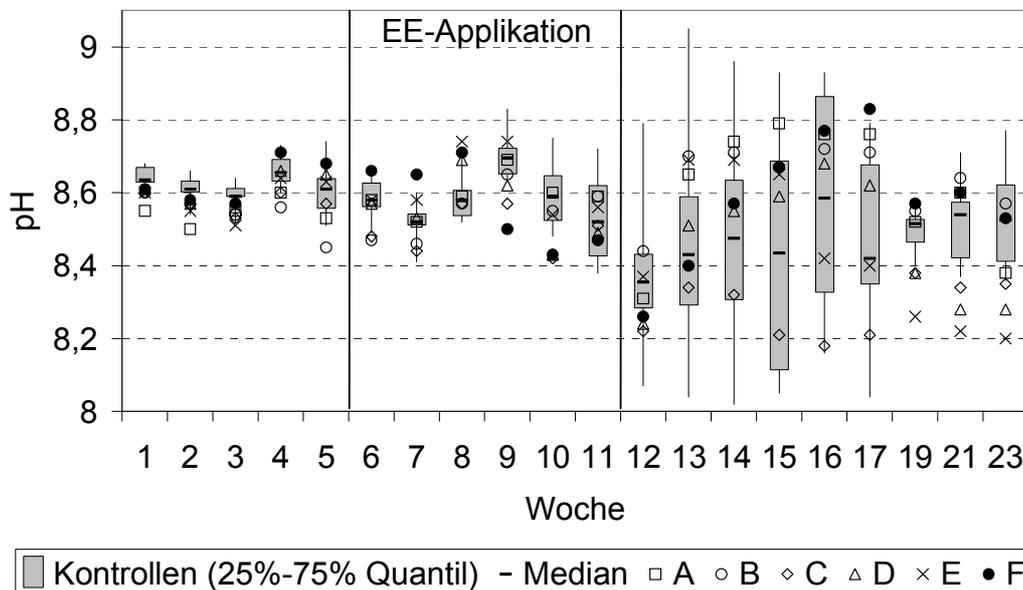


Abbildung 20: pH Wert Messungen in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

Der pH-Wert ist definiert als der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität in einer Lösung. Bis Woche 11 waren in allen Mikrokosmen pH-Werte zwischen 8,38 und 8,83 festzustellen (Abb. 20). Der Median der Kontrollen lag um 8,6. Ab der 11. Woche traten im Vergleich zwischen allen Mikrokosmen größere Abweichungen auf mit einem gemessenen Minimumwert von 8,02 in Woche 14 in MK K2 und einem Maximum von 9,05 in Woche 13 in MK K5. Die während des Versuchs in den belasteten Mikrokosmen gemessenen Werte blieben, von wenigen Ausnahmen abgesehen, stets im Bereich der Kontrollen und unterscheiden sich nicht signifikant von diesen ($p > 0,05$ (Kruskal Wallis)). Am 12.09.01 (entspricht Woche 17 der Mikrokosmenversuche) wurden am Ammersee an der Stelle, an der Wasser und Sediment für die Einrichtung der Mikrokosmen entnommen wurde, an 5 verschiedenen Stellen entsprechende funktionelle Parameter gemessen (Tab. 8 und Tab. 9). Die am Ammersee gemessenen pH-Werte sind für diesen Zeitpunkt mit den Werten in den Mikrokosmen vergleichbar.

Tabelle 8: Funktionelle Parameter des Ammersee bei Schondorf, gemessen am 12.09.01

	Wasser-temperatur	pH	Leitfähigkeit (µS/cm)	O ₂ Gehalt (mg/l)	O ₂ Sättigung (%)
1	14,8	8,18	366	7,24	76,2
2	14,7	8,35	363	7,74	81,0
3	14,4	8,36	364	7,73	81,1
4	14,6	8,36	363	7,73	81,1
5	14,4	8,39	363	7,72	80,1

Tabelle 9: Nährstoffsituation des Ammersees, gemessen am 12.09.01 an einer meso-oligotrophen Litoralstelle.

	Ammonium (mg/l)	Nitrat (mg/l)	Ortho-Phosphat (mg/l)
1	< 0,04	1,0	0,039
2	< 0,04	1,1	0,049
3	< 0,04	1,5	0,042
4	< 0,04	1,6	0,044
5	< 0,04	1,5	0,059

3.1.4.3. Leitfähigkeit

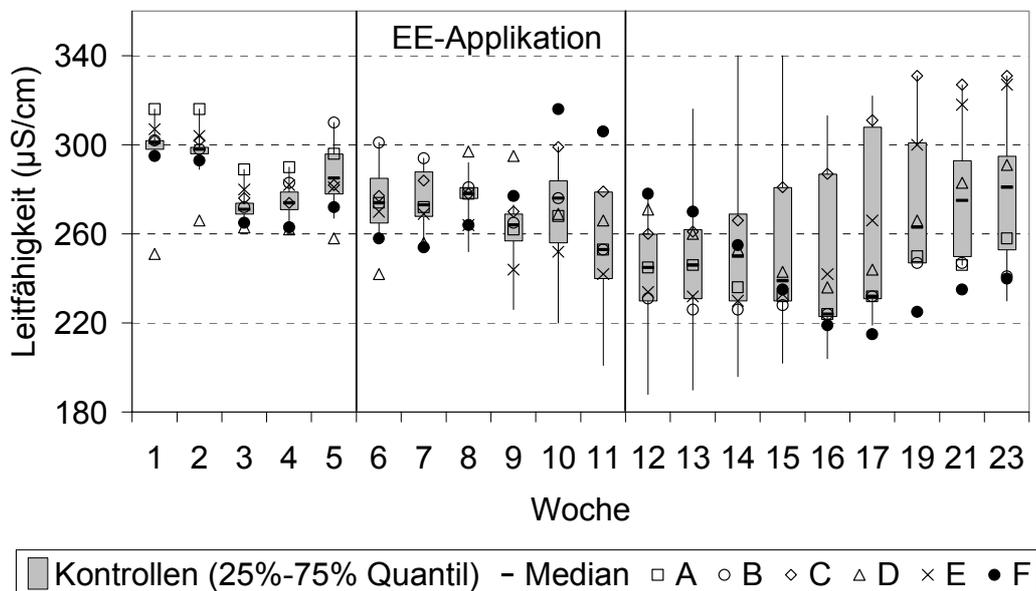


Abbildung 21: Leitfähigkeitswerte in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

Die spezifische elektrische Leitfähigkeit ist ein Maß für die Fähigkeit einer Lösung den elektrischen Strom zu leiten. Da dieser in Lösungen durch Kationen und Anionen getragen wird, kann die Leitfähigkeit auch als Maß für die im Wasser gelösten Ionen betrachtet werden. In Gewässern mit kalkreichen Sedimenten kann darüber hinaus die Leitfähigkeit Anhaltspunkte zur Konzentration der Kalziumionen und damit zur Wasserhärte geben (MELZER 1976).

In allen Mikrokosmen wurden Werte zwischen 188 und 340 $\mu\text{S}/\text{cm}$ gemessen (Abb. 21). Der Maximalwert von 340 $\mu\text{S}/\text{cm}$ wurde in der Kontrolle K2 in den Wochen 14 und 15 erreicht, der Minimalwert von 188 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in MK 5 in Woche 12. Insgesamt war ein leichter Rückgang der Leitfähigkeit in den Wochen 11 bis 17, bzw. 23 zu erkennen. Gegen Ende des Versuches stiegen in den meisten Mikrokosmen die Leitfähigkeitswerte wieder leicht an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den belasteten Mikrokosmen und den Kontrollen war nicht feststellbar ($p > 0,05$). Vergleichswerte vom Ammersee am 12.09.01 (Woche 17) lagen mit Werten um 360 $\mu\text{S}/\text{cm}$ über den der Mikrokosmen (Maximum 322 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in MK 6, Minimum: 215 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in MK F).

3.1.4.4. Sauerstoffsättigung und -gehalt

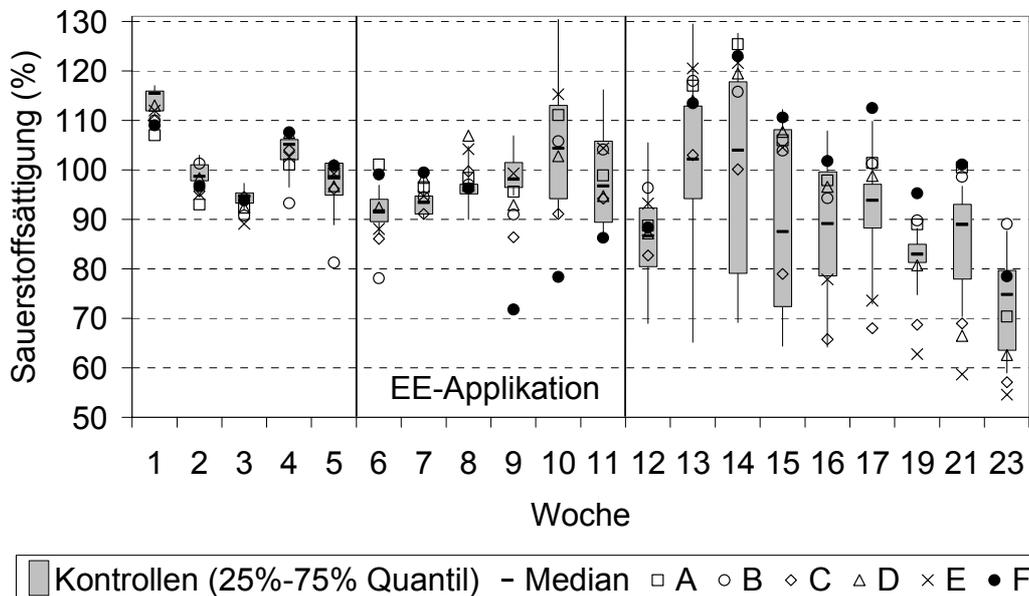


Abbildung 22: Gemessene Sauerstoffsättigung in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

In den Kontrollen und den belasteten Mikrokosmen A, C, D und E betrug die Sättigung des Wassers mit Sauerstoff bis Woche 11 über 70%, meist sogar über 90% (Abb. 22). Ab Woche 10 begannen die Kontrollen im internen Vergleich auseinander zu driften. Die belasteten Mikrokosmen lagen im oberen Bereich der Kontrollen. Ab der 14. Versuchswoche kam es in allen Mikrokosmen zu einem tendenziellen Rückgang der Sauerstoffsättigung bis zum Versuchsende in Woche 23. Maximalwerte in den Kontrollen von über 130 % Sauerstoffsättigung wurden in den Wochen 10 und 13 erreicht. In den belasteten Mikrokosmen A, B, D, E und F konnten in den Wochen 13 und 14 Maximalwerte zwischen 114 und 125% gemessen werden. In C betrug zu dieser Zeit die Sauerstoffsättigung ca. 100%. In Woche 23 wurde in MK E ein Minimalwert von 55% gemessen, alle anderen Mikrokosmen waren bis zu 90% mit Sauerstoff gesättigt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und belasteten Mikrokosmen waren nicht feststellbar ($p > 0,05$). Messungen an einer oligotrophen Litoralstelle des Ammersees (Tabelle 1) ergaben Sauerstoffgehalte von 7,24 bis 7,74 mg/l, das entspricht einer Sättigung von 76% bis 81%.

3.1.4.5. Ammonium

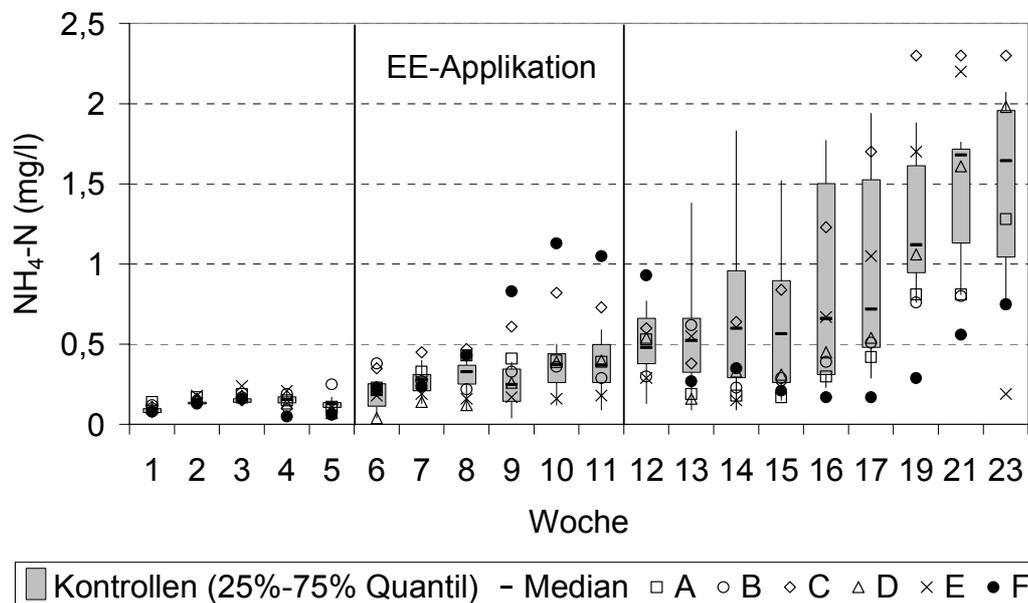


Abbildung 23: Ammoniumkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

Ammonium wird im Wasser bei der Zersetzung organischer Reste frei und dient zusammen mit Nitrat als Stickstofflieferant für photoautotrophe Pflanzen. So ist eine direkte Ammoniumaufnahme vielen Algen (TAKAHASHI und SAISO 1981) und höheren Wasserpflanzen (SCHWOERBEL und TILLMANN, 1977; MELZER und EXLER, 1982) möglich. Nitrat ist in nicht mit organischen Abwässern belasteten Gewässern der wichtigste Stickstofflieferant für Pflanzen. Wird in sehr produktiven Gewässern Nitrat vollständig aufgezehrt, übernimmt Ammonium die Stickstoffversorgung.

Mit Ausnahme der MK C und F folgen die belasteten MK dem Verlauf der Kontrollen: Bis Woche 11 wurden Werte unter 0,5 mg/l gemessen, wobei sich die einzelnen Mikrokosmen nur wenig voneinander unterschieden (Abb. 23). Ab Woche 11 erfolgte, beginnend in einigen Kontrollen, ein Anstieg auf 0,8 bis 2 mg/l Ammonium. In den MK C und F wurde ein Anstieg bereits ab Woche 8 bis 10 auf Werte bis 0,82 bzw. 1,13 mg/l gemessen, nach einem Absinken des Ammoniumgehaltes in MK C bis Woche 13 auf das Niveau der Kontrollen, stieg dieser ab Woche 14 wieder stark an und erreichte ab Woche 17 Werte über 2 mg/l. Dagegen war in MK F nach dem

Erreichen des Maximalwertes in Woche 10 ein Ammoniumrückgang bis Woche 13 auf Werte unter 0,3 mg/l zu verzeichnen. In den Wochen 16 bis 23 wurden in F im Vergleich zu den Kontrollen nur geringere Mengen an Ammonium im Wasser gemessen, wobei ab Woche 21 ein leichter Anstieg und somit eine Annäherung an die Kontrollen zu beobachten war. Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen belasteten Mikrokosmen und Kontrollen ($p > 0,05$) festgestellt werden.

3.1.4.6. Nitrat

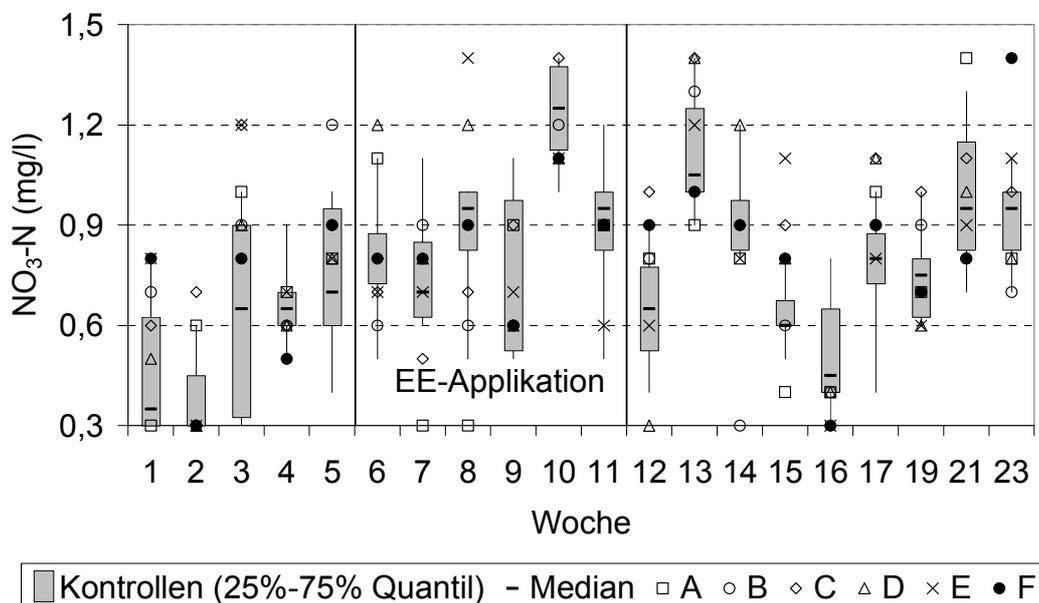


Abbildung 24: Nitratkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

Die Nitratkonzentrationen in den Mikrokosmen schwankten sowohl in den Kontrollen als auch in allen belasteten Mikrokosmen zwischen der Nachweisgrenze von 0,3 mg/l und 1,4 mg/l (Abb. 24). Die Werte der Mikrokosmen A bis F lagen meist im Bereich der Kontrollen. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und belasteten Mikrokosmen waren nicht festzustellen ($p > 0,05$).

3.1.4.7. Ortho-Phosphat

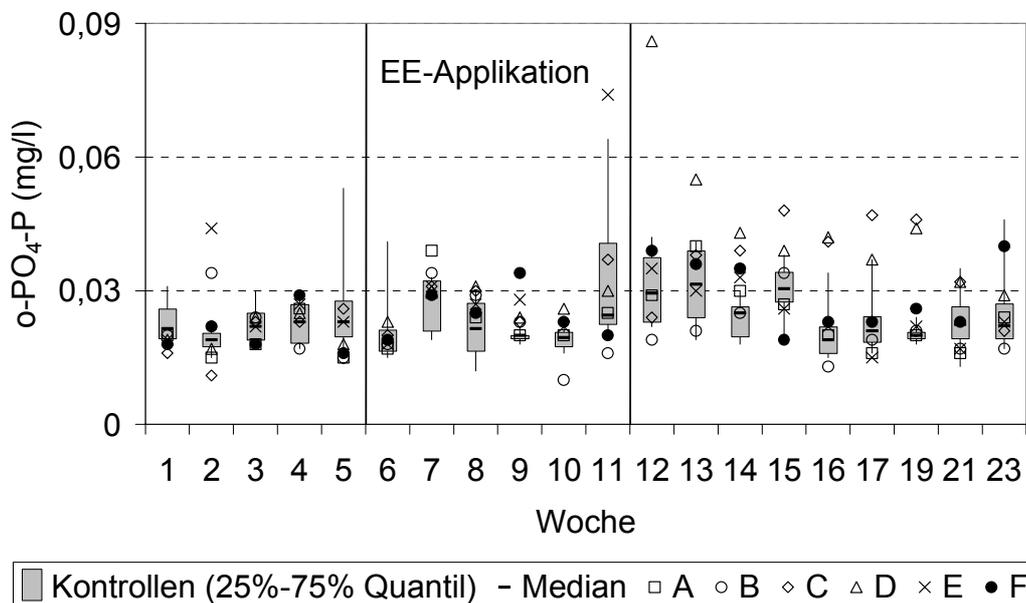


Abbildung 25: Ortho-Phosphatkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Ethinylestradiol 2000. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

Der natürliche anorganische Phosphor in Gewässern stammt aus Niederschlägen, partikulärem atmosphärischem Eintrag und aus verschiedenen phosphathaltigen Gesteinen. In nicht anthropogen belasteten Gewässern werden Konzentrationen von nur wenigen µg/l gemessen. Phosphor ist deshalb oft essentieller Nährstoff für Pflanzen und beeinflusst in großer Masse die trophische Situation eines Oberflächengewässers (SCHWOERBEL 1992).

Das in den Mikrokosmen gemessene Ortho-Phosphat (anorganisch gelöstes Phosphat) lag in Konzentrationsbereichen zwischen 0,01 und 0,086 mg/l (Abb. 25). Nach Ende der Applikationsphase waren in den Mikrokosmen C (Maximum: 0,048 mg/l) und D (Maximum: 0,086 mg/l) ab Woche 12 etwas höhere Werte im Vergleich zu den Kontrollen (zwischen 0,02 bis 0,046 mg/l) feststellbar. Trotzdem konnten für jeden einzelnen Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen den belasteten Mikrokosmen und den Kontrollen gezeigt werden ($p > 0,05$).

3.1.5. Zooplankton

3.1.5.1. Anzahl verschiedener Taxa

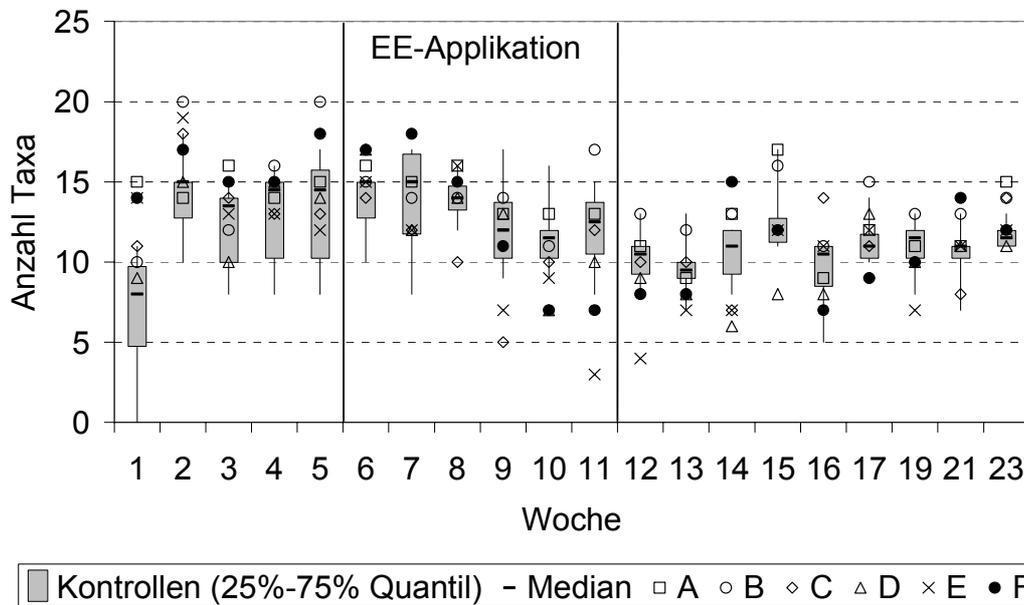


Abbildung 26: Anzahl verschiedener Taxa in den Kontrollen und mit 17 α -EE applizierten Mikrokosmen.

Von Woche 1 bis 2 war in allen Mikrokosmen ein Anstieg der Anzahl verschiedener Taxa zu verzeichnen (Abb. 26). Ab Woche 2 bis Woche 7 wurden in den Kontrollen mindestens 8 bis maximal 18 verschiedene Taxa gezählt. Die belasteten Mikrokosmen lagen im Bereich der Kontrollen oder darüber. Ab Woche 8 konnte in allen Mikrokosmen tendenziell ein leichter Rückgang der Taxazahlen beobachtet werden. Der Median der Kontrollen lag bei 10 bis 12 Taxa. In einigen belasteten Mikrokosmen konnten in diesem Zeitraum geringere Taxazahlen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden, wobei E und F die deutlichsten Abweichungen zeigen. Mit Ende der Applikation konnten sich in diesen beiden Mikrokosmen wieder eine den Kontrollen vergleichbare Anzahl an Taxa etablieren.

3.1.5.2. Diversität und Evenness

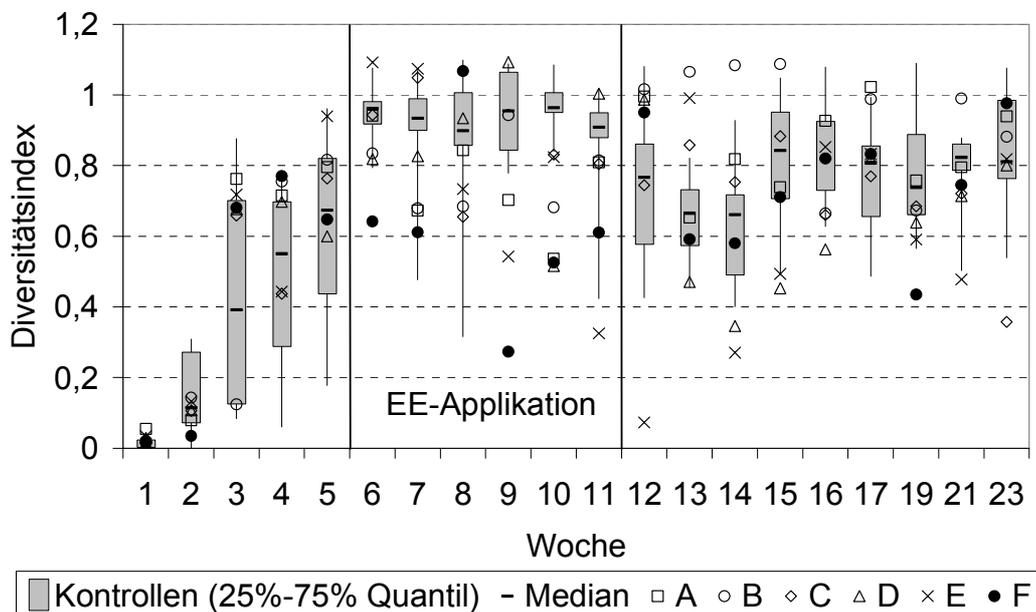


Abbildung 27: Diversitätsindex nach Shannon und Weaver auf Gruppenniveau.

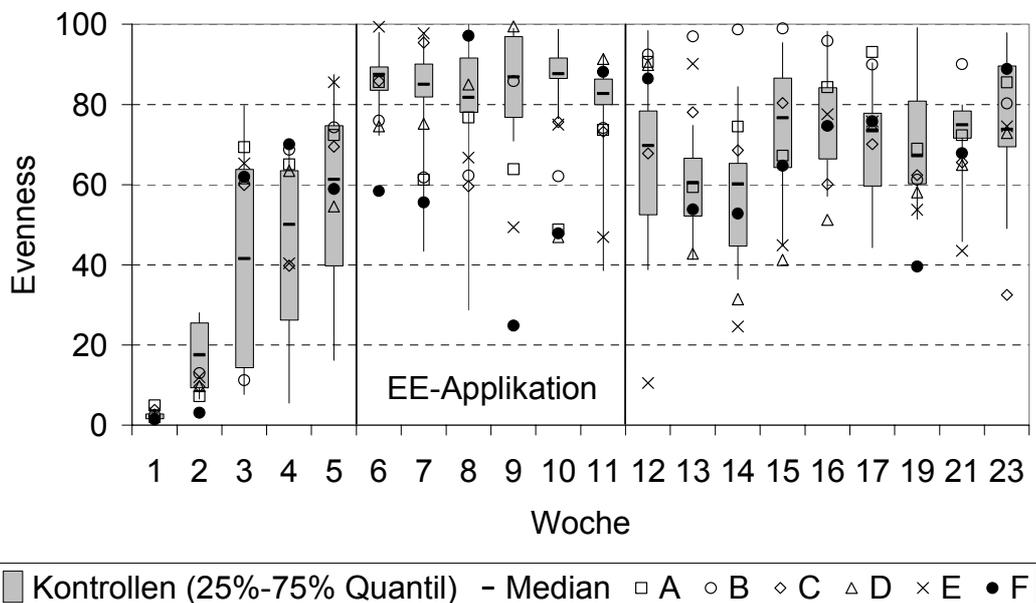


Abbildung 28: Gleichmäßigkeit (Evenness) für den Vergleich der Gruppen Cladocera, Copepoda und Rotatoria.

In allen Mikrokosmen war ein Anstieg der Diversität bis zur Versuchswoche 6 zu verzeichnen (Abb. 27). Mit Beginn der Applikationsphase zeigten vor allem die belasteten Mikrokosmen E und F im Vergleich zu den Kontrollen eine deutlich

geringere Strukturvielfalt über einen mehrwöchigen Zeitraum hinweg (E: Woche 9 bis 12, 14, 15 und 21; F: Woche 6, 9 und 10, 19). Geringere Diversitätsindizes waren vereinzelt auch in A (Woche 9), B (Woche 10), C (Woche 23), und D (Woche 10 und 14 bis 16) zu beobachten. Deutlich stärker strukturiert zeigte sich MK B nach Ende der Dosierung in den Wochen 13 bis 15 und W 21.

Die Darstellung der Evenness zeigt eine Zunahme der Gleichmäßigkeit in allen Mikrokosmen bis Woche 6 (Abb. 28). Während der Applikation mit 17 α -EE lag die mittlere Evenness der Kontrollen stets über 80%. MK F zeigte während dieser Versuchsphase in den Wochen 6, 7, 9 und 10 im Vergleich zu den Kontrollen durchschnittlich niedrigere Evenness-Werte von weniger als 60%. Ab Mitte der Dosierungsphase war auch in MK E ein Rückgang der strukturbezogenen Gleichmäßigkeit feststellbar, die sich in einer Evenness bis unter 20% in Woche 12 widerspiegelte.

3.1.5.3. Populationsdynamik

3.1.5.3.1. Totale Abundanzen der Cladocera

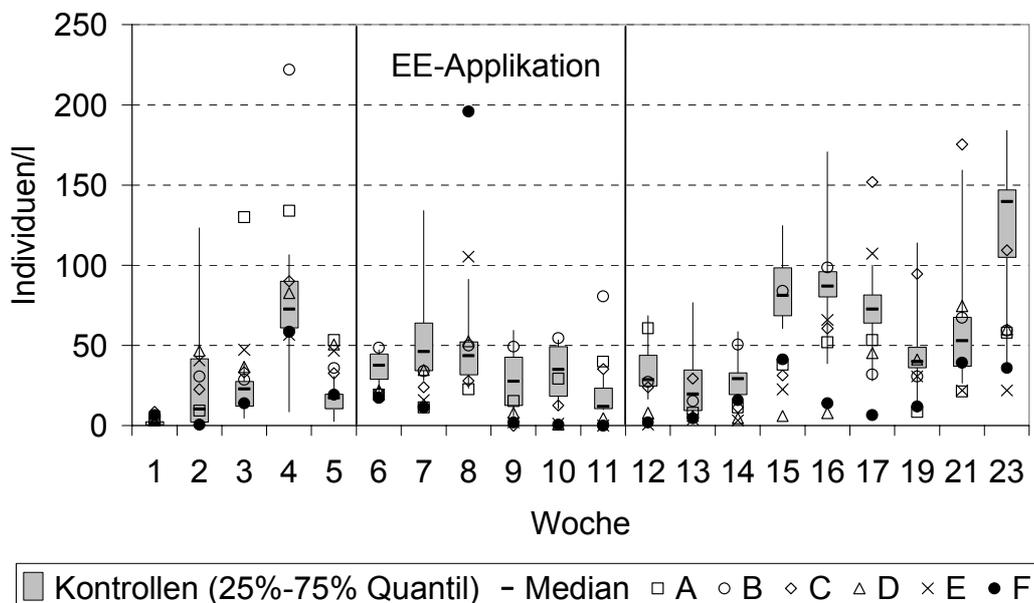


Abbildung 29: Totale Abundanzen der Cladocera im Versuch mit Ethinylestradiol.

3.1.5.3.2. Totale Abundanzen der Copepoda

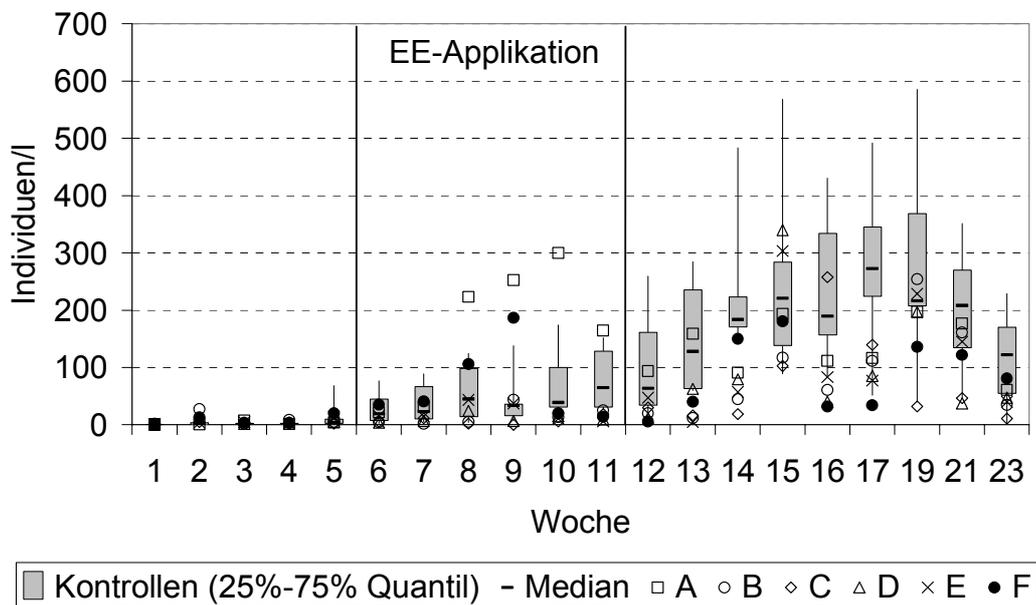


Abbildung 30: Totale Abundanzen der Copepoda im Versuch mit Ethinylestradiol.

3.1.5.3.3. Totale Abundanzen der Rotatoria

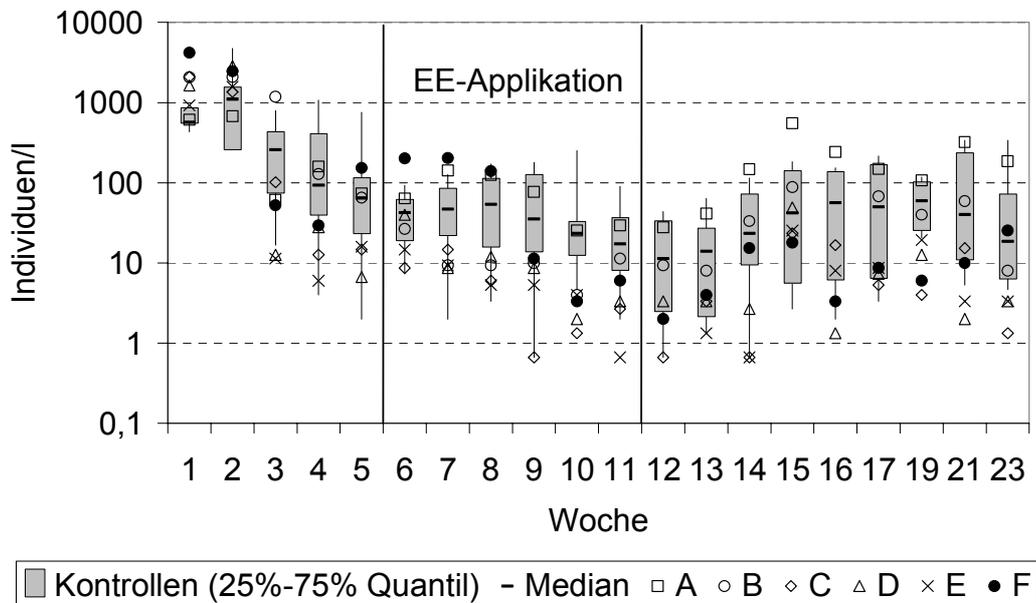


Abbildung 31: Totale Abundanzen der Rotatoria im Versuch mit Ethinylestradiol. Logarithmische Skala.

In den Kontrollmikrokosmen wurden ab Woche 2 bis zur Versuchswoche 14 im Schnitt zwischen 20 und 70 Cladocera pro Liter gezählt (Abb. 29). Ab Woche 15 zeigten sich etwas höhere Abundanzen von durchschnittlich etwa 40 bis 140 Ind/l. Ein absolutes Maximum an Cladocera in den Kontrollen wurde in Woche 23 mit 184 Cladocera pro Liter gezählt, wogegen in den Wochen 1 und 2 in einigen Kontrollen das Auftreten von Cladocera völlig ausblieb. Bis zum Beginn der Applikationsphase lagen die belasteten Mikrokosmen im Bereich der Kontrollen. Ab Woche 7 wurden jedoch in einigen belasteten Mikrokosmen vergleichsweise geringere Abundanzen festgestellt. Besonders auffällig war dies in D, E und F in den Wochen 9 bis 15, bzw. 17 zu beobachten.

Obwohl vom Entwicklungsverlauf unterschiedlich, zeigte sich für die Copepoda ein ähnlicher Effekt in den letzten Versuchswochen (Abb. 30). Bis Woche 5 war der Verlauf der Populationsentwicklung in den belasteten Mikrokosmen und den Kontrollen ähnlich. Der Median der absoluten Copepoda- Abundanzen in Kontrollen und belasteten Mikrokosmen lag bei weniger als 4 Ind/l, bzw. weniger als 8 Ind/l. Während dann in den Kontrollen die Populationen von Woche 6 ab auf bis zu 585 Ind/l in Woche 19 anwuchsen, war den Copepoda-Gesellschaften in den belasteten Mikrokosmen eine derartige Entwicklung nicht möglich. Die Medianwerte der Abundanzen sanken anschließend wieder ab auf ca. 120 Ind/l zu Versuchsende. Die belasteten Mikrokosmen lagen bis Ende der Applikationsphase im Bereich der Kontrollen, wobei in Mikrokosmos A in den Wochen 8 bis 10 im Vergleich zu den Kontrollen Copepoda in deutlich höheren Abundanzen gefunden werden konnten. Ab dem Ende der Dosierungsphase mit Ethinylestradiol, vor allem in den Wochen 13 und 14, 16 und 17, erreichten in den belasteten Mikrokosmen die absoluten Abundanzen das dem selben Zeitpunkt entsprechende Minimum der Kontrollen nicht. In allen belasteten Mikrokosmen waren geringere Abundanzen zu einzelnen Zeitpunkten im Vergleich zu den Kontrollen feststellbar.

Ein vermehrtes Auftreten der Rotatoria wurde in allen Mikrokosmen hauptsächlich in der Vorlaufphase beobachtet (Abb 31), mit einem Maximum von 4735 Ind/l in Woche 2. Bereits ab Woche 2 war in den Kontrollen ein Rückgang von Medianwerten über 1100 Individuen pro Liter auf unter 100 Ind/l zu sehen. Mit Beginn der Applikation bis Ende des Versuches blieben die ermittelten medianen Abundanzen unter 60 Ind/l. Ähnlich verhalten sich auch die belasteten Mikrokosmen. Ab Woche 2 war ein

deutlicher Rückgang von bis zu 4203 (MK F W1) auf unter 200 Ind/l bei Dosierungsbeginn erkennbar. Die Abundanzen der Rotatoria der belasteten Mikrokosmen lagen dann im Bereich der Kontrollen, lediglich in MK A waren in den Wochen 15 und 16 und in MK F in den Wochen 6 und 7 deutlich höhere Abundanzen (MK A: 552, bzw. 242 Ind/l; MK F: 201, bzw. 204 Ind/l) im Vergleich zu allen anderen Mikrokosmen gezählt worden.

3.1.5.4. PRC und Species Score der Gruppen Cladocera, Copepoda und Rotatoria

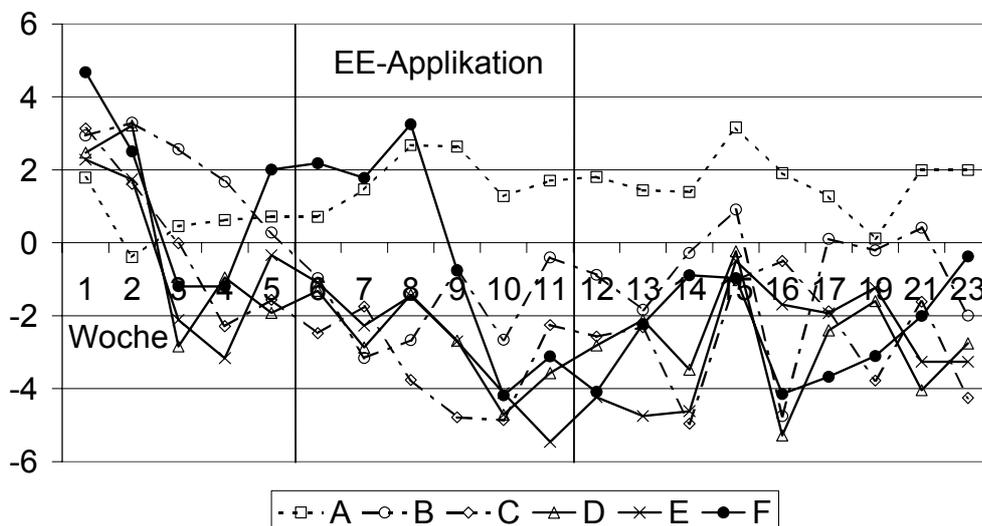


Abbildung 32: PRC berechnet über den gesamten Versuchszeitraum aus den absoluten Abundanzen der Gruppen der Cladocera, Copepoda und Rotatoria im Versuch mit 17 α -EE.

Tabelle 10: Species Scores für das Zooplankton im Versuch mit 17 α -EE, eingeteilt in drei Gruppen (Cladocera, Copepoda, Rotatoria).

GRUPPE	SPECIES SCORE
Cladocera	-0,2139
Copepoda	-0,3317
Rotatoria	-0,564

3.1.5.5. PRC und Species Score der einzelnen Taxa

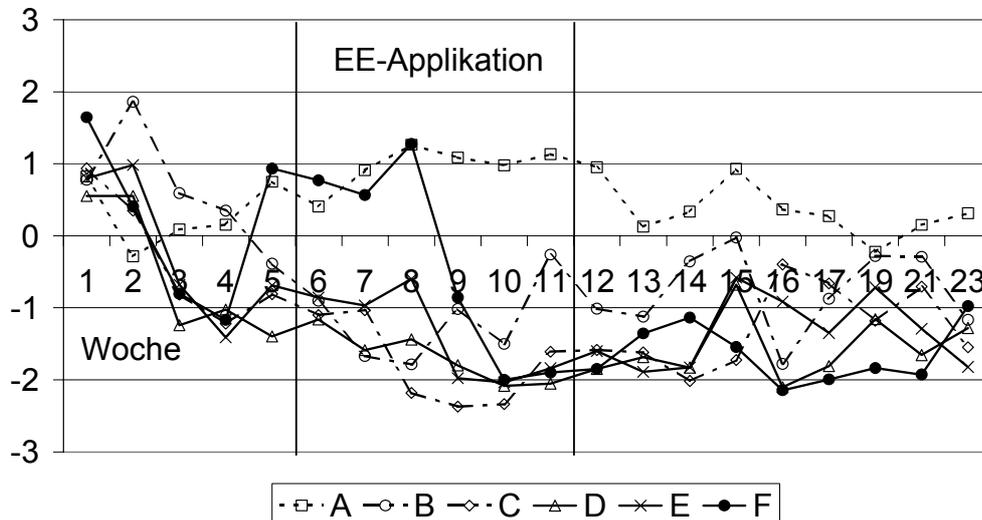


Abbildung 33: PRC der einzelnen Taxa (totale Abundanzen). Mittelwerte der Kontrollen als Nulllinie. Belastung der Mikrokosmen mit 17 α -EE.

Betrachtet man sich die Prinzipal Response Curves (PRC) (Abb. 32 und Abb. 33), lässt sich sowohl bei der Darstellung für die Gruppen als auch bei der Berechnung der cdt Werte für einzelne Taxa, die Tendenz zu einem Abweichen vor allem der höher dosierten Mikrokosmen C bis F ab Mitte der Dosierungsphase von den Kontrollen erkennen. Ausgehend von den entsprechenden Species scores (Tab. 10 und Tab. 11) waren hierfür Vertreter aus allen drei Gruppen verantwortlich, am meisten jedoch *Keratella quadrata*.

Tabelle 11: Species Scores für die einzelnen Taxa im Versuch mit Ethinylestradiol

TAXON	SPECIES SCORE	GRUPPE	TAXON	SPECIES SCORE	GRUPPE
Acroperus harpae	-0,041	Cladocera	Keratella cochlearis	-0,27	Rotatoria
Ascomorpha ecaudis	0,0035	Rotatoria	Keratella quadrata	-1,07	Rotatoria
Ascomorpha saltans	-0,10	Rotatoria	Lecane distyla	-0,039	Rotatoria
Asplanchna spec	-0,11	Rotatoria	Lecane monostyla	-0,17	Rotatoria
Bosmina longirostris	0,015	Cladocera	Lepadella patella	-0,102	Rotatoria
Brachyonus spec	-0,018	Rotatoria	Macrocyclops albidus	-0,013	Copepoda
Canthocamptus staphylinus	-0,0067	Copepoda	Monommata longiseta	0,0088	Rotatoria
Cephalodella spec	-0,019	Rotatoria	Nauplia	-0,66	Copepoda
Chydorus sphaericus	-0,41	Cladocera	Notholca spec	-0,027	Rotatoria
Colurella spec	-0,040	Rotatoria	Notommata spec	-0,01	Rotatoria
Copepodit	-0,63	Copepoda	Pleosoma	-0,0085	Rotatoria
Cyclopoide	-0,0069	Copepoda	Polyarthra spec	-0,70	Rotatoria
Daphnieneier	-0,20	Cladocera	Polyphemus pediculus	0,62	Cladocera
Daphnia longispina	-0,69	Cladocera	Proales spec	0,013	Rotatoria
Diaphanosoma brachyurum	-0,16	Cladocera	Rotaria	0,034	Rotatoria
Dicranophorus spec	0,0031	Rotatoria	Scapholebris mucronata	0,19	Cladocera
Eucyclops serrulatus	-0,017	Copepoda	Sida crystallina	0,00	Cladocera
Eudiaptomus gracilis	-0,11	Copepoda	Dauereier	0,0039	Cladocera
Filinia spec	0,0008	Rotatoria	Synchaeta pectinata	-0,48	Rotatoria
Gastropus stylifer	0,0065	Rotatoria	Testudinella	-0,0024	Rotatoria
Habrotrocha spec	0,011	Rotatoria	Trichocerca spec	-0,031	Rotatoria
Hexarthra spec	0,003	Rotatoria	Trichotria pocillum	-0,0026	Rotatoria
Juvenile Cladocera	-0,092	Cladocera	Wierzejskiella	0,0015	Rotatoria
Kellicottia longispina	-0,035	Rotatoria			

3.1.5.5.1. Biovolumina der verschiedenen Ernährungstypen Räuber – Algenfresser – Sonstige

Aufgrund Ernährungsgewohnheiten der Organismen wurden die Zooplankter in drei verschiedene Kategorien eingeteilt.

- Räuber: in dieser Gruppe werden Zooplankter zusammengefasst, die aktiv andere Zooplankter als Beute greifen.
- Algen- und Allesfresser: Weidegänger oder Organismen, die Algen und Nahrungspartikel aus dem Wasser filtrieren.
- Sonstige: Organismen, deren Fressgewohnheiten nicht oder nur unzureichend bekannt sind oder für die eine Zuordnung in die anderen Kategorien aufgrund nicht ausreichender Identifikation (Bestimmung auf Artniveau) nicht möglich war.

Für die einzelnen Kategorien wurden die Summe der Biovolumina errechnet und nachfolgend dargestellt. Die Zuordnung der einzelnen Taxa ist im Anhang (Tab. 4) des Skriptums zu finden.

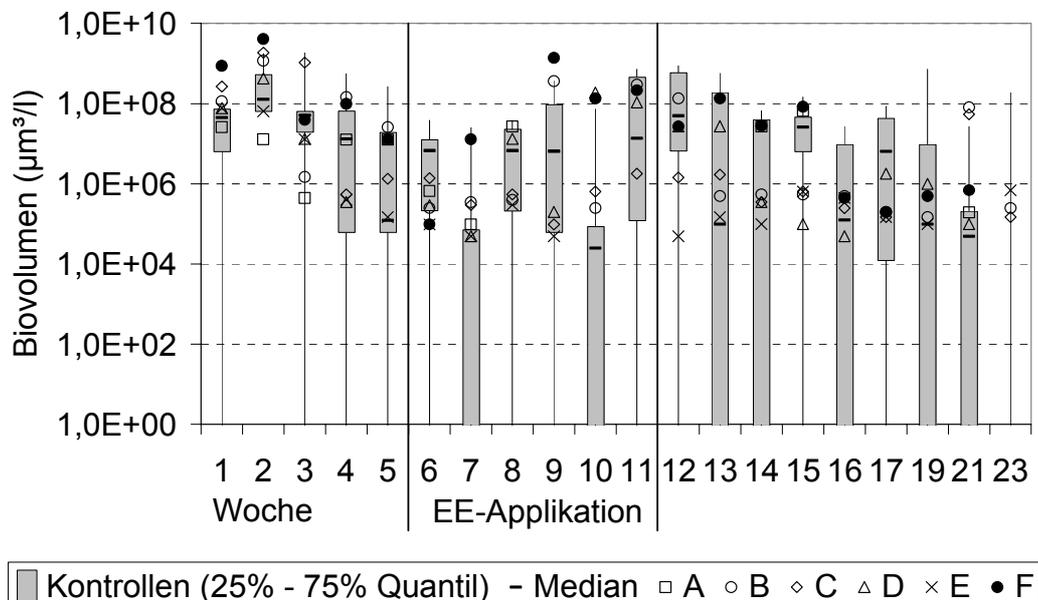


Abbildung 34: Logarithmische Darstellung der Biovolumina der Räuber und Omnivoren in den Mikrokosmen aufgetragen gegen die Zeit.

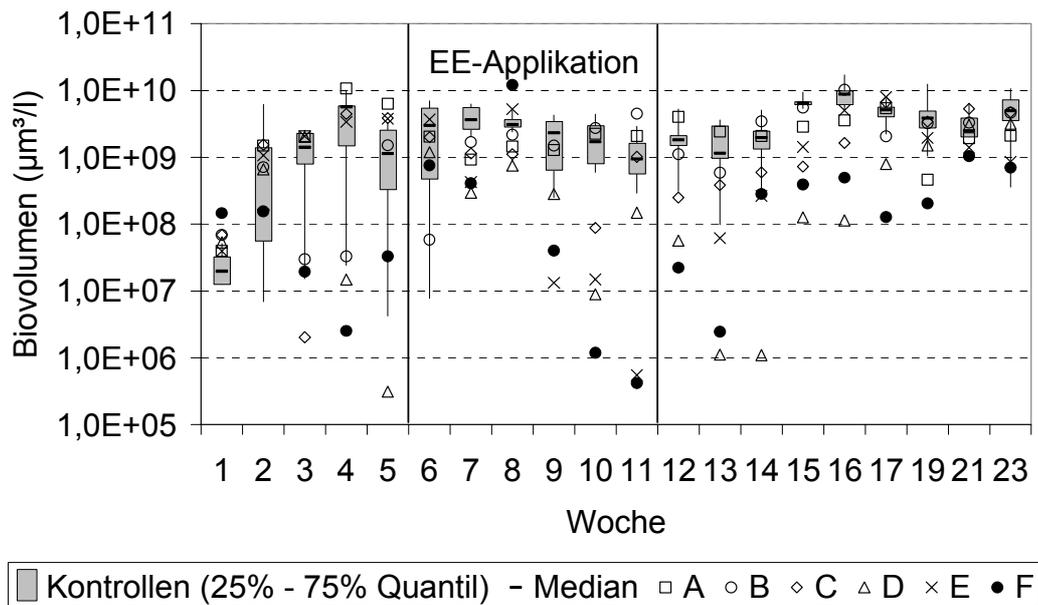


Abbildung 35: Logarithmische Darstellung der Biovolumina der Algenfresser in den Mikrokosmen aufgetragen gegen die Zeit

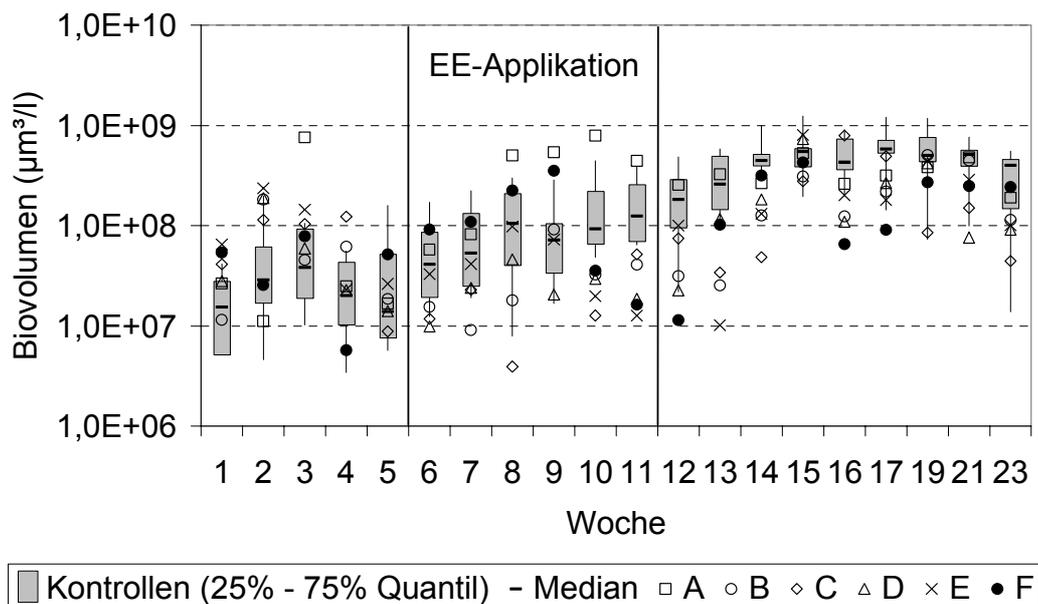


Abbildung 36: Logarithmische Darstellung der Biovolumina der Zooplankter („Sonstige“), die weder der Gruppe der Räuber und Allesfresser, noch eindeutig den Phytoplanktonkonsumenten zugeordnet werden konnten gegen die Zeit.

Im Vergleich zu den Kontrollen waren in den ersten beiden Versuchswochen in den Mikrokosmen B, C, und F Räuber/ Omnivore in höheren Biovolumina vertreten (Abb. 34). Die Kontrollen sind in drei Gruppen, die sich jeweils ähnlich verhalten, einteilbar. In MK K1, K2, K4, und K6 war alternierend das Auftreten und Verschwinden der Räuber/Omnivore in mehr oder weniger stärker ausgeprägtem Rhythmus zu

beobachten. In MK K5 dagegen bildeten während der ersten 14 Wochen Räuber einen permanenten Bestandteil der ökologischen Gemeinschaft und in MK 3 traten nur in den ersten und den letzten 6 Wochen, mit Unterbrechungen in Woche 3 und 4, bzw. 19 und 23, Räuber auf. Von Woche 7 bis 14 fehlten diese ganz. Vergleichbar hierzu verhielt sich auch MK A. Hier ließen sich in den ersten Wochen und im letzten Drittel des Versuches in den Wochen 14, 15 und 21 Räuber/ Omnivore finden, in den Wochen 9 bis 13 verschwanden diese allerdings komplett. In Mikrokosmos B waren über den gesamten Versuchszeitraum Räuber/ Omnivore vorhanden, in C, D, E und F fanden sich mit wenigen Ausnahmen (Woche 19, bzw. 23, bzw. 10, 11 und 21, bzw. 8 und 23) permanent räuberisch/ omnivor lebende Zooplankter.

Das Biovolumen der „Algenfresser“ nahm in den Kontrollen bis Woche 4 zu und blieb dann auf einem Niveau zwischen $E+08$ und $E+10 \mu\text{m}^3/\text{l}$ (Abb. 35). MK A folgte dem Verlauf der Kontrollen und war mit ihnen vergleichbar. Während sich für MK B im ersten Versuchsdrittel (Wochen 3, 4 und 6) im Vergleich zum Median der Kontrollen geringere Biovolumina berechnen lassen, gilt dies für C und D vor allem nach Beginn der Applikation (Woche 7 bis 16, bzw. Woche 7 bis 19). Am deutlichsten unterschieden sich MK E und F von den Kontrollen. In MK E nahm das Biovolumen der Algenfresser ab W 9 stark ab. In Woche 12 verschwand diese sogar komplett. Von Woche 13 an stieg die Biovolumen in E allerdings wieder an und erreichte in Woche 17 den Kontrollen vergleichbare Werte. MK F zeigt bereits ab Woche 3 verglichen mit den Kontrollen reduzierte Biovolumina, fortdauernd während des gesamten Versuchszeitraumes mit Ausnahme von Woche 8.

Sonstige Zooplankter, die weder den Räuber/Omnivoren noch den Algenkonsumenten eindeutig zuzuweisen waren, zeigten bis Woche 6 annähernd gleichbleibende Biovolumina in allen Mikrokosmen (Abb 36). Mit wenigen Ausnahmen (MK A, Woche 3, MK B und C, Woche 4) lagen die belasteten MK im Bereich der Kontrollen mit leicht höheren Biovoluminawerten als der Median der Kontrollen. Ab Woche 7 ist ein Anstieg zu verzeichnen mit einem Maximum in Woche 17. anschließend gingen die Biovolumina bis zum Ende des Versuches wieder zurück.

In MK F und MK A waren in den Wochen 1 bis 9, bzw. in Woche 3 und Woche 8 bis 11 verglichen mit dem Median der Kontrollen höhere Biovolumina zu finden, wobei sich ab Woche 10 in MK F eine Veränderung der Biovolumina unter diesen

abzeichnet. In MK A galt dies ab Woche 14. MK B, C, D und E zeigten spätestens ab Woche 6 bis 17 meist deutlich geringere Biovolumina als die Medianwerte der Kontrollen.

3.1.6. Phytoplankton

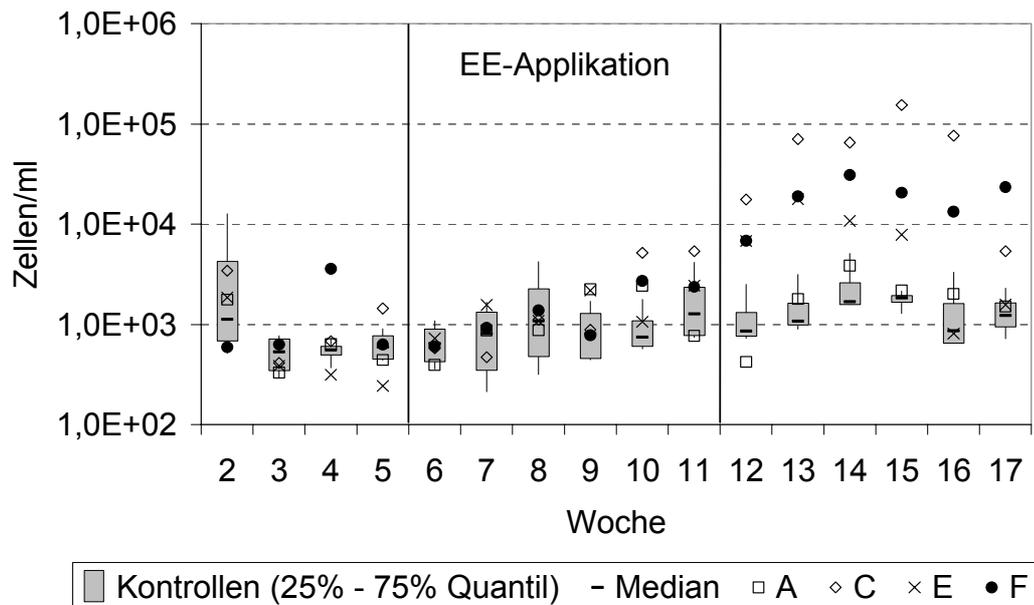


Abbildung 37: Gesamtzelldichte des Phytoplanktons in den Kontrollen K1 bis K4 und den mit 17α -EE belasteten Mikrokosmen A, C, E und F.

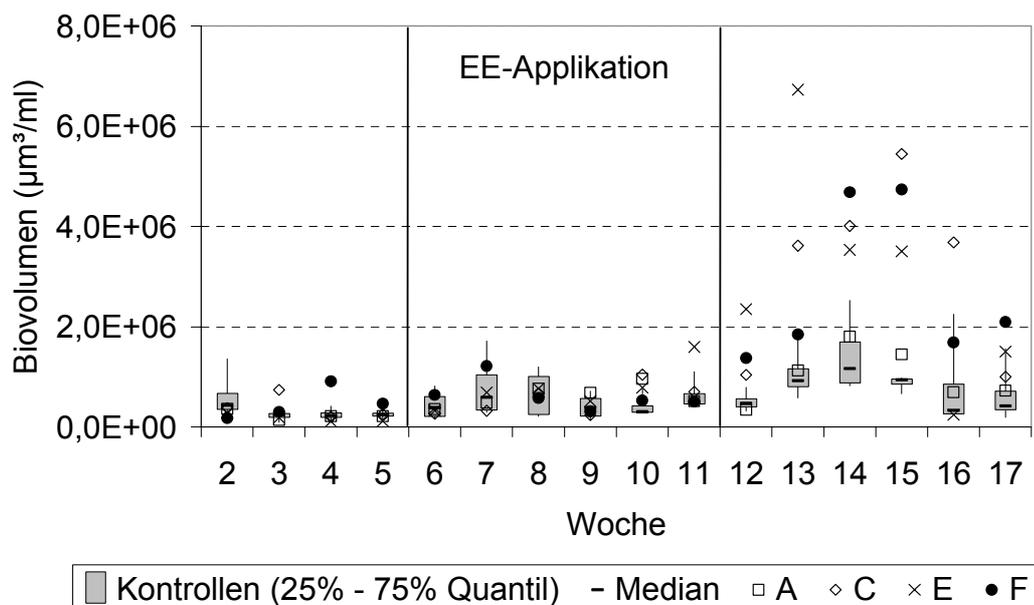


Abbildung 38: Biovolumen des Phytoplanktons pro Wasservolumen in den Kontrollen K1 bis K4 und den mit 17α -EE belasteten Mikrokosmen A, C, E und F.

In den Kontrollen wurden zwischen 10^2 und 10^4 Zellen/ml gezählt (Abb 37). Bis Woche 11 lagen die belasteten MK A, C, E und F in einem vergleichbaren Bereich. Ähnliches galt für die errechneten Biovolumina. Bis Woche 17 betrug in den Kontrollen, bzw. bis Woche 11 in allen belasteten MK, die Algenbiomasse weniger als $2 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3/\text{l}$ (Abb. 38). Die belasteten MK C, E und F unterschieden sich sowohl bezüglich der Gesamtzellzahl der Algenorganismen, als auch bezüglich des Biovolumens vor allem nach der Dosierung der Mikrokosmen mit 17α -EE von den Kontrollen. Es wurden Zellzahlen zwischen 10^4 bis über 10^5 und Biovolumina zwischen $3 \cdot 10^6$ und $7 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3/\text{l}$ ermittelt.

3.2. Mikrokosmenversuch mit Trenbolon (2001)

3.2.1. Vorversuche mit *Caenorhabditis. elegans*

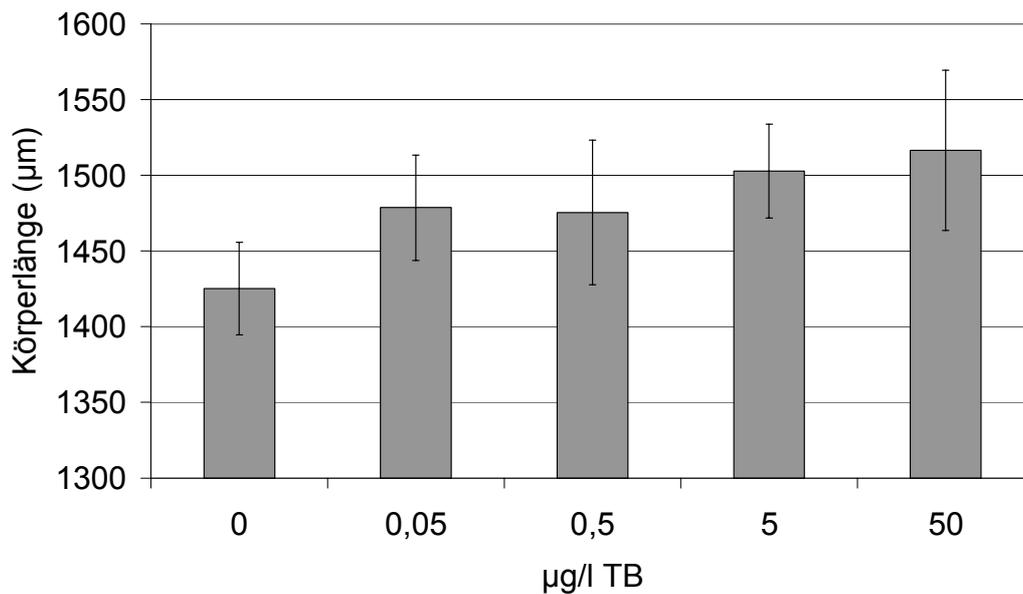


Abbildung 39: Gemessene Körperlängen von *Caenorhabditis elegans* nach Exposition mit verschiedenen Konzentrationen von Trenbolon.

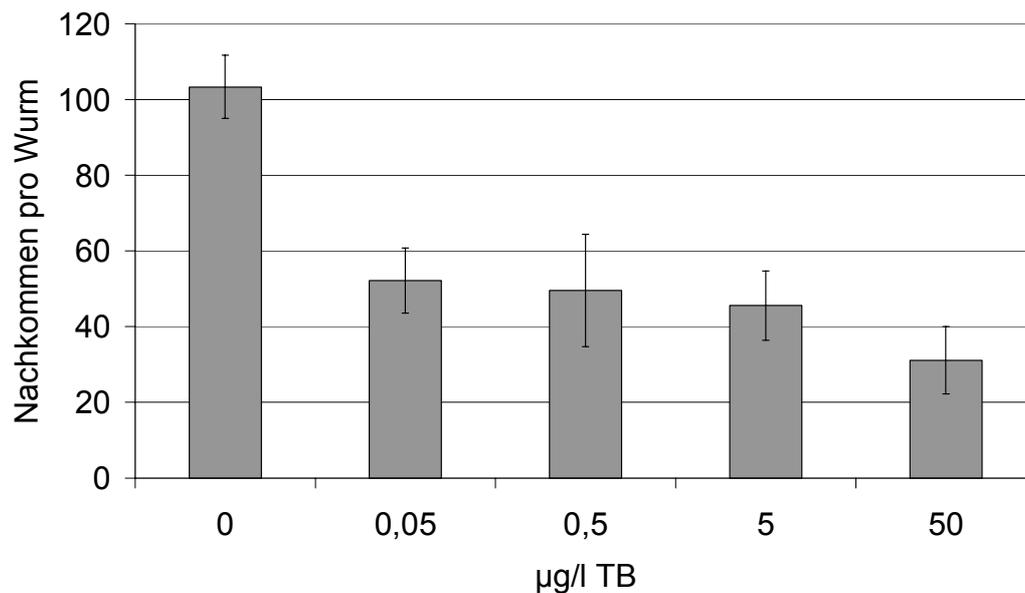


Abbildung 40: *C. elegans*: Anzahl der Nachkommen pro Individuum bei einer Trenbolon Exposition bis 50 µg/l.

Sowohl Wachstum (Abb. 39) als auch Reproduktion (Abb. 40) der Nematoda scheinen durch Trenbolon beeinflusst zu werden. Die Körperlänge der Tiere nahm mit steigender TB Konzentration zu. Signifikant größere Tiere als in den Kontrollen ließen sich ab einer Trenbolon-Konzentration von 5 µg/l finden. Ein deutlich geringeres Reproduktionsvermögen wurde bereits bei einer niedrigen Trenbolonapplikation beobachtet. Wurden in den Kontrollen im Schnitt mehr als 100 Juvenile pro Individuum gezählt, konnten in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,05 und 5 µg/l TB nur noch zwischen 45 und 52 Nachkommen pro Nematode festgestellt werden. Bei einer Dosierung mit 50 µg/l sanken diese sogar auf 31 Juvenile pro Elterntier.

3.2.2. Chlorophyll-a-Messung mittels durchflusszytometrischer Methoden

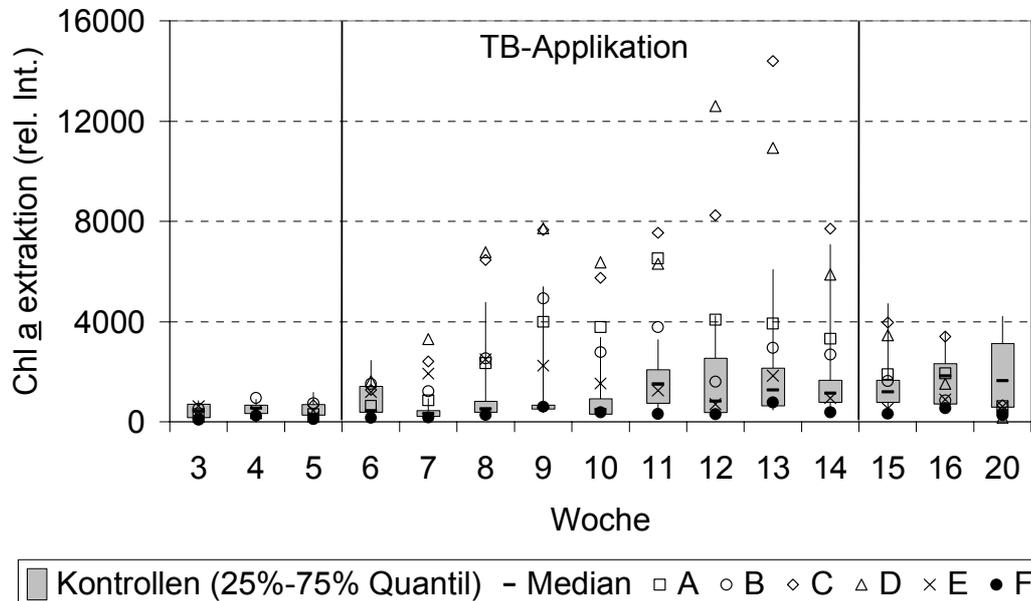


Abbildung 41: Chlorophyll-a-Werte in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

Bis Dosierungsbeginn waren die Chlorophyll-a-Werte aller Mikrokosmen im selben Bereich (Abb. 41). Mit Beginn der Dosierungsphase konnte in den Kontrollen ein Anstieg der Chlorophyll-a-Konzentrationen mit einem Maximum in Woche 14 beobachten werden. Danach sanken diese wieder ab. Ähnliche Verläufe traten auch in den belasteten MK B und E auf. In MK F wurden während der gesamten Versuchsdauer nur relativ geringe Konzentrationen gemessen. In den MK A, C und D ließen sich während der Applikation mit Trenbolon im Vergleich zu den Kontrollen höhere Chlorophyll-a-Gehalte feststellen. Maximalwerte traten in den Wochen 12 und 13 auf, anschließend sanken die Chlorophyll-a-Gehalte wieder ab. Ab Woche 15, nachdem die Dosiereinrichtungen aus den belasteten Mikrokosmen entfernt worden waren, zeigte sich in diesen den Kontrollen ähnliche Chlorophyll-a-Konzentrationen.

3.2.3. Funktionelle Parameter

3.2.3.1. Wassertemperatur

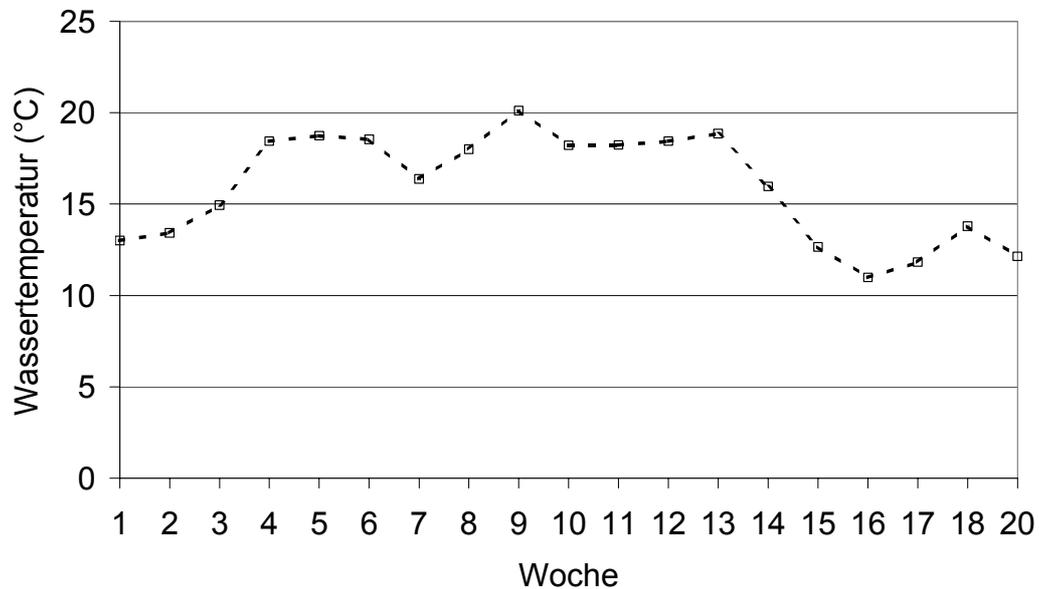


Abbildung 42: Durchschnittliche Wassertemperatur in den Mikrokosmen im Versuch mit TB.

Berechnet wurde die durchschnittliche Wassertemperatur pro Probenahmezeitpunkt aus allen Mikrokosmen (Abb. 42). Abweichungen von diesem Mittel betragen maximal 0,5 °C für alle Mikrokosmen und zu allen Messzeitpunkten. Bis Woche 4 stieg die Wassertemperatur von unter 15 °C auf Werte zwischen 15 °C und 20 °C an. Ab Woche 15 fielen diese dann wieder unter 15 °C. Die maximale Wassertemperatur von 20 °C wurde in Woche 9, die minimale von 11 °C in Woche 16 gemessen.

3.2.3.2. pH-Wert

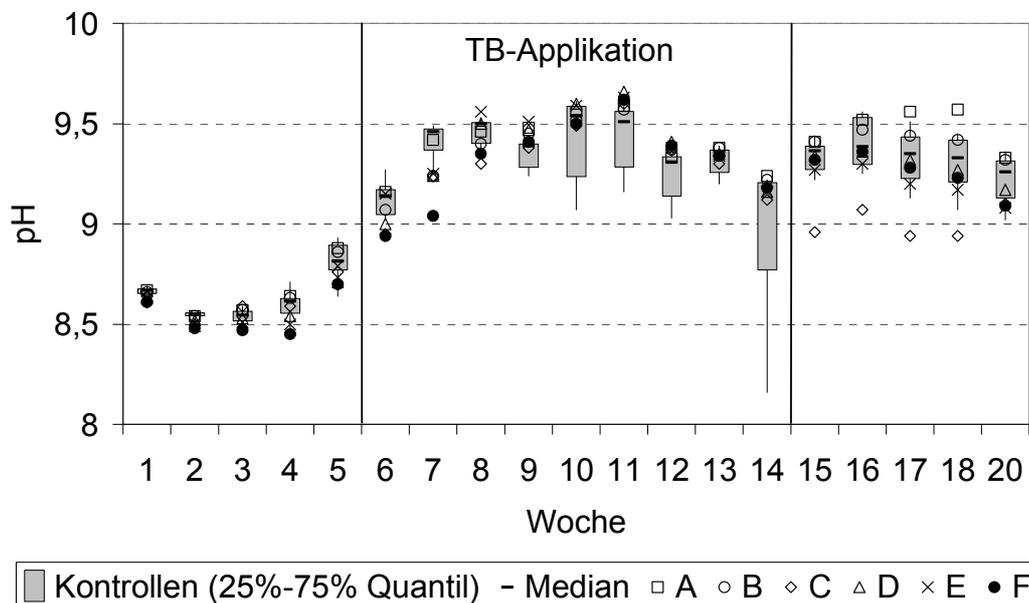


Abbildung 43: pH Wert Messungen in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

Der pH Wert lag in den Mikrokosmen zu Beginn des Versuches bei 8,5 (Abb. 43). Ab Woche 5 erfolgte bis Woche 8 ein Anstieg auf pH Werte zwischen 9 und 9,5. In diesem Bereich blieben, abgesehen von einigen Ausreißerwerten, in allen Mikrokosmen die entsprechenden PH Werte. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und belasteten Mikrokosmen konnte nicht festgestellt werden ($p > 0,05$).

3.2.3.3. Leitfähigkeit

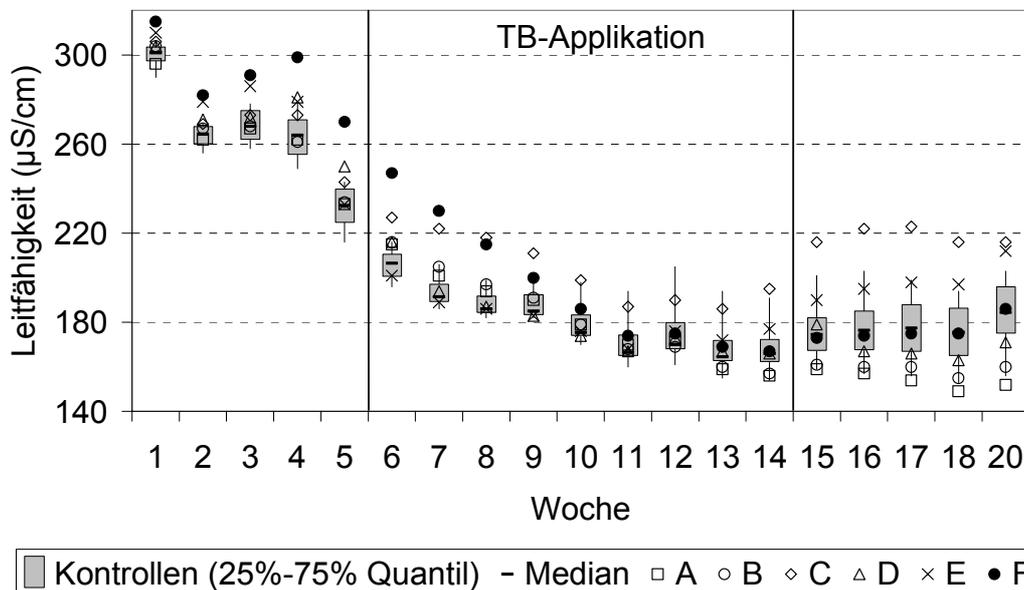


Abbildung 44: Leitfähigkeitswerte in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

Während der ersten Hälfte des Versuches war ein kontinuierliches Absinken der Leitfähigkeitswerte in allen Mikrokosmen von ca. 300 µS/cm auf Werte zwischen 150 µS/cm und 200 µS/cm zu beobachten (Abb. 44). Bis Ende des Versuches wurden sowohl in Kontrollen und belasteten Mikrokosmen Werte in diesem Bereich gemessen. Lediglich in MK C konnten ab Woche 15 leicht höhere Leitfähigkeitswerte von ca. 220 µS/cm festgestellt werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und den belasteten Mikrokosmen konnten vor allem zu Beginn des Versuches bestätigt werden ($p=0,006$), wobei sich die belasteten Mikrokosmen ab Hälfte der Applikation den Werten der Kontrollen annäherten.

3.2.3.4. Sauerstoffsättigung und -gehalt

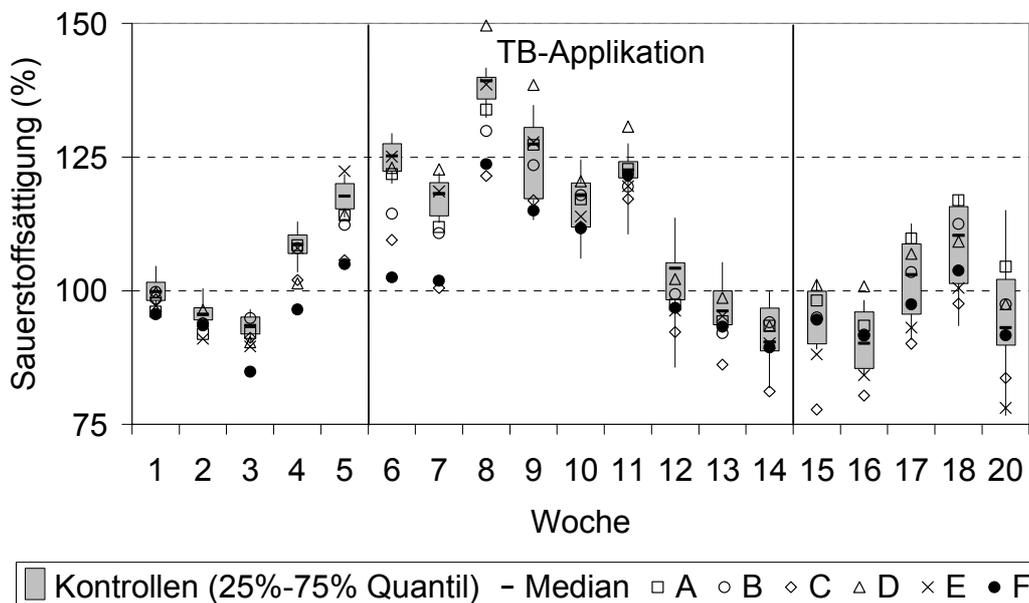


Abbildung 45: Gemessene Sauerstoffsättigung in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

Der Sauerstoffgehalt stieg zunächst in allen Mikrokosmen bis Woche 8 auf Werte zwischen 11 und 13 mg/l an, was einer Sättigung von 121%, bzw 150% (Abb. 45) entspricht. Bis Woche 14 sank dieser dann auf Werte zwischen 8 und 9 mg/l (80% - 100% Sättigung). Nach einem erneuten Anstieg in den Wochen 15 bis 18 auf Werte zwischen 9 (93%) und 11 mg/l (117% Sättigung), zeichnete sich bis zum Ende des Versuches in Woche 20 ein weiterer leichter Rückgang ab. Die Mikrokosmen B, C und F wiesen ab Versuchsstart bis Woche 8, bzw. 9, geringere Sauerstoff-Gehalte im Vergleich zu den Kontrollen auf. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und belasteten Mikrokosmen ließen sich deshalb vor allem in den ersten Wochen des Versuches feststellen ($p < 0,001$). Ab Woche 9 liegen alle belasteten Mikrokosmen im Bereich der Kontrollen. In MK C wurden in den Wochen 13 bis 16 erneut ein leicht geringerer Gehalt an Sauerstoff, mit einem Minimalwert von 7,5 mg/l, gemessen. Die Sättigung an Sauerstoff betrug in den Mikrokosmen stets deutlich über 75%.

3.2.3.5. Ammonium

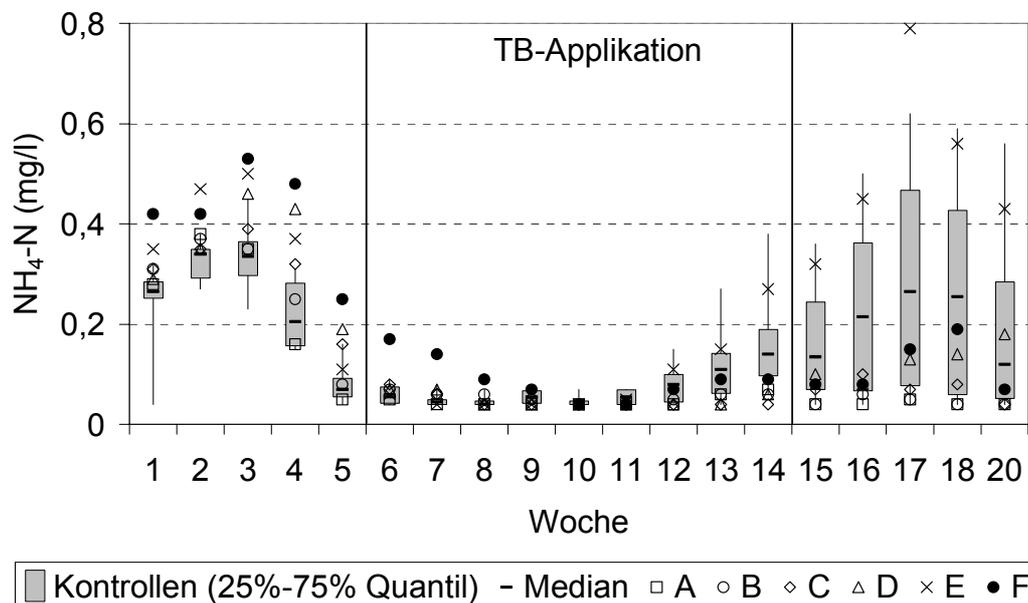


Abbildung 46: Ammoniumkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

In den ersten Versuchswochen lag der Gehalt an Ammonium in allen Mikrokosmen zwischen 0,2 und 0,6 mg/l (Abb. 46). Ab Woche 4 beginnen diese auf Werte, die zwischen der Nachweisgrenze und weniger 0,1 mg/l gemessen wurden, zu sinken. Erst ab Woche 12 ist in einigen Mikrokosmen ein erneuter Anstieg auf einen Ammonium-Gehalt von über 0,6 mg/l zu finden. Die belasteten Mikrokosmen lagen im Bereich der Kontrollen. Keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

3.2.3.6. Ortho-Phosphat

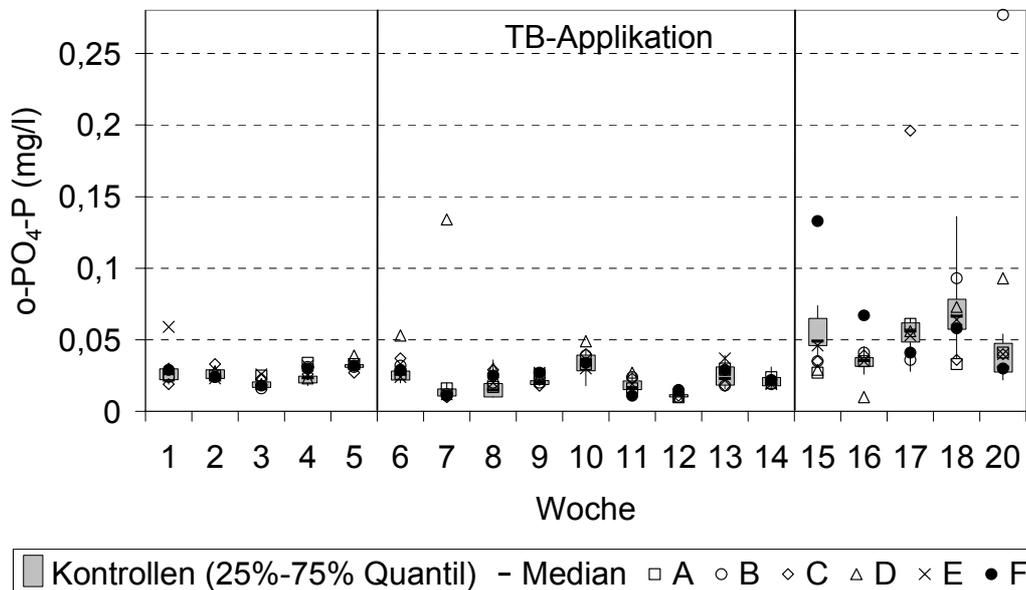


Abbildung 47: Ortho-Phosphatkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

Bis Ende der Applikationsphase in Woche 14 waren in allen Mikrokosmen, von einzelnen Extremwerten abgesehen, Ortho-Phosphatgehalte von weniger als 0,05 mg/l festzustellen (Abb. 47). Ab Woche 15 war tendenziell ein leichter Anstieg des Phosphats im Wasser bis zu maximal 0,15 mg/l bemerkbar. Nur in MK B konnte an zwei Versuchstagen Werte über 0,15 gemessen werden. Der Maximalwert von 0,27 mg/l wurde in Woche 20 in MK B gemessen. Signifikante Unterschiede zwischen belasteten und Kontrollen ließen sich nach Ende der Applikation feststellen ($p=0,028$).

3.2.3.7. Nitrat

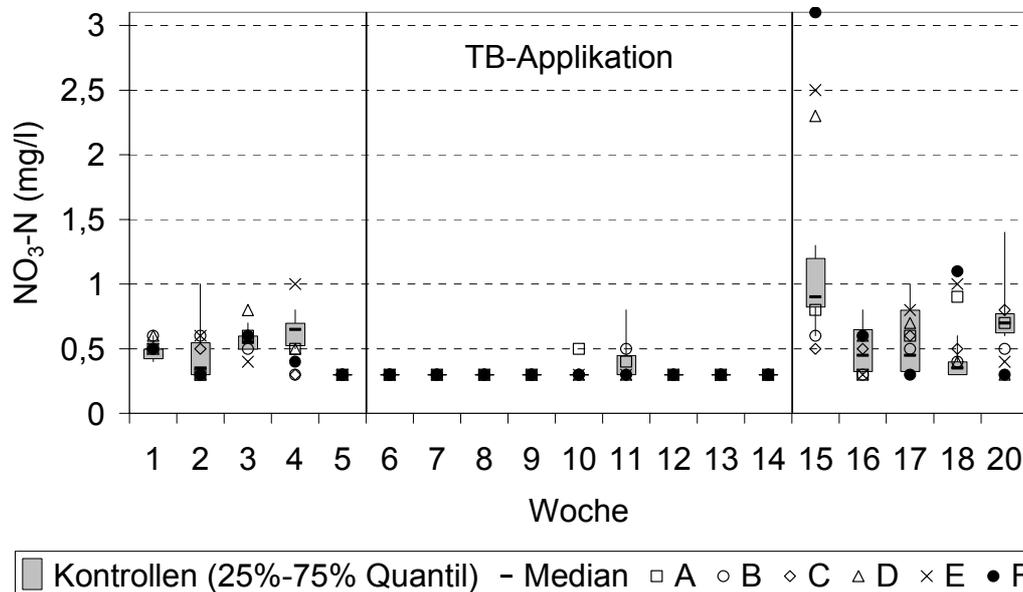


Abbildung 48: Nitratkonzentrationen in den Mikrokosmen im Versuch mit Trenbolon 2001. Werte der Kontrollen, die im Bereich der 25% und 75% Quantile liegen, werden als graue Box dargestellt, zugehörige Whisker werden durch Minimal-, bzw. Maximalwert begrenzt. Belastete Mikrokosmen werden durch unterschiedliche Symbole gezeigt.

Bis Woche 4 ließen sich in den Mikrokosmen Nitratwerte von 0,25 bis 1,0 mg/l nachweisen (Abb. 48). Bereits vor Beginn der Dosierung sanken diese in allen MK unter die Nachweisgrenze. Während der Applikationsphase konnten nur vereinzelt Werte bis zu 0,8 mg/l sowohl in Kontrollen, als auch in einigen belasteten Mikrokosmen beobachtet werden. Nach Ende der Applikation stieg der Gehalt an Nitrat in allen Mikrokosmen ab Woche 15 auf Werte, die vergleichbar zu denen zu Versuchsbeginn waren. Maximalwerte von 2,3 mg/l, bzw. 2,5 mg/l, bzw. über 3 mg/l wurden dabei in den Mikrokosmen D, E und F gefunden. Signifikante Unterschiede zwischen belasteten Mikrokosmen und Kontrollen konnten nicht festgestellt werden ($p > 0,05$).

3.2.4. Zooplankton

3.2.4.1. Anzahl der Taxa

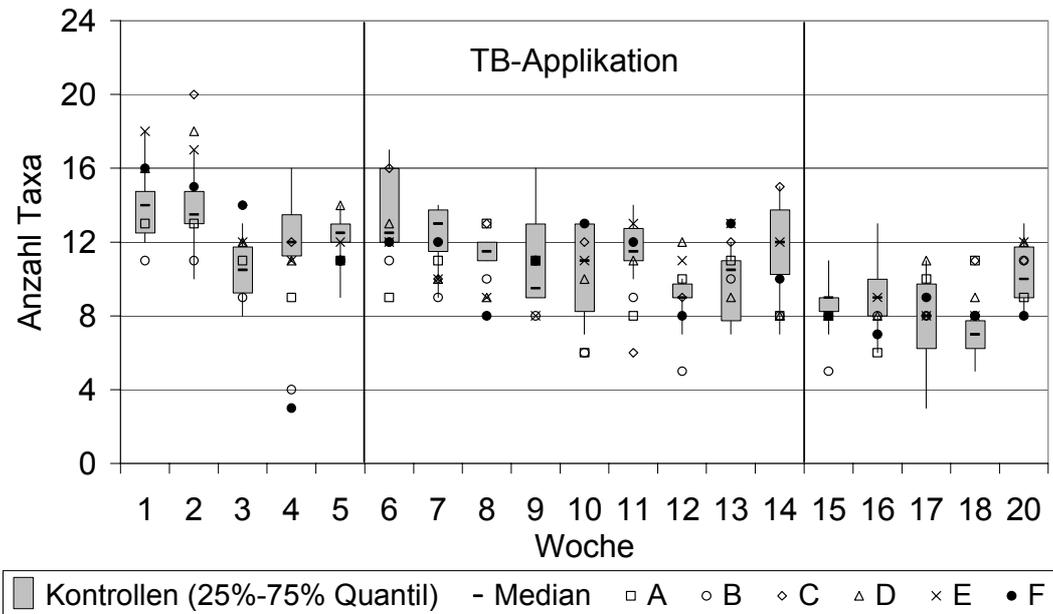


Abbildung 49: Anzahl verschiedener Taxa in den Kontrollen und den mit Trenbolon applizierten Mikrokosmen.

Insgesamt wurden im Versuch mit Trenbolon 7 verschiedene Copepoda-, 9 Cladocera- und 31 Rotatoria-Taxa bestimmt (Abb. 49). An allen Probenahmetagen wurden in den Mikrokosmen zwischen 3 (MK K6 in Woche 17 und F in Woche 4) und maximal 20 (MK C in Woche 2) Taxa gezählt. Der Schnitt der Kontroll-Mikrokosmen betrug zu Versuchsbeginn 14 Taxa, und sank bis Versuchsende auf 10 Taxa. In den belasteten Mikrokosmen A, C, D, E und F wurden bis auf wenige Ausnahmen den Kontrollen entsprechende Taxa-Zahlen ermittelt. In MK B dagegen wurden ab Woche 6 bis 12 weniger Taxa als in den Kontrollen gezählt, gleichzeitig wurde in diesem Zeitraum ein Rückgang von 11 auf 5 in B vorkommenden Taxa festgestellt.

3.2.4.2. Diversität und Evenness

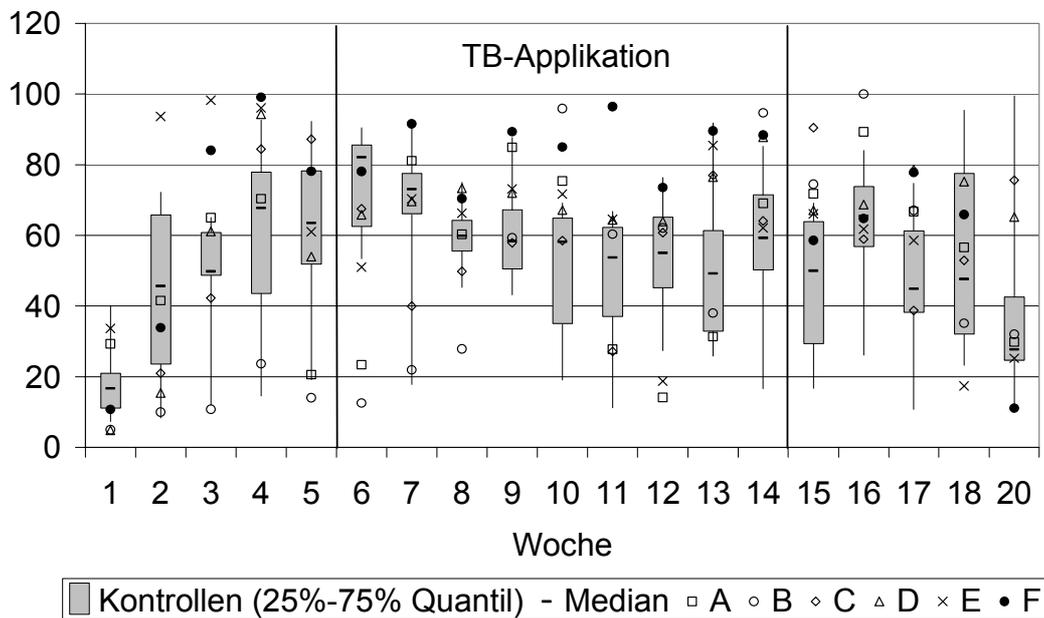


Abbildung 50: Gleichmäßigkeit (Evenness) für den Vergleich der Gruppen Cladocera, Copepoda und Rotatoria.

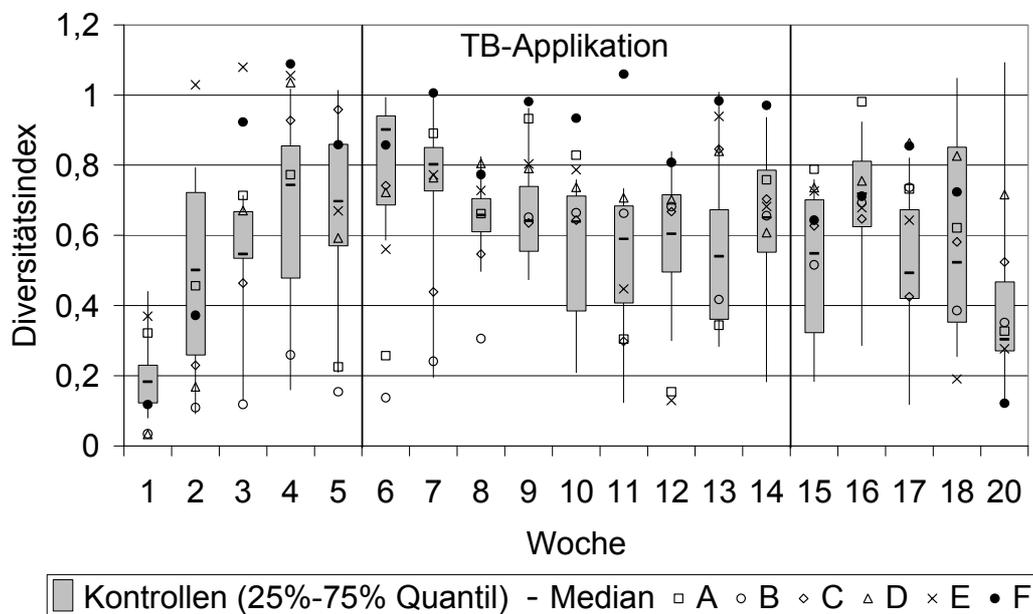


Abbildung 51: Diversitätsindex nach Shannon und Weaver auf Gruppenniveau.

Sowohl die Evenness (Abb. 50) als auch der Diversitätsindex (Abb. 51) stiegen von Woche 1 mit einem Maximum in Woche 6 in allen Mikrokosmen, ausgenommen B, an. In den folgenden Wochen war ein leichter Rückgang von Diversität und

Evenness festzustellen, der mit der Stabilisierung der Mikrokosmen in Zusammenhang gebracht werden kann. MK F zeigte vor allem während der Applikationsphase eine höhere strukturelle Gleichmäßigkeit im Vergleich mit allen anderen Mikrokosmen. Am letzten Probenahmetag in Woche 20 sanken Diversität und Evenness ab, vermutlich aufgrund jahreszeitlich bedingter Populationsrückgänge.

3.2.4.3. Populationsdynamik

3.2.4.3.1. Totale Abundanzen der Cladocera

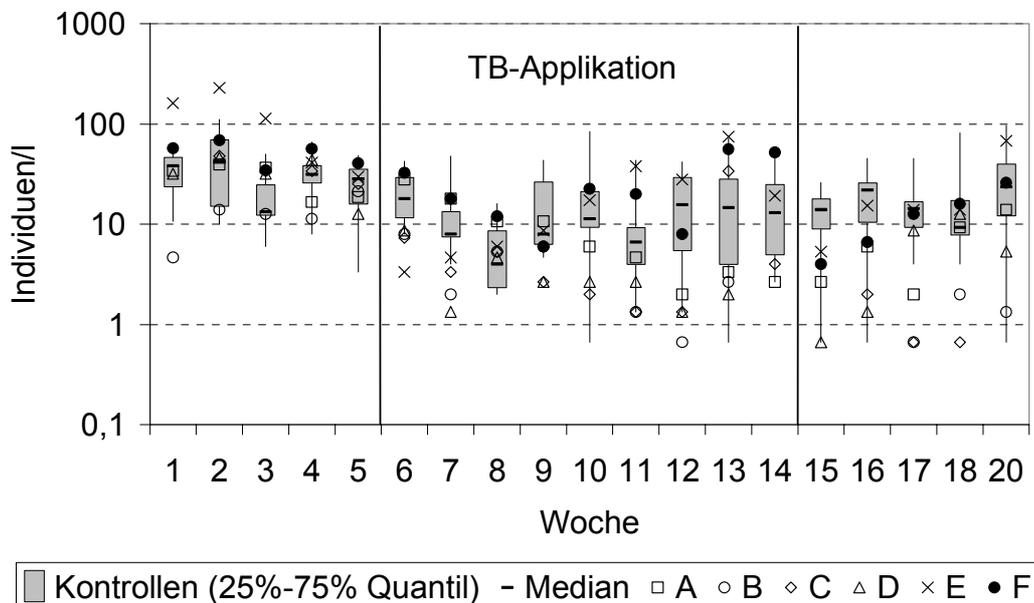


Abbildung 52: Totale Abundanzen der Cladocera in den Kontrollen und TB belasteten Mikrokosmen A bis F. Logarithmische Skala.

Die Abundanzen der Cladocera sanken in den Kontrollen innerhalb der ersten Versuchswochen von durchschnittlich über 15 bis maximal 48 Ind/l auf Werte um 6 Ind/l in Woche 8 (Abb 52). Die belasteten Mikrokosmen A bis D waren bis zum Beginn der Applikation mit dem Median der Kontrollen vergleichbar, E und F zeigten sogar höhere Individuendichten. Ab Woche 9 wurden bis zum Versuchsende in den Kontrollen im Schnitt wieder zwischen 12 und 33 Ind/l gezählt. Zwischen Woche 6 und 10 konnte ein mehrwöchiger Rückgang der Populationsgrößen in den Kontrollen

K2, K3, K4 und K6 sowie in den belasteten Mikrokosmen A, B, C und D auf weniger als 8 Individuen pro Liter festgestellt werden. Kurzzeitig konnten sich die Cladocera-Populationen in diesen Mikrokosmen wieder erholen (z.B.: K6 in Woche 12 bis 15; C in Woche 13), brachen dann aber erneut zusammen. Während in den Kontroll-Mikrokosmen jedoch stets, wenn auch in kleiner Zahl, Cladocera präsent sind, fielen diese in den belasteten Systemen B (Woche 10, 14 bis 16), C (Woche 15 und 20) und D (Woche 14) zeitweise komplett aus. In den Mikrokosmen K1, K5, E und F schienen sich nach einem Rückgang der Abundanzen die Populationen jeweils über einen längeren Zeitraum stabil zu erholen.

3.2.4.3.2. Totale Abundanzen der Copepoda

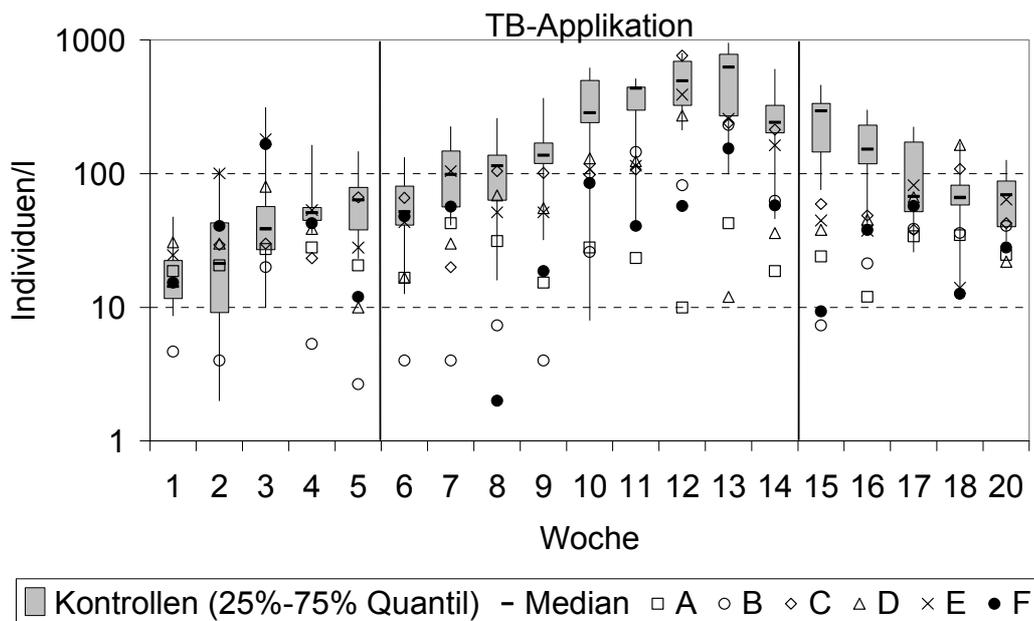


Abbildung 53: Totale Abundanzen der Copepoda in den Kontrollen und TB belasteten Mikrokosmen A bis F. Logarithmische Skala.

In den Kontrollen wurde von Woche 1 bis 13 eine Zunahme der Abundanzen der Copepoda von 14 auf über 620 Ind/l (Medianwerte) beobachtet (Abb. 53). Von den belasteten Mikrokosmen blieb allein E mit einer Ausnahme in Woche 15 immer im Bereich der Kontrollen. Während Mikrokosmos A im Vergleich zu den Kontrollen in den Wochen 9 bis 16 deutlich geringere Abundanzen (10 bis 42 Ind/l) zeigte, wick B mit 4 bis 20 Ind/l bis Woche 9 schon vor der Applikation stark ab. Lediglich in den

Wochen 11 bis 13 wurden bis zu 232 Ind/l gezählt. Copepodenpopulationen mit vergleichsweise geringeren Abundanzen traten in C in den Wochen 4 (23,3 Ind/l), 7 (20 Ind/l) und 15 (59,3 Ind/l) auf. Nach einem Zusammenbruch der Copepodengesellschaft in D nach Woche 12 blieben die Abundanzen in diesem Mikrokosmos mit 12 bis 38 Ind/l gegen Ende der Dosierung in Woche 13 bis 15 unter dem Niveau der Kontrollen. Mikrokosmos F wich vor allem in den Wochen 5 (12 Ind/l), 8 (2 Ind/l) 9 (18 Ind/l) 12 (57 Ind/l) und 15 (9 Ind/l) klar von den Kontrollen ab. Auffällig ist, dass alle belasteten Mikrokosmen in Woche 15 nach Entnahme der Dosiereinrichtungen im Vergleich zu den Kontrollen geringere Abundanzen aufwiesen.

3.2.4.3.3. Totale Abundanzen der Rotatoria

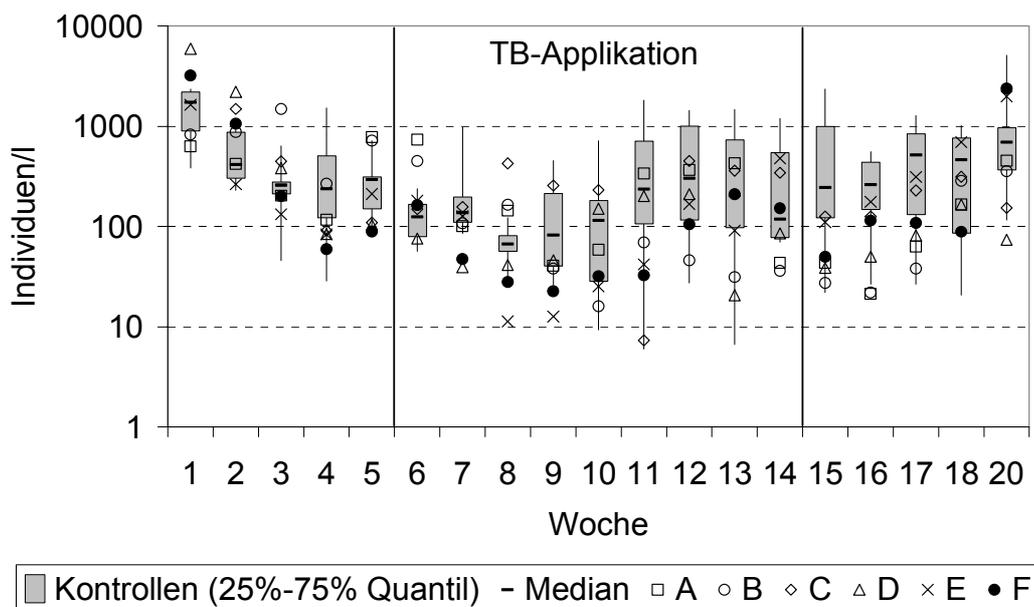


Abbildung 54: Totale Abundanzen der Rotatoria in den Kontrollen und TB belasteten Mikrokosmen A bis F. Logarithmische Skala.

In der Mehrzahl der Mikrokosmen wurden in Woche 1 zwischen 630 (MK A) und 3200 (MK F) Rotatoria pro Liter gezählt (Abb. 54). Die zu diesem Zeitpunkt geringste Populationsdichte von 384 Ind/l wurde in MK K 3 beobachtet, die höchste mit 5939 Ind/l in MK D. In den Mikrokosmen K1, K4, K6, A, B, D, E und F sanken nach den ersten Versuchswochen die Abundanzen der Rotatoria ab und blieben über mehrere Wochen auf einem relativ niedrigem Niveau von weniger als 100 Ind/l, teilweise

unterbrochen durch einzelne Maxima, in denen bis zu 485 Individuen/l gezählt wurden. In MK K2, K3, K5 und C sanken die Abundanzen innerhalb der ersten Woche ebenfalls stark auf Werte unter 100 Ind/l. Ab Woche 7, bzw. 9 (MK K2) erholten sich diese jedoch wieder und bildeten in diesen Mikrokosmen Populationen die stets über 150 Ind/l stark waren. In MK C war allerdings in Woche 11 ein Zusammenbruch der Rotatoriagesellschaft mit 7 Ind/l zu verzeichnen. In allen Mikrokosmen war in den letzten Versuchswochen ein starker Anstieg der Individuenzahlen pro Liter zu beobachten. Am stärksten ausgeprägt war dies in MK K3, K4, K5, E und F mit mehr als 1000 Ind/l. Insgesamt lagen die belasteten Mikrokosmen fast immer im Bereich der Kontrollen, bzw. unter deren Durchschnitt.

3.2.4.4. Biovolumina der verschiedenen Ernährungstypen Räuber – Algenfresser – Sonstige

Analog zum Versuch mit Ethinylestradiol wurden die ausgewerteten Zooplanktondaten auch für den Versuch mit Trenbolon in verschiedene, die Nahrungsgewohnheiten betreffende Gruppen eingeteilt.

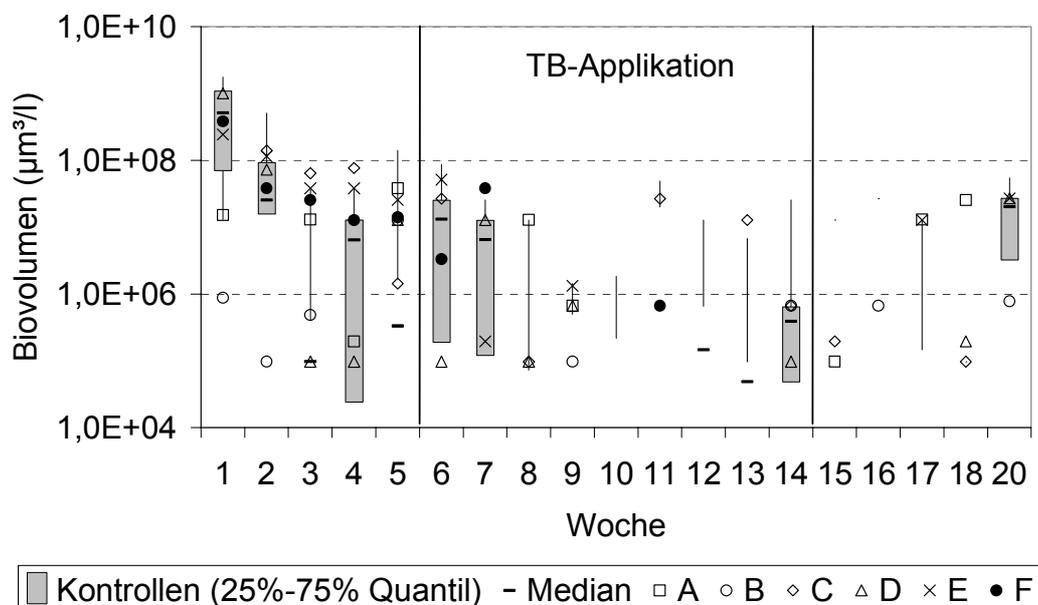


Abbildung 55: Logarithmische Darstellung der Biovolumina der Räuber und Omnivoren in den Mikrokosmen aufgetragen gegen die Zeit

Räuber: Zu Beginn des Versuches bis Woche 8 traten in allen Kontrollen und belasteten Mikrokosmen räuberisch lebende Zooplankter in größeren Biovolumina auf (Abb. 55). Von Woche 8 bis 13 wurden Vertreter dieser Gruppe in den meisten Kontrollen und den belasteten Mikrokosmen A, B, D, E und F nur in sehr geringen Biovolumina erfasst. Größere Biovolumina der Räuber traten nur vereinzelt in einzelnen Mikrokosmen auf (z.B.: Woche 11 in MK C, F, K2 und K5). Ab Woche 14 sind die Räuber wieder häufiger in den Modellsystemen anzutreffen, wobei sowohl in einigen Kontrollen (MK 3, MK 5, MK 6), als auch in einigen belasteten Mikrokosmen (D, E, F) die Biovolumina sehr gering blieben oder die Räubergruppe teilweise sogar komplett ausfiel. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und belasteten Mikrokosmen konnte nicht festgestellt werden.

Algenkonsumenten: Da bei der Berechnung der Biovolumina der Algenkonsumenten vor allem große Cladocera-Taxa wie *Daphnia longispina* zu Buche schlugen, ähnelte der Verlauf der Biovolumina dem populationsdynamischen Verhalten der Gruppe der Cladocera. So war ebenfalls in der ersten Hälfte des Versuches in den Kontrollen die leichte Tendenz zu zurückgehenden Biovolumina feststellbar (Abb. 56). Von Woche 9 bis 12 waren erneut wachsende Biovolumina zu verzeichnen, bis diese schließlich ab Woche 13 bis zum Versuchsende in Woche 23 stabil auf einem leicht geringeren Niveau blieben. Die Mikrokosmen A und E verhielten sich bis Woche 13, bzw. 20 vergleichbar mit den Kontrollen. In den Wochen 14 bis 17 sanken die Biovolumina von A unter die der Kontrollen. B, C und D zeigten ab etwa Mitte der Applikationsphase vergleichsweise geringere Biovolumina als die Kontrollen. In Mikrokosmos F waren mit Ausnahme von Woche 2 die Algenkonsumenten im Vergleich zu den Kontrollen in deutlich höheren Volumina vertreten. Auffällig war ein starker Einbruch unter den Minimalwert der Kontrollen in Woche 15 kurz nach Entnahme der Dosiereinrichtungen, gefolgt von einer Erholungsphase in den folgenden Wochen. Erst in der letzten Versuchswoche begannen hier die Biovolumen wieder zu sinken.

Sonstige: in den Kontrollen war ab Woche 6 ein Anstieg von $1,0 \text{ E}8 \mu\text{m}^3/\text{l}$ auf $1,0 \text{ E}9 \mu\text{m}^3/\text{l}$ in Woche 13 zu sehen (Abb. 57). Dann gingen die Biovolumina bis Woche 20 wieder zurück, in etwa auf das Niveau zu Versuchsbeginn. In den belasteten Mikrokosmen war eine solche stetige Biovolumenzunahme bis zu einem Maximalwert und anschließende Abnahme nicht zu erkennen. In diesen Mikrokosmen war das

Auftreten der Zooplankter geprägt durch mehr oder weniger starke Schwankungen, wobei die Biovolumina in den Wochen 7 bis 17 meist unter dem Schnitt der Kontrollen blieben, oft sogar unter deren absolutem Minimum. Erst gegen Ende des Versuches verhielten sich die belasteten Mikrokosmen wieder ähnlich wie die Kontrollen.

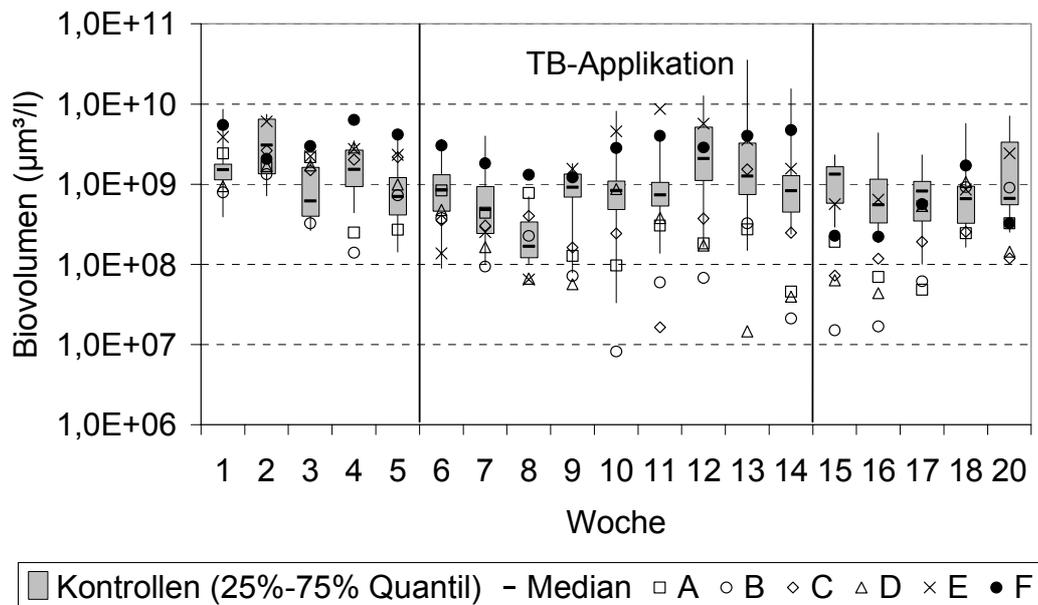


Abbildung 56: Logarithmische Darstellung der Biovolumina der Algenfresser in den Mikrokosmen aufgetragen gegen die Zeit.

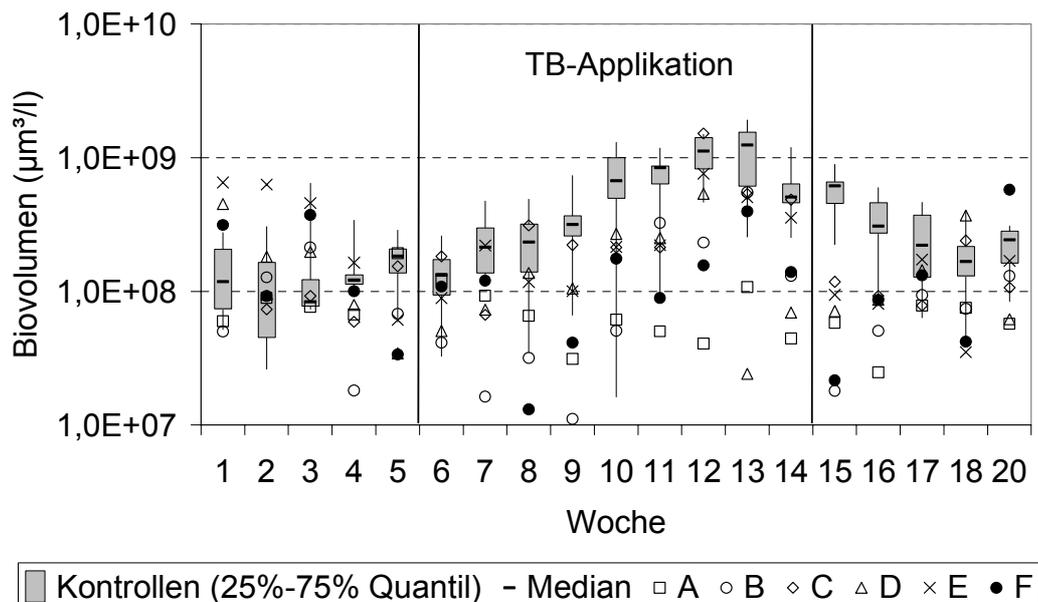


Abbildung 57: Logarithmische Darstellung der Biovolumina der Zooplankter („Sonstige“), die weder der Gruppe der Räuber und Allesfresser, noch eindeutig den Phytoplanktonkonsumenten zugeordnet werden konnten, gegen die Zeit.

3.2.4.5. Principal Response Curve und Species Score der Gruppen der Cladocera, Rotatoria und Copepoda

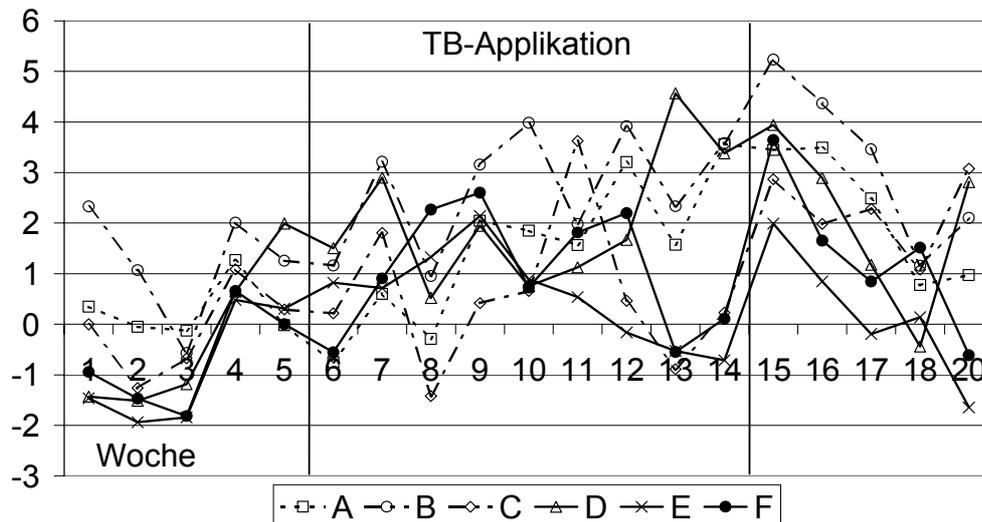


Abbildung 58: PRC berechnet über den gesamten Versuchszeitraum aus den absoluten Abundanzen der Gruppen der Cladocera, Copepoda und Rotatoria im Versuch mit Trenbolon.

Tabelle 12: Species Scores für das Zooplankton im Versuch mit Trenbolon, eingeteilt in drei Gruppen (Cladocera, Copepoda, Rotatoria).

GRUPPE	SPECIES SCORE
Cladocera	0,266
Copepoda	0,283
Rotatoria	0,218

3.2.4.6. Principal Response Curve und Species Score der einzelnen Taxa

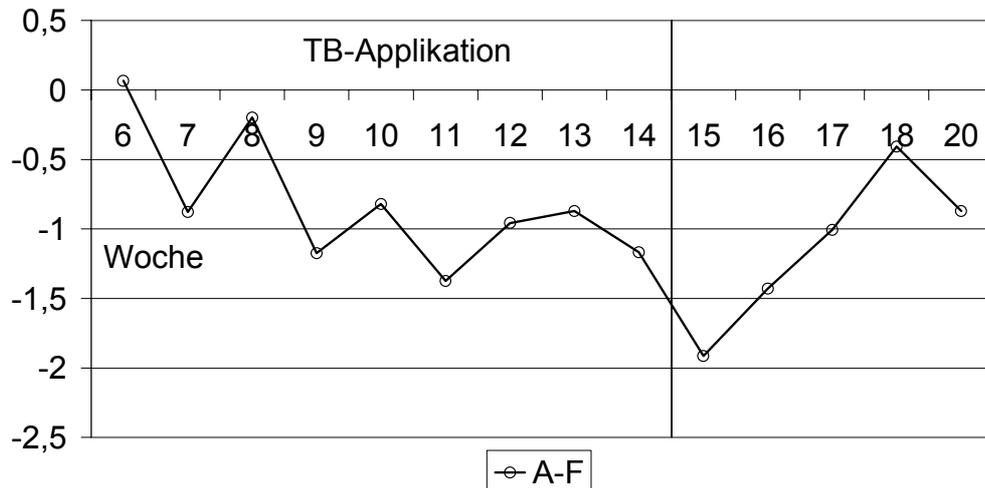


Abbildung 59: PRC der einzelnen Taxa im Mikrokosmenversuch mit Trenbolon. Die Mittelwerte der Kontrollen bilden die Nulllinie. Aus den totalen Abundanzen der belasteten Mikrokosmen wurden die Mittelwerte errechnet und den Kontrollen gegenübergestellt.

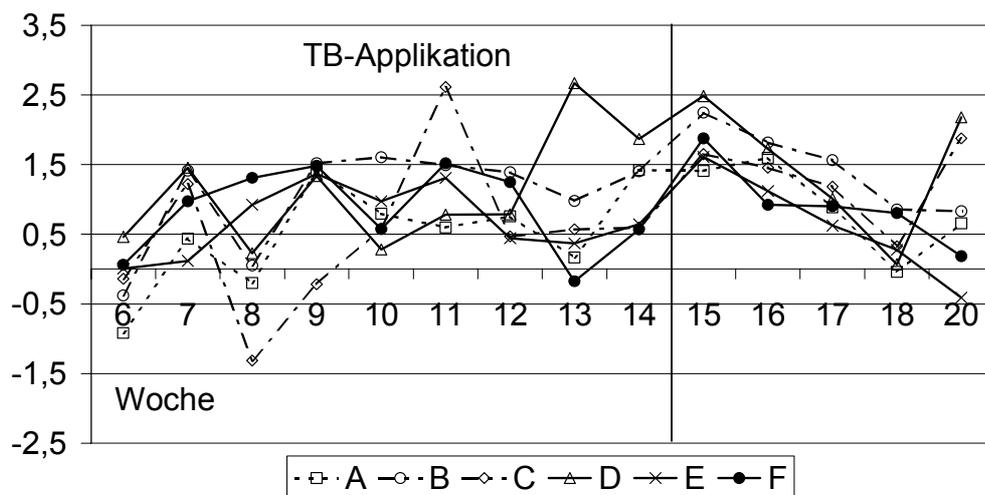


Abbildung 60: PRC der einzelnen Taxa (totale Abundanzen). Mittelwerte der Kontrollen als Nulllinie. Belastung der Mikrokosmen mit Trenbolon.

Betrachtet man die PRC, berechnet über den gesamten Versuchszeitraum für die Kontrollen und die einzelnen belasteten Mikrokosmen A bis F aus den absoluten Abundanzen des Zooplanktons auf Gruppenniveau (Abb. 58), zeigen die Mikrokosmen A (ab Woche 9), B (ab Woche 3) und D (ab Woche 12) eine tendenziell zunehmende Abweichung von den Kontrollen. Entsprechende Species Score Werte für Copepoda, Cladocera und Rotatoria sind untereinander vergleichbar (Tab. 12).

Geht man jedoch von einer Besiedelung der Mikrokosmen infolge natürlicher Sukzession aus, werden vor allem in der Besiedelungsphase der neu eingerichteten Systeme Unterschiede bemerkbar, die sich dann im Laufe der Entwicklung relativieren. Um diese Einflüsse auf die statistische Auswertung auszuschließen, wurden für den Trenbolon-Versuch PRCs ab Beginn der Applikationsphase (10.07.01) berechnet. Stellt man zunächst die Mittelwerte berechnet aus der Gruppe Kontrollen gegen die der Gruppe der belasteten Mikrokosmen, zeigen diese die Tendenz sich ab Woche 8 (24.07.01) von den Kontrollen immer stärker zu unterscheiden (Abb. 59). In der Post-Applikationsphase des Versuches nähern sich die belasteten Mikrokosmen nach Woche 15 den Kontrollen wieder an. Setzt man nun die totalen Abundanzen der belasteten Mikrokosmen einzeln in Relation zu den Mittelwerten der Kontrollgruppe, kann in allen belasteten Mikrokosmen dieser Verlauf bestätigt werden (Abb. 60). Ab Woche 8 zeigt sich tendenziell eine unterschiedliche populationsdynamische Entwicklung der TB-belasteten Systeme zu den Kontrollen. In Woche 13 findet kurzfristig eine Annäherung einiger belasteter Mikrokosmen an die Kontrollen statt, bis schließlich beginnend nach der 15. Versuchswoche die Zooplankton-Abundanzen aller dosierten Mikrokosmen bis Woche 18 dem Mittel der Kontrollen ähnlich werden. Bezogen auf die entsprechenden Species Scores dieser PRC (Tab. 13), sind aus der Gruppe der Copepoda vor allem Larven (Nauplia) und Entwicklungsstadien (Copepodite) betroffen, weniger adulte Tiere. Stark beeinflusst wurden demnach auch einige Rotatoria-Spezies, wie *Polyarthra*, *Keratella quadrata* und *Synchaeta*. Cladocera waren weniger für Abweichungen verantwortlich, am ehesten noch *Chydorus* und *Daphnia longispina*.

Tabelle 13: Species Scores der einzelnen Zooplankton-Taxa im Versuch mit Trenbolon.

TAXON	SPECIES SCORE	GRUPPE	TAXON	SPECIES SCORE	GRUPPE
Adineta	0,13304944	Rotatoria	Ascomorpha ecaudis	-0,01205417	Rotatoria
Lepadella patella	0,04725398	Rotatoria	Ascomorpha saltans	-0,01320989	Rotatoria
Platya	0,02221406	Rotatoria	Habrotrocha spec	-0,01369353	Rotatoria
Dicranophorus spec	0,0131449	Rotatoria	Trichocerca spec	-0,01703651	Rotatoria
Notholca spec	0,01166604	Rotatoria	Notommata spec	-0,01953655	Rotatoria
Brachyonus angularis	0,00946942	Rotatoria	Lecane distyla	-0,02095696	Rotatoria
Monommata longiseta	0,00450679	Rotatoria	Diaphanosoma brachyurum	-0,02288123	Cladocera
Acroperus harpae	0,00266741	Cladocera	Sum.Ascomorph	-0,02526406	Rotatoria
Euchlan	0,00167954	Rotatoria	Juvenile Cladocera	-0,02929746	Cladocera
Lecane monostyla	0,00068192	Rotatoria	Daphnieneier	-0,03729086	Cladocera
Macrocyclus albidus	0,00023122	Copepoda	Eudiaptomus gracilis	-0,05721167	Copepoda
Eucyclops serrulatus	-0,00089453	Copepoda	Cephalodella spec	-0,0656305	Rotatoria
Testudinella	-0,00096832	Rotatoria	Scapholeberis mucronata	-0,06855969	Cladocera
Colurella spec	-0,00138456	Rotatoria	Brachyonus calyciflorus	-0,09840431	Rotatoria
Cyclopoide	-0,00199066	Copepoda	Keratella cochlearis	-0,13607733	Rotatoria
Kellicottia longispina	-0,00325792	Rotatoria	Daphnia longispina	-0,14934956	Cladocera
Canthocamptus staphylinus	-0,00346105	Copepoda	Proales spec	-0,17104368	Rotatoria
Filinia spec	-0,00542688	Rotatoria	Chydorus sphaericus	-0,27773346	Cladocera
Bosmina longirostris	-0,00552266	Cladocera	Copepodite	-0,30667624	Copepoda
Rotaria	-0,00567515	Rotatoria	Synchaeta pectinata	-0,31417456	Rotatoria
Trichotria pocillum	-0,00655272	Rotatoria	Nauplia	-0,41706416	Copepoda
Sida crystallina	-0,00678183	Cladocera	Keratella quadrata	-0,45710212	Rotatoria
Asplanchna spec	-0,00737837	Rotatoria	Polyarthra spec	-0,47856851	Rotatoria

3.2.5. Phytoplankton

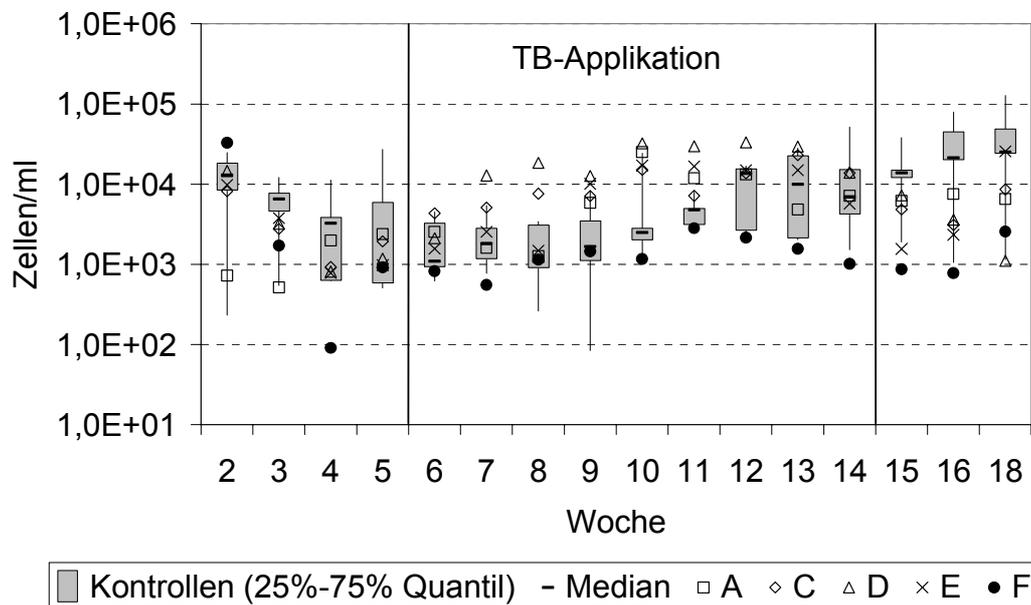


Abbildung 61: Gesamtzelldichte des Phytoplanktons in den Kontrollen K1 bis K4 und den mit TB belasteten Mikrokosmen A, C, D, E und F.

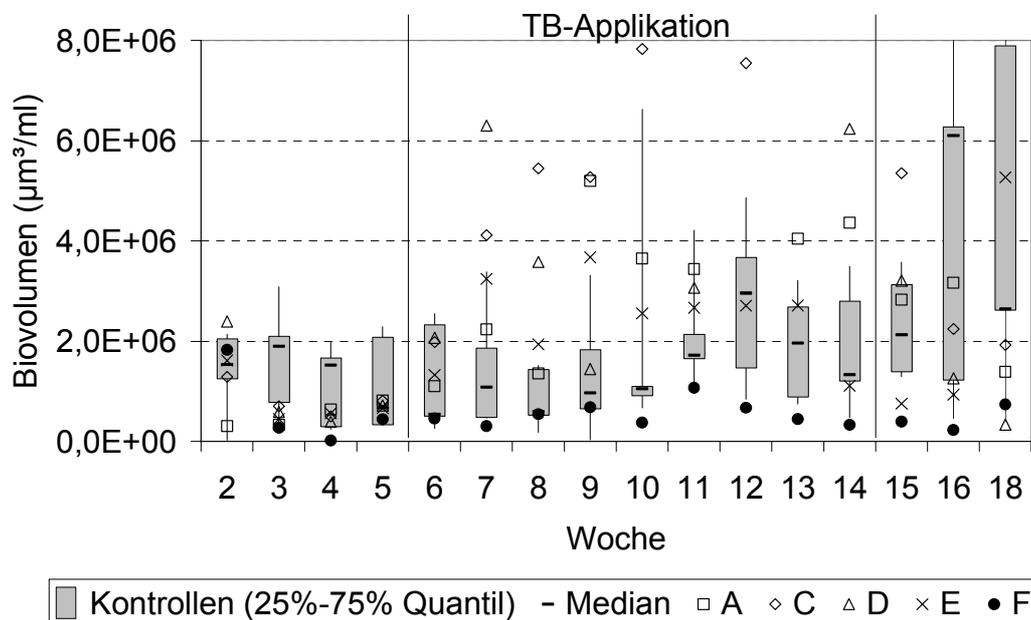


Abbildung 62: Biovolumen des Phytoplanktons pro Wasservolumen in den Kontrollen K1 bis K4 und den mit TB belasteten Mikrokosmen A, C, D, E und F.

In den Kontrollen wurden zwischen 10^2 und 10^5 Zellen/ml gezählt (Abb. 61). Bis Woche 5 lagen die belasteten MK A, C, D, E und F in einem vergleichbaren Bereich.

Ähnliches galt für die errechneten Biovolumina. Bis Woche 9 betrug in den Kontrollen, bzw. in/bis Woche 6 in allen belasteten MK, die Algenbiomasse weniger als $4 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3/\text{l}$ (Abb. 62). Die belasteten MK A, C und D unterschieden sich nach der Dosierung der Mikrokosmen mit TB vor allem in den Wochen 7 bis 12, bzw 14 sowohl bezüglich der Gesamtzellzahl der Algenorganismen, als auch bezüglich des Biovolumens von den Kontrollen. Es wurden Zellzahlen über 10^4 und Biovolumina zwischen $3 \cdot 10^6$ und $8 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3/\text{l}$ ermittelt. MK F fällt zeigt eine geringere Gesamtzelldichte und Phytoplankton-Biovolumen vor allem ab Woche 10. MK E bleibt während der gesamten Versuchsphase mit wenigen Ausnahmen im Bereich der Kontrollen

3.2.6. Meiobenthos

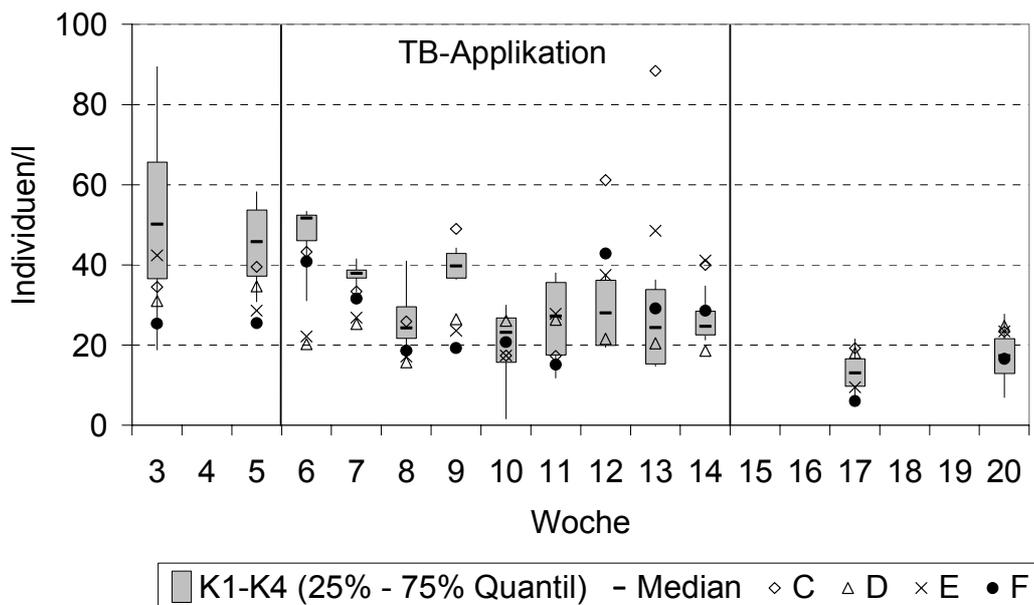


Abbildung 63: Abundanzen aller Organismen der Meiofauna.

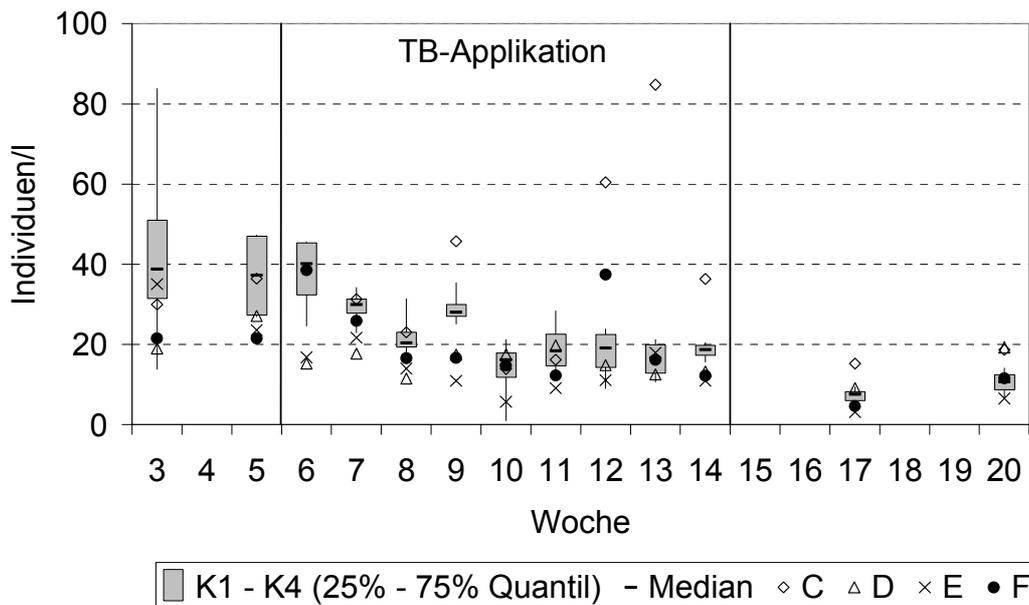


Abbildung 64: Abundanzen der Nematoda in Mikrokosmen über einen Zeitraum von 18 Wochen.

Abb. 63 und 64 zeigen die Individuendichten in den untersuchten Sedimentproben, zum einen betrachtet für alle Organismen der Meiofauna (Abb. 63), zum anderen betrachtet für die Nematoda (Abb. 64). Die Gesamtabundanz der Meiofauna nahm in allen Mikrokosmen im Verlauf des Versuchs leicht ab und folgte dabei grob der dominantesten Organismengruppe, den Nematoda. Die Nematoda zeigten am Versuchsbeginn Abundanzen zwischen 14 und 84 Individuen pro ml Sediment, während am Ende des Versuchs nur noch 7 bis 19 Individuen/ml gefunden wurden. Ein Effekt der Trenbolon-Behandlung auf die Abundanzen ist nicht zu erkennen. Auffällig sind nur die im Vergleich zur Kontrolle deutlich höheren Nematoda-Abundanzen in C am Ende der Applikationsphase.

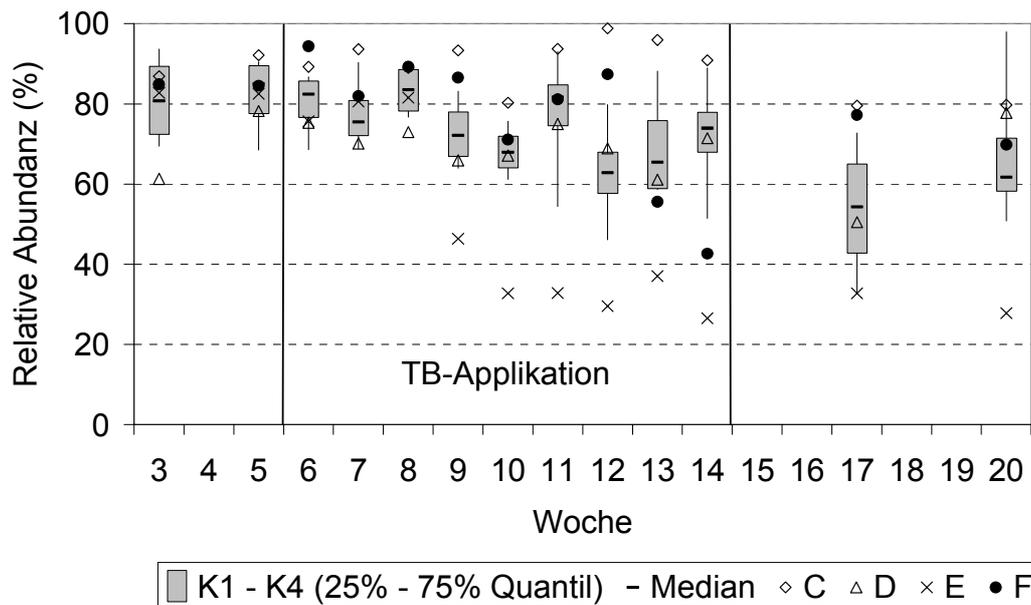


Abbildung 65: Relative Häufigkeit der Nematoda in Mikrokosmen über einen Zeitraum von 18 Wochen.

Bezüglich der relativen Häufigkeit der Nematoda (Abb. 65) sind zwei deutliche Tendenzen zu erkennen. Während in C die rel. Häufigkeiten der Nematoda während der gesamten Applikationsphase (Woche 4 bis 14) höher waren als in der Kontrolle, verloren die Nematoda in E drei Wochen nach Applikation im Vergleich zur Kontrolle deutlich an Dominanz. Dieser Effekt hielt bis zum Ende des Versuchs an. Betrachtet man die Principal Response Kurven (PRCs) der relativen Häufigkeiten der Organismengruppen, sieht man ein ähnliches Bild (Abb. 66). Die Species Scores zeigen an, dass die relativen Häufigkeiten der Ostracoda (0,68), Copepoda (0,38), Phyllopoda (0,31) und Tardigrada (0,15) der Tendenz der PRCs folgen, während die relativen Häufigkeiten der Nematoda (-0,28) und Chironomida-Larven (-0,15) den entgegengesetzten Verlauf nehmen. Die Abbildungen 67, 68 und 69 zeigen, dass während und nach der Applikation (hier exemplarisch in den Wochen 7, 10 und 17) in E die Dominanz der Nematoda deutlich zu Gunsten von Ostracoda und Phyllopoda abnahm.

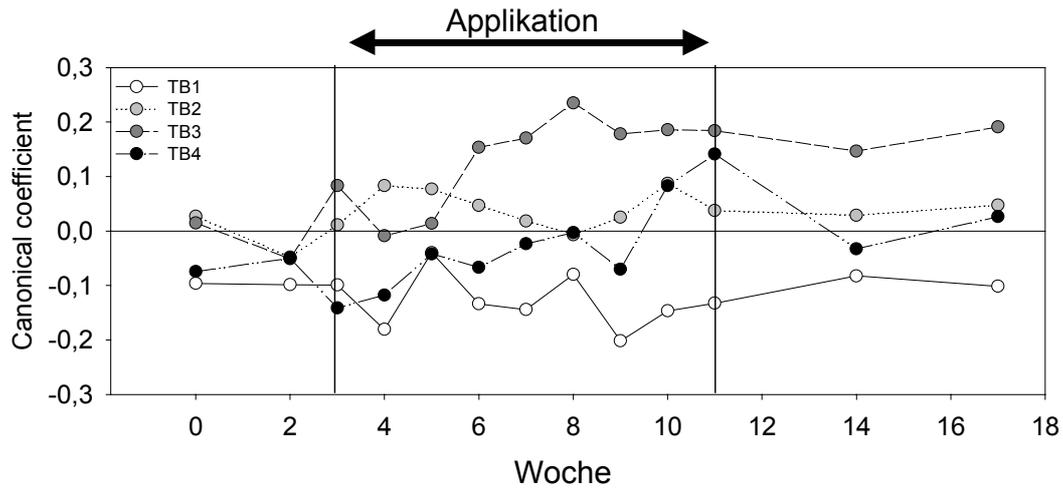


Abbildung 66: Principal Response Kurven der meiobenthischen Lebensgemeinschaft in Mikrokosmen (relative Häufigkeiten); Die Mikrokosmen wurden mit verschiedenen Konzentration an Trenbolon angereichert (TB 1-4 entspricht C-F); Nulllinie repräsentiert die Kontrollen.

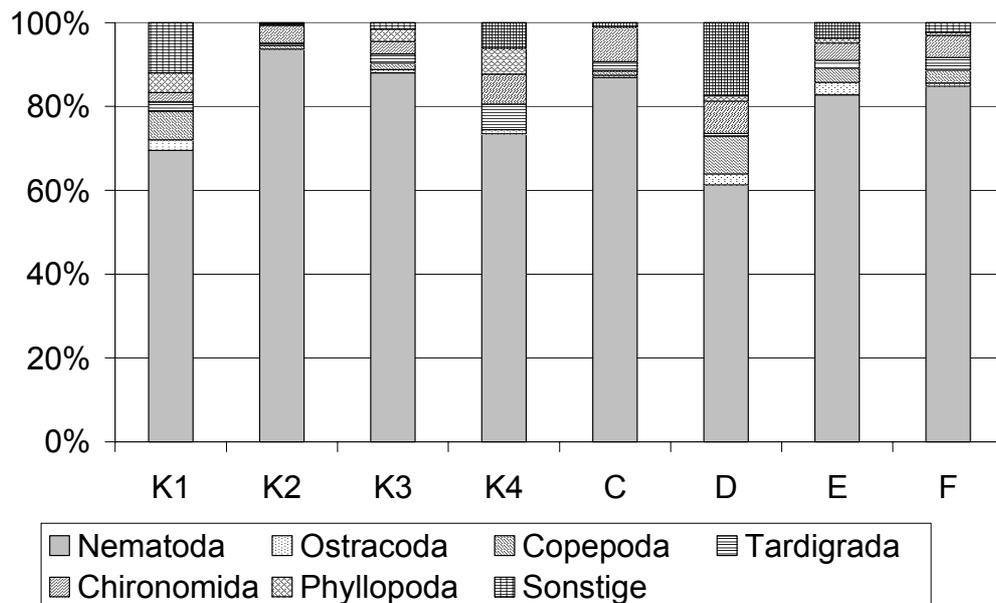


Abbildung 67: Zusammensetzung der Meiofauna (Nematoda, Ostracoda, Copepoda, Tardigrada, Chironomida-Larven, Phyllopoda, Sonstige) in Mikrokosmen, Woche 7; Links sind die vier Replikate der Kontrolle (K 1-4), rechts die unterschiedlich belasteten TB-Behandlungen (C-F) abgebildet.

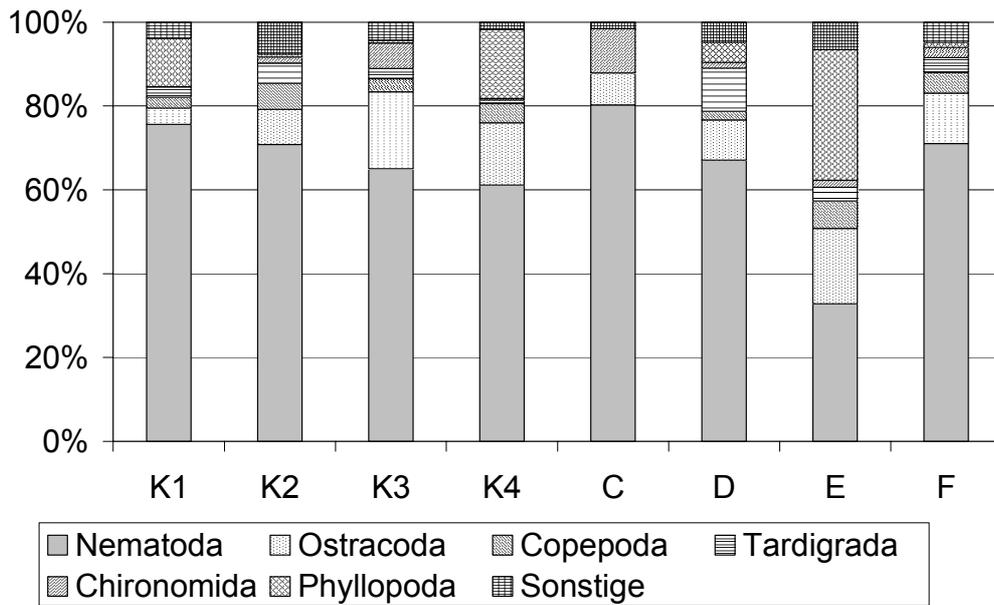


Abbildung 68: Zusammensetzung der Meiofauna (Nematoda, Ostracoda, Copepoda, Tardigrada, Chironomida-Larven, Phyllopora, Sonstige) in Mikrokosmen, Woche 10; Links sind die vier Replikate der Kontrolle (K 1-4), rechts die unterschiedlich belasteten TB-Behandlungen (C-F) abgebildet.

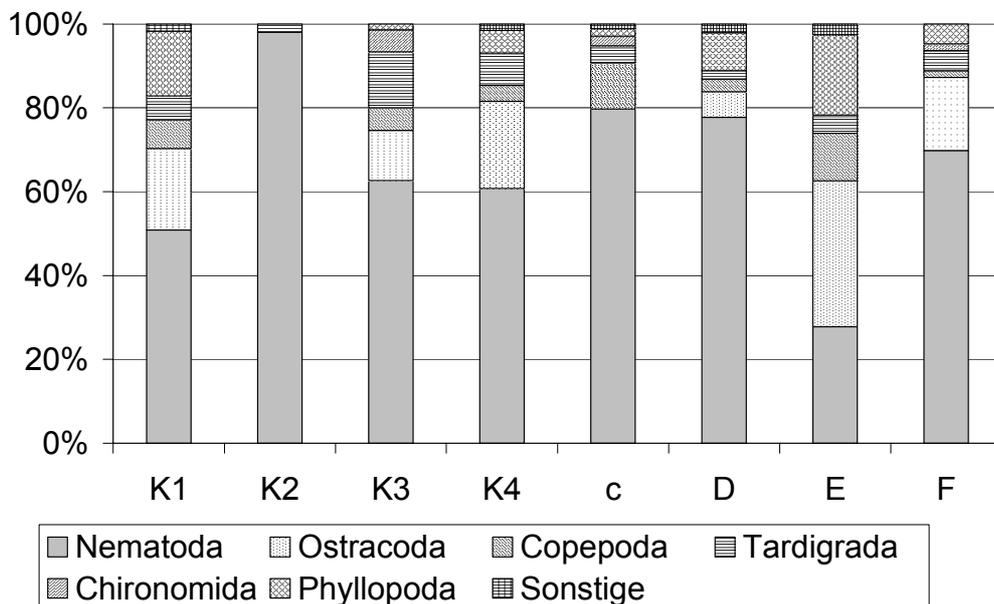


Abbildung 69: Zusammensetzung der Meiofauna (Nematoda, Ostracoda, Copepoda, Tardigrada, Chironomida-Larven, Phyllopora, Sonstige) in Mikrokosmen, Woche 17; Links sind die vier Replikate der Kontrolle (K 1-4), rechts die unterschiedlich belasteten TB-Behandlungen (C-F) abgebildet.

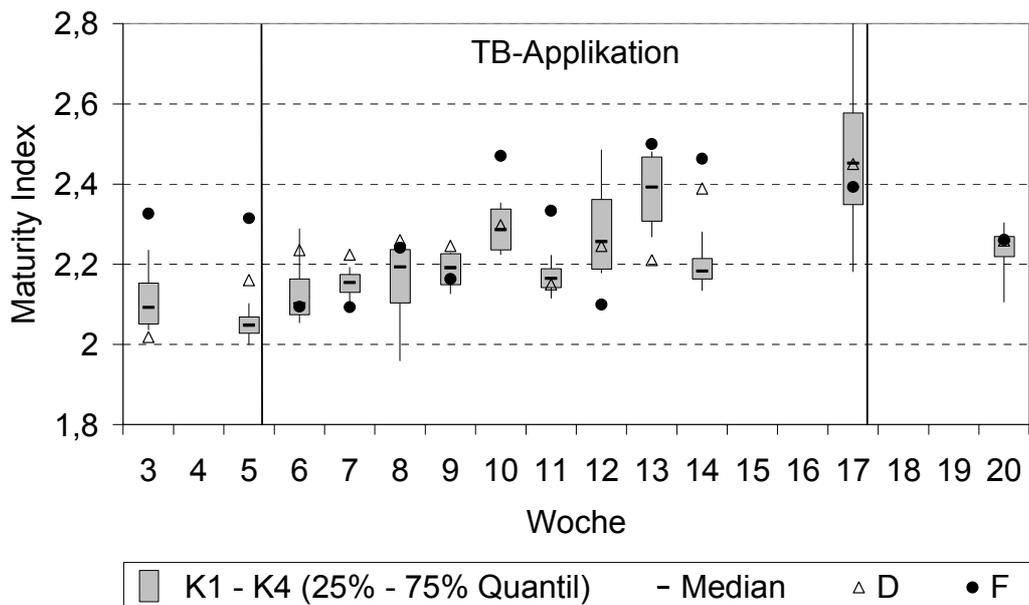


Abbildung 70: Maturity Index für die Nematoda-Lebensgemeinschaft in den Kontrollen K1 bis K4 und in den Mikrokosmen D und F über einen Zeitraum von 18 Wochen. Die Mikrokosmen wurden mit verschiedenen Konzentration an Trenbolon angereichert.

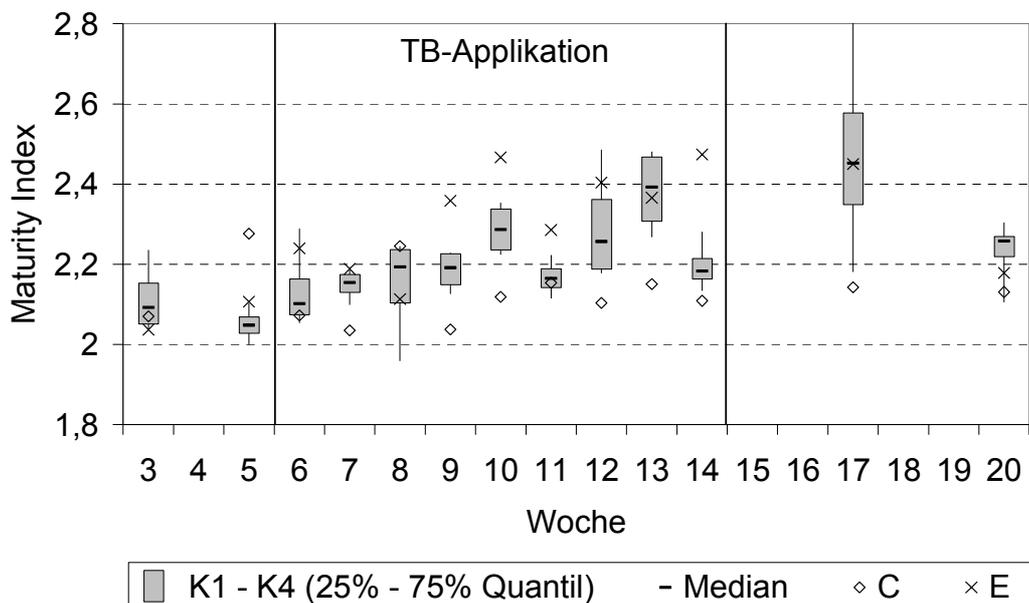


Abbildung 71: Maturity Index für die Nematoda-Lebensgemeinschaft in den Kontrollen K1 bis K4 und in den Mikrokosmen C und E über einen Zeitraum von 18 Wochen. Die Mikrokosmen wurden mit verschiedenen Konzentration an Trenbolon angereichert.

Der Maturity Index ergibt kein sehr differenziertes Bild (Abb. 70 und 71). In den Kontrollen nahm er im Verlauf des Versuchs leicht zu (Mittelwert: von 2,1 auf 2,4). Diese Tendenz ist auch bei den TB-Behandlungen (mit Ausnahme von C) zu beobachten. Bei D und F ist kein Unterschied zur Kontrolle im Verlauf des MI zu

erkennen. Während der Applikationsphase hat die Nematoda-Lebensgemeinschaft in C tendenziell einen geringeren MI, in E einen höheren MI als die Lebensgemeinschaften der Kontrolle).

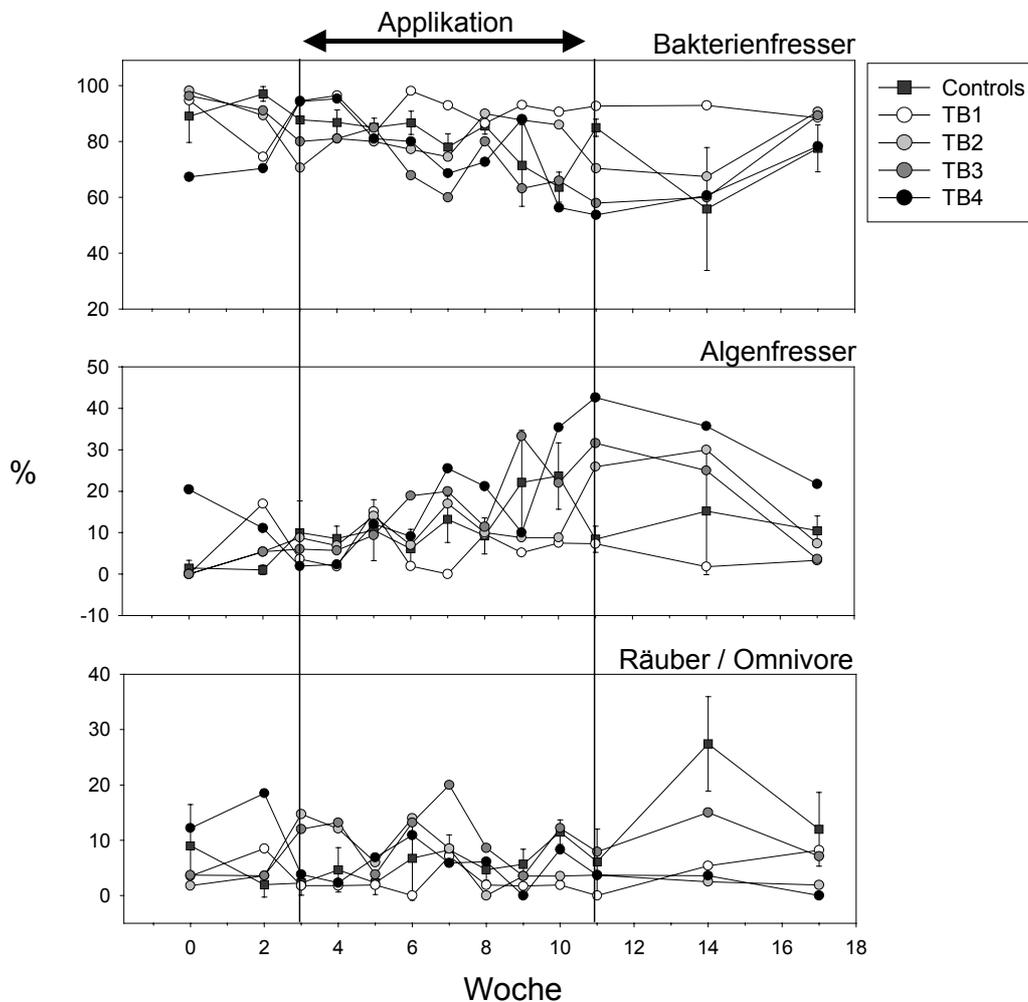


Abbildung 72: Anteil von Bakterienfressern, Algenfressern und Räubern/Omnivoren in Mikrokosmen über einen Zeitraum von 18 Wochen. Die Mikrokosmen wurden mit verschiedenen Konzentration an Trenbolon angereichert (TB 1-4 entspricht C-F); schwarze Kästchen: Mittelwerte der Kontrollen mit Standardabweichung (n = 4).

Den dominierende Ernährungstyp stellen in allen Mikrokosmen die Bakterienfresser dar (60-100 %), gefolgt von Algenfressern (0-40 %) und Räubern/Omnivoren (0-20 %) (Abb. 72). Unterschiede zwischen Kontrollen und TB-Behandlungen sind kaum zu sehen. Tendenziell sind während der Applikationsphase in C mehr, in E relativ weniger Bakterienfresser vorhanden als in den Kontrollen. Daher sind Algenfresser und Räuber/Omnivore in C weniger dominant, in E dominanter als in den Kontrollen.

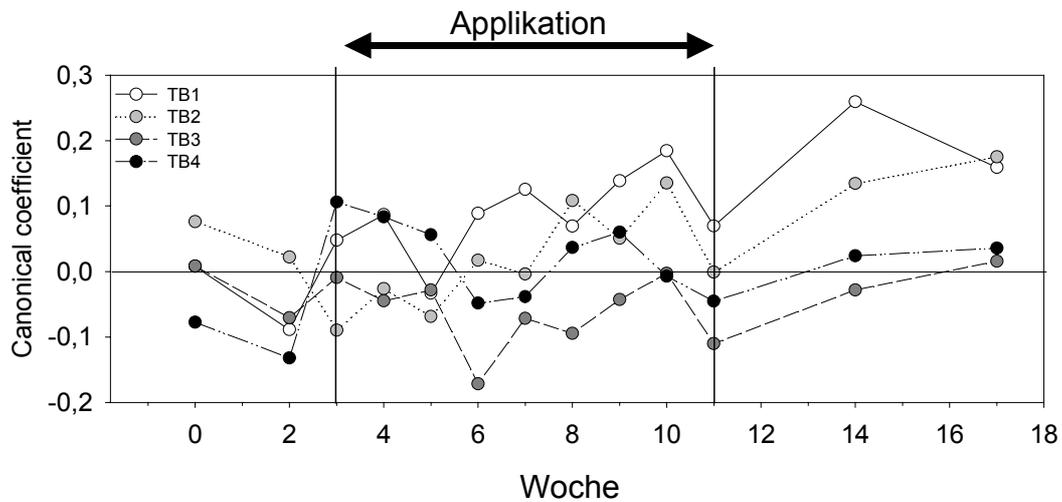


Abbildung 73: Principal Response Kurven der Artenzusammensetzung der Nematoda-Lebensgemeinschaften in Mikrokosmen (relative Häufigkeiten); Die Mikrokosmen wurden mit verschiedenen Konzentration an Trenbolon angereichert (TB 1-4 entspricht C-F); Nulllinie repräsentiert die Kontrollen.

Die PRCs der relativen Artenzusammensetzung zeigen lediglich in C und schwächer ausgeprägt für E eine Abweichung von der Kontrolle (Abb. 73). Der Species Score zeigt an, dass für Unterschiede in der Struktur der Lebensgemeinschaft vor allem höhere relative Häufigkeiten von *Eumonhystera*-Arten (*E. dispar*: 0,78; *E. filiformis spec*: 0,67; *E. pseudobulbosa*: 0,31), *Rhabdolaimus aquaticus* (0,39) und geringere relative Häufigkeiten von *Tobrilus*-Arten (*T. gracilis*: -0,70; *T. pellucidus*: 0,37), *Prodesmodora circulata* (0,64), *Monhystera*-Arten (*M. paludicola*: 0,48; *M. spec*: 0,20) und *Ethmolaimus pratensis* (0,45) verantwortlich sind. Die Zunahme (Abnahme) an Dominanz in C (E) für Bakterienfresser mit einem cp-Wert von 2 (*Eumonhystera*) zu Ungunsten (Gunsten) von Algenfressern und Räubern mit cp-Werten von 3 schlägt sich sowohl in der Zusammensetzung der Ernährungstypen als im MI nieder.

3.3. Versuche zur Katecholaminanalytik

3.3.1. Vergleich verschiedener Methoden beim Einsatz diverser Matrices

Nachfolgende Tabelle zeigt, inwieweit Katecholamine in verschiedenen Matrices und Organismen, welche durch die Methoden Chloroformextraktion (CE), Plasmakit (PK) und Chloroformextraktion kombiniert mit Plasmakit (CE/PK) aufbereitet wurden, detektiert werden konnten.

Tabelle 14: Detektierbarkeit von Katecholaminen in verschiedenen Organismen und Geweben. Methoden der Probenaufarbeitung: Chloroformextraktion (CE), Plasmakit von Recipe (PK), Kombination Chloroformextraktion und Plasmakit (CE/PK).

METHODE	MATRIX	ADRENALIN	NOR-ADRENALIN	DOPAMIN
CE	Lachsgehirn	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>Lymnea stagnalis</i> gesamt	o	o	o
	<i>L. stagnalis</i> Eingeweidesack	o	o	o
	<i>Daphnia magna</i>	n.d.	n.d.	n.d.
PK	<i>Daphnia magna</i>	o	o	o
	<i>L. stagnalis</i> . Herz	n.d.	n.d.	o
	<i>L. stagnalis</i> . Darm	o	n.d.	o
	<i>L. stagnalis</i> Eingeweidesack	o	o	o
	Fischgehirn Thunfisch	o	o	o
CE/PK	<i>L. stagnalis</i> Eingeweidesack	n.d.	o	o
	<i>Lymnea stagnalis</i> gesamt	o	o	n.d.
	<i>Daphnia magna</i>	n.d.	n.d.	o

CE = Chloroformextraktion, PK = Plasmakit von Recipe, CE/PK = Kombination Chloroformextraktion und Plasmakit, O = detektierbar, n.d. = nicht detektierbar

Zur Messung der Katecholamine mit elektrochemischer Detektion wurden für die Aufarbeitung entsprechender Proben drei verschiedene Methoden herangezogen (Tab. 14). Mit der Methode Chloroformextraktion angewendet an Fisch (Lachsgehirn), Cladocera (*Daphnia magna*) und Mollusca (*Lymnea stagnalis*) konnte Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin einzig in *L. stagnalis* gemessen werden. Bei Verwendung der Recipe Probenvorbereitungssäulchen waren Katecholamine in allen Vertretern der drei Organismengruppen zu finden. Durch eine Kombination beider Methoden konnten die Messergebnisse nicht verbessert werden. Sowohl in Mollusca, als auch in Cladocera konnten jeweils nicht alle der drei untersuchten Katecholamine nachgewiesen werden.

3.3.2. Messungen mit *Danio rerio*

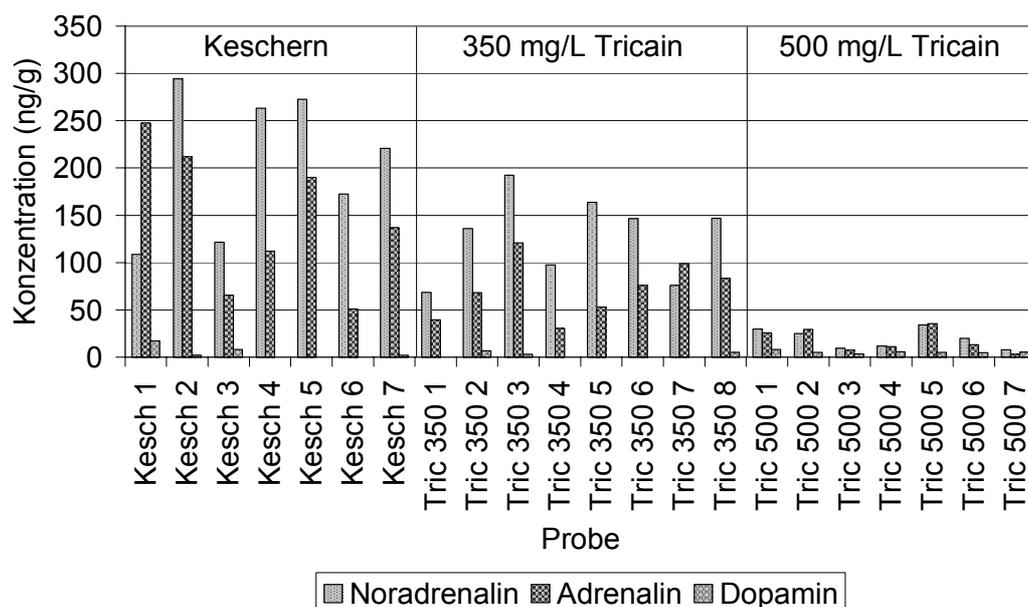
Bestimmung von Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin

Es wurden die Konzentrationen der Katecholamine Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin in *Danio rerio* gemessen (Tab. 15). Die zur Messung herangezogenen Fische wurden auf verschiedene Art und Weise den Hälterungsbecken entnommen. In einem ersten Versuch wurden 7 Tiere mit einem Kescher direkt gefangen und augenblicklich in flüssigen Stickstoff überführt. Es konnten NoradrenalinKonzentrationen zwischen 108,6 ng/g Frischgewicht (Fw) und 294,3 ng/g gemessen werden (Abb. 74). Im Mittel lagen diese bei 207,7 ng/g. Ähnlich hohe Konzentrationen zwischen 51,0 und 247,6 ng/g wurden für Adrenalin festgestellt. Der Mittelwert aus 7 Probanden lag bei 145 ng/g. Dopamin war nur in einigen Fischen in sehr geringen Konzentrationen bis maximal 17,3 ng/g zu finden. Im Vergleich dazu, zeigten die Messungen an Tieren, die in ihrem Hälterungsbecken durch eine 350 mg/l haltige Tricain-Lösung getötet wurden, leicht geringere Katecholaminkonzentrationen (Noradrenalin zwischen 68,6 und 192,3 ng/g, Adrenalin zwischen 30,6 und 120,7 ng/g und Dopamin bis maximal 6,7 ng/g).

Tabelle 15: Gemessene Katecholaminkonzentrationen in *D. rerio* bei Anwendung verschiedener Fangmethoden.

FANGMETHODE	PROBEN- BEZEICHNUNG	NORADRENALIN (ng/g Fw)	ADRENALIN (ng/g Fw)	DOPAMIN (ng/g Fw)
Kescher	Kesch 1	109	248	17
	Kesch 2	294	212	2,2
	Kesch 3	122	66	8,1
	Kesch 4	263	112	n.d.
	Kesch 5	273	190	n.d.
	Kesch 6	173	51	n.d.
	Kesch 7	221	137	2,1
Betäubung mit 350 mg/l Tricain	Tric 350 1	69	40	n.d.
	Tric 350 2	136	68	6,7
	Tric 350 3	192	121	3,0
	Tric 350 4	98	31	n.d.
	Tric 350 5	164	53	n.d.
	Tric 350 6	147	76	n.d.
	Tric 350 7	76	99	n.d.
	Tric 350 8	147	84	5,2
Betäubung mit 500 mg/l Tricain	Tric 500 1	30	26	8,1
	Tric 500 2	25	29	5,1
	Tric 500 3	9,6	7,6	3,6
	Tric 500 4	12	11	5,8
	Tric 500 5	34	36	5,1
	Tric 500 6	20	13	4,6
	Tric 500 7	7,8	3,2	5,6

n.d.: nicht detektierbar

**Abbildung 74:** Katecholaminkonzentrationen in *Danio rerio*. Die Probanden wurden a) durch Kescher ohne vorheriges Betäubung gefangen (Probenbezeichnung: „Kesch“) und b) durch

eine überhöhte Dosis Tricain (350 mg/l, bzw. 500 mg/l) vor der Entnahme aus dem Hälterungsbecken getötet („Tric 350“, bzw. „Tric 500“).

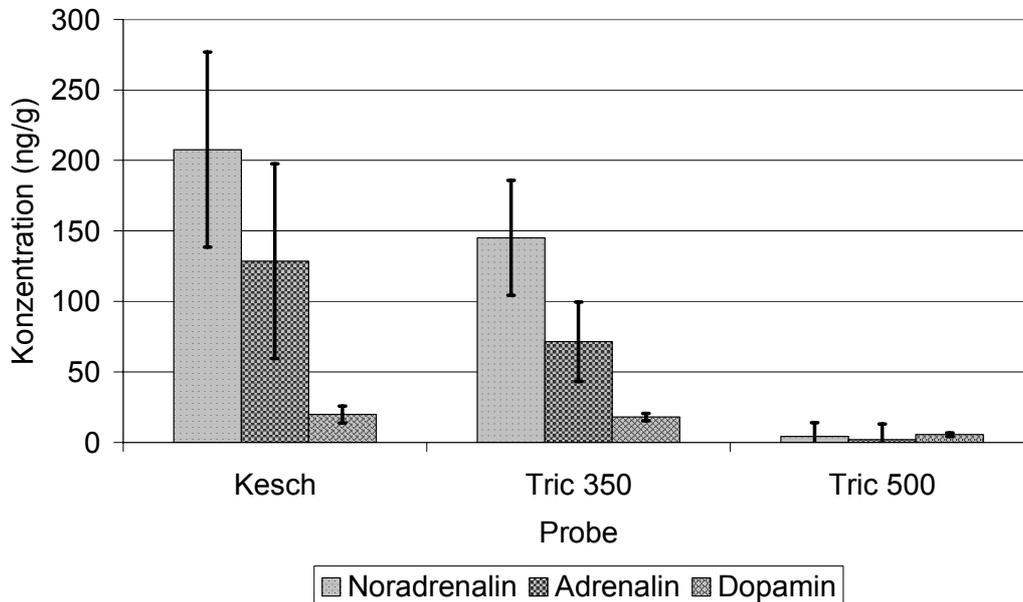


Abbildung 75: Katecholaminkonzentrationen in *Danio rerio* bei verschiedenen Fangmethoden. Die Probanden wurden zum einen durch Keschern ohne vorheriges Betäubung gefangen, zum andern durch eine überhöhte Dosis Tricain (350 mg/l, bzw. 500 mg/l) vor der Entnahme aus dem Hälterungsbecken getötet.

Die Mittelwerte aller Fische je Gruppe zeigten keine signifikanten Unterschiede im gegenseitigen Vergleich (Abb 75). Wird die Konzentration der zur Tötung verwendeten Tricainlösung auf 0,5 g/l erhöht, ließen sich in den Testtieren Katecholamine in weit geringeren Konzentrationen nachweisen. So konnte Adrenalin nur zwischen 7,6 und 35,5 ng/g und Noradrenalin zwischen 7,8 und 34,3 ng/g gemessen werden. Dopamin konnte in Konzentrationen zwischen 3,6 und 8,1 ng/g detektiert werden. Der aus 7 Tieren berechnete Mittelwert unterschied sich demzufolge signifikant von den Messungen der beiden anderen Methoden (Abb. 75).

Präzision der Messergebnisse

Die von Recipe durch mehrfache Bestimmung von Plasmaproben mit unterschiedlichen Konzentrationsbereichen (Intraassay Präzision) ermittelten Variationskoeffizienten, lagen für Noradrenalin bei 5,3%, Adrenalin bei 4,2% und Dopamin bei 3,9% (RECIPE 2001).

In eigenen Versuchen konnte durch Mehrfachbestimmung von Fischgewebeproben (Thunfischgehirn) eine Abweichung der einzelnen Messwerte vom arithmetischen

Mittel für Noradrenalin von 2,5%, für Adrenalin von 3,9% und für Dopamin von 0,8% bestimmt werden.

4. Diskussion

4.1. Funktionelle Parameter in den Mikrokosmen

Für die vorliegende Studie wurde ein Testkonzept gewählt, mit welchem hormonell induzierte Einflüsse auf aquatische Organismen und Lebensgemeinschaften abgeschätzt werden sollen. In Anlehnung an Versuche zur Risikoabschätzung von Pestizidbehandlungen, die im Rahmen von Zulassungsverfahren erforderlich sind (SETAC, Guidance Document on Testing Procedures for Pesticides in Freshwater Mesocosms) wurde ein Langzeit-Freiland-Mikrokosmenversuch durchgeführt, um akute, chronische und indirekte biologische Effekte zu erfassen.

Die Entfaltung der ökologischen Wirkung abiotischer Faktoren im komplexen Zusammenhang ermöglicht erst das Leben in der Biosphäre und ist zudem maßgeblich an deren Gestaltung beteiligt (BÄHRMANN et al. 1984).

Bezüglich der gemessenen abiotischen Faktoren konnten im Versuch mit 17α -EE über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und belasteten Mikrokosmen festgestellt werden. Ein Einfluss abiotischer Parameter in einzelnen Mikrokosmen, welcher zur Veränderung biotischer Parameter führen würde, kann somit als Ursache für mögliche Effekte ausgeschlossen werden. Gleiches gilt für den Versuch mit Trenbolon. Während sich die gemessenen Parameter pH, Ammonium und Nitrat über den gesamten Versuchszeitraum in den belasteten Mikrokosmen wie die Kontrollen verhielten, konnten für Leitfähigkeit und Sauerstoffsättigung vereinzelt Abweichungen in einigen belasteten Mikrokosmen von den Kontrollen beobachtet werden. Da dies aber bereits vor Beginn der Dosierung mit TB eintrat, bzw. eindeutige Abweichungen sich erst in den letzten Versuchswochen feststellen ließen und die betreffenden Systeme während der Applikationsphase dann wieder im Bereich der Kontrollen lagen, ist auch hier die Annahme gerechtfertigt, dass die Zugabe von Trenbolon den Verlauf funktioneller Parameter nicht beeinflusst hat.

Die in diesen Versuchen erhobenen funktionellen Parameter sind bezüglich absoluter Werte und Verläufe der einzelnen Kurven mit denen früherer Versuche (SEVERIN 2000, SEVERIN et al. 2003) vergleichbar, welche 1998 und 1999 in den selben

Testsystemen mit Nonylphenol und 17α -EE durchgeführt worden waren. Eine diesbezügliche Reproduzierbarkeit beim Einsatz von Mikrokosmen kann somit bestätigt werden. Vergleichbare Messungen am Ammersee berechtigen die Einstufung der Mikrokosmen hinsichtlich der erfassten physikalisch-chemischen Charakteristika als naturnahe Modellökosysteme.

4.2. Populationsdynamik

4.2.1. Endokrinologie des Zooplanktons

Um Aussagen über potentielle Wirkungen von Chemikalien auf das endokrine System von Zooplanktonorganismen machen zu können, müssen in die Untersuchungen Erkenntnisse zu Lebensparametern, Morphologie und Einflüssen lokaler Umweltbedingungen eingehen. Ein möglichst umfassendes Verständnis des endokrinen Systems ist zudem notwendig.

Die Regulation biologischer Prozesse, wie Wachstum, Entwicklung und Reproduktion durch Hormone ist Vertebraten und Invertebraten gemein. Allen Invertebraten sind einige generelle Gemeinsamkeiten gegeben, beispielsweise die Verwendung von Steroid-, Terpenoid- und Peptidhormonen (GORBMAN und DAVEY 1991). Ebenso ist die starke Vernetzung des nervösen Systems mit dem endokrinen System wie in allen Vertretern des Tierreiches zu finden (DEFUR et al. 1999). Obwohl das endokrine System bei Invertebraten noch nicht umfassend beschrieben ist, muss dennoch davon ausgegangen werden, dass es im Vergleich zu den Vertebraten noch diverser angelegt ist. So werden z.B. von diesem Lebensabschnitte gesteuert, die viele Vertebratengattungen nicht durchlaufen, also z.B. Metamorphose, Diapause und Verpuppung. Zwar konnten bereits in einigen Invertebratenstämmen für Vertebraten typische Hormone nachgewiesen werden (VOOGT et al. 1985; DELOOF und DECLERCK 1986; HINES et al. 1992), jedoch konnten zu deren Wirkung in Invertebraten meist keine Angaben gemacht werden.

4.2.2. Endokrinologie der Crustacea

Untersuchungen zum endokrinen System der Crustaceen wurden vor allem an größeren Dekapoden durchgeführt. In Studien von 1925 und 1927 weist Koller Pigmentation als hormongesteuerten Prozess in Spezies wie *Crangon*, *Palaemon*, *Palaemonetes* und *Uca* nach.

1966 isolierten HORN et al. Ekdysteroide aus Hummern, welche für die Häutung verantwortlich sind. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Ekdysteroide der Crustaceen mit denen der Insekten identisch sind. Ekdyson-Sekretion bei Crustaceen wird dabei durch die inhibitorische Wirkung eines Neuropeptids gesteuert.

ZOU und FINGERMAN, (1997), führten Studien durch, in welchen Effekte fünf verschiedener Xenobiotika (2,4,5-Trichloribiphenyl (PCB29), Aroclor 1242, Diethylphthalate, Lindan und 4-Octylphenol) auf das Häutungsverhalten von *D. magna* untersucht wurden. Daphnien, welche PCB 29, Aroclor 1242 und Diethylphthalat ausgesetzt waren, brauchten dabei signifikant länger, um vier Häutungszyklen zu beenden. Es lag die Vermutung nahe, dass die Hydrophobizität und Molekülstruktur einer Substanz als ein Maß für die Bindungskapazität an den Ecdysteroid-Rezeptor dienen kann, da Substanzen mit mehreren Ringen eine größere Ähnlichkeit mit dem Häutungshormon der Arthropoden (Ecdysteroid) zeigen, als solche mit nur einem Ring. ZOU und FINGERMAN postulierten die Hypothese, dass einige Xenobiotika, welche endokrine Prozesse in Vertebraten stören, ebenso mit dem hormongesteuerten Häutungsprozess der Arthropoden interferieren können, indem sie als Antagonisten agieren, die durch Bindung an den Ecdysteroid Rezeptor diesen blockieren.

Ebenso wurden in verschiedenen Dekapoden Spezies Neuropeptide gefunden, die beispielsweise die Vitellogenin-Synthese hemmen (SOYEZ et al. 1991).

Während Sexualsteroiden wie 17 β -Estradiol (DELOOF and DECLERK 1986), Testosteron (BURNS et al. 1984) und Progesteron (KANAZAWA and TESHIMA 1971; YANO 1985) in Malacostraca zwar gemessen wurden, aber deren Hormonwirkung nicht vollständig nachgewiesen ist, fanden MARTIN et al. 1990 in der Androgendrüse von *Armadillidium vulgare* (Isopoda) zwei Proteine mit androgener Hormonaktivität. In Experimenten mit der Dekapodenspezies *Macrobrachium Rosenbergii* führte die Entfernung der

Androgendrüse zu einer Feminisierung männlicher Garnelen (NAGAMINE et al. 1980a, 1980b), dagegen hatte eine Implantation dieser Drüse in weibliche Tiere eine Maskulierung zur Folge. Die Regulierung der sexuellen Differenzierung bei Vertretern der Klasse der Malacostraca („höhere Krebse“ z.B.: Dekapoden, Isopoden, Amphipoden, etc.) durch Androgene ist somit nicht von der Hand zu weisen.

4.2.3. Entwicklung der Kontrollmikrokosmen

Wie auch in natürlichen Gewässern (SOMMER 1989), müssen populationsdynamische Entwicklungen in den Mikrokosmen unter Berücksichtigung einer ablaufenden Sukzession betrachtet werden. Unter Sukzession werden hierbei Populationsentwicklungsreihen aquatischer Organismen verstanden. Diese wurden im Zeitrahmen des jeweiligen Versuches durch direktes Beobachten der Populationsentwicklungen bestimmt.

Sukzession kann als Gradient der Populationsentwicklung im Verlauf über die Zeit („gradient in time model“, PICKETT 1982) aufgefasst werden, wobei in diesem Fall Sukzession als Aufeinanderfolge von Arten abläuft, die an einem Ort zufällig vorhanden sind und die sich aufgrund jeweiliger Reproduktions- und Ausbreitungsstrategien sowie physiologischer Eigenschaften zeitlich nacheinander ablösen.

Nach dem „Competitive-Sorting-Model“ von MARGALEF (1968) etablieren sich jeweils die Arten, die an eine Situation innerhalb einer Sukzession besonders gute Anpassungen zeigen. Hier wird Konkurrenz innerhalb beteiligter Arten in den Vordergrund gerückt. Sukzession lässt sich nach diesem Modell in ein Pionier-, ein Übergangs- und ein Endstadium einteilen, die wiederum in eine Initial-, eine Optimal- und eine Degenerierungsphase gegliedert sind.

Der Verlauf einer Sukzession ist durch verschiedene Mechanismen geprägt. So spielt beispielsweise die Fitness von Organismen eine bedeutende Rolle. Fitness wiederum hängt von vielen „vitalen Merkmalen“ der jeweiligen Art ab (NOBLE und SLATYER 1979), z.B. Reproduktionszeit und Anzahl der Nachkommen je Mutterorganismus. Eine Erhöhung der Fitness findet entweder durch Ausbildung von Fähigkeiten statt, um mit einem Selektionsdruck fertig zu werden (C-Selektion) oder

durch Flucht aus der Sukzession und Besiedelung eines Systems in einem frühen Sukzessionsstadium (R-Selektion) (HARPER 1977; GRIME 1986). Weiterhin sind für den Verlauf einer Sukzession sowohl die anfängliche Artenzusammensetzung bestimmend als auch mögliche Interaktionen von Arten, welche zu Lebensraumveränderungen führen können, die entweder das Ansiedeln neuer Arten ermöglichen oder diese blockieren (CONNEL und SLATYER 1977). Schließlich wird Sukzession auch durch potentiell auftretende Störungen, welche zu Veränderungen im Ressourcenhaushalt des Systems führen, beeinflusst.

In den in den Mikrokosmen durchgeführten Versuchen kann aufgrund der Einrichtungsmethodik der Systeme in der vorliegenden Arbeit von primär sukzessiven Entwicklungen ausgegangen werden, die basierend auf Rohsystemen über mehrere Übergangsstadien schließlich zu einem Endstadium führen. Aufgrund der zeitlichen Begrenzung der Versuche, konnten jedoch lediglich Pionier- und einige Übergangsstadien erfasst werden.

4.2.4. Effekte von Xenobiotika auf das Zooplankton

Das Populationswachstum oder der Rückgang einer Art in einem Ökosystem hängt maßgeblich von dessen Nettoreproduktionsrate, also dem Produkt aus altersspezifischer Geburten- und Überlebensrate, ab.

$$\text{Nettoreproduktionsrate} = \sum_{x=t_1}^{t_2} (l_x \cdot m_x)$$

mit:

l_x : altersspezifische Überlebensrate

m_x : Geburtenrate

Der Rückgang oder sogar Zusammenbruch einer Zooplanktongesellschaft hängt also einerseits vom Überleben der adulten Tiere und deren Fähigkeit zur Reproduktion, aber auch von den Überlebens- und Reproduktionserfolgen nachfolgender Generationen ab. Geringe Überlebenschancen der Nachkommen können den Bestand einer Art innerhalb eines Ökosystems gefährden. So können über die interspezifische Konkurrenz bereits geringe Störungen der Reproduktion, wie z.B.

eine erhöhte Mortalität der Jungtiere, zum Rückgang einer Population führen (GUNKEL 1994). Durch Veränderungen im Nahrungsnetz, sind zudem Auswirkungen auf die übrigen Trophieebenen möglich.

Neben inter- und intraspezifischer Konkurrenz einzelner Arten spielen vor allem auch physikalische und chemische Fremdeinflüsse, welche zu Veränderungen biotischer oder abiotischer Parameter eines Ökosystems führen, eine große Rolle, wie beispielsweise der Eintrag von Xenobiotika. Gerade juvenile Tiere zeigen oft eine weit höhere Sensitivität gegenüber Xenobiotika als adulte.

So kann die Wirkung von Hormonen während der Entwicklung der Jungtiere im Muttertier physiologische Defekte verursachen (COLBORN et al. 1998), zu geringerer Fitness führen, aber auch die Sensibilität gegenüber Hormonen nach der Geburt erhöhen. Möglicherweise könnten diese dann bereits bei geringen Konzentrationen toxisch wirken. So wiesen FENT und STEGEMAN (1991) eine erhöhte Sterblichkeit bei Elritzen-Larven nach, die während der Embryonalphase einer Belastung durch Tributylzinn ausgesetzt waren. LÄNGE et al. (1997) stellten bei *Pimephales promelas* (Dickkopfelritzen), exponiert in 17α -EE (4,0 ng/l) signifikante Wachstumsstörungen und eine beeinträchtigte Eiproduktion fest. Ebenfalls für Fische wurde eine besonders hohe Sensitivität in ihren frühen Entwicklungsstadien gegenüber Östrogenen in der Umwelt gezeigt (PAPOULIAS et al. 1999). KORSGAARD et al. (2002) wiesen Störungen des Stoffwechsels zwischen Muttertier und Fötus in Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) nach, die in 17α -EE (5, 10, 50, 100, 500 ng/l) exponiert waren. Während bei der höchsten 17α -EE Konzentration in den Muttertieren ein Anstieg des Vitellogeningehaltes und der Calciumkonzentration im Plasma und ein Rückgang der im Blut zirkulierenden Aminosäuren zu verzeichnen waren, wurden in den Embryonen umgebenden Medien (Ovarien) ein signifikanter Calciumlevel Rückgang und leicht ansteigende Aminosäuregehalte beobachtet. Auch für Amphibien, Reptilien und Vögel ist bekannt, dass diese in ihren frühen Lebensstadien, insbesondere nach dem Schlüpfen, am empfindlichsten auf Umweltchemikalien reagieren (FENT 1998).

4.2.5. Entwicklung des Zooplanktons, Mikrokosmenversuch 2000, Testsubstanz 17 α -EE

4.2.5.1. Entwicklung der Rotatoria-Populationen

Für die Populationsdichte der Gruppe der Rotatoria ist ein typischer Verlauf beobachtet worden, wie dies bereits in früheren Versuchen der Fall war (SEVERIN 2000, SEVERIN et al. 2003). Nach der Einrichtung der Mikrokosmen konnten sich Vertreter dieser Gattung, bedingt durch spezifische Entwicklungsstrategien, schnell in den Mikrokosmen etablieren, die zu diesem Zeitpunkt noch Rohsystemcharakter aufwiesen. Durch kurze Reproduktionszeiten und mangels Konkurrenz anderer Zooplankter konnten sich Rotatoria-Populationen in sehr hohen Individuenzahlen bilden. Als Folge des so entstandenen Fraßdrucks nahm dann auch das anfänglich in hohen Gesamtzellichten vorkommende Phytoplankton von Woche 2 auf 3 stark ab. Eine parallel verlaufende Abnahme der Rotatoria war dann wohl Folge von abnehmendem Futterangebot und zunehmender Konkurrenz durch sich etablierende Zooplankter aus den Gruppen der Cladocera und Copepoda. Unterschiede zwischen belasteten und unbelasteten Mikrokosmen nach Applikation mit 17 α -EE konnten nicht beobachtet werden. Entweder wirkte 17 α -EE auf Rotatoria in den eingesetzten Konzentrationen also nicht, oder eventuelle Effekte wurden kompensiert.

4.2.5.2. Entwicklung der Cladocera-Populationen

In den Kontrollen zeigte sich zunächst eine sukzessions-spezifische Etablierung und Zunahme der Populationsdichte bis Woche 4. Der anschließende leichte Rückgang auf Populationsgrößen, die dann bis Woche 14 stabil blieben, basierte möglicherweise auf intraspezifischer Konkurrenz um Futter und/oder die Etablierung geeigneter Lebensräume, verbunden mit dem Auftreten zooplanktischer Räuber. Ab Woche 14 fand nochmals ein Anstieg der Populationen statt, der bis Ende des Versuches zu anhielt.

MK A und B: lagen meist im Bereich der Kontrollen oder darüber, vereinzelt während der Applikation mit 17 α -EE oder in der Nachlaufphase auch darunter.

Geringere Individuendichten in den MK C, D, E und F, die ab Beginn der Applikation im unteren Bereich der Kontrollen lagen, oder sogar darunter, bzw. ein kompletter Zusammenbruch der Cladocera-Populationen in E und F in der zweiten Hälfte der Applikationsphase, deuten möglicherweise auf direkte Effekte auf das endokrine System des Zooplanktons hin, ausgelöst durch eine Exposition in 17 α -Ethinylestradiol. Einflüsse von Xenobiotica auf Entwicklung und Reproduktion von Cladocera wären denkbar. SUBRAMONIAM (2000) weist darauf hin, dass Häutungshormone (Ekdysteroide) in Crustaceen auch auf Reproduktion und Embryogenese kontrollierend wirken. Expositionsversuche mit Daphnien in 20-Hydroxyekdyson legen die Vermutung nahe, dass Ekdysteroide und das Juvenilhormon eine Rolle in der Geschlechtsdeterminierung der Daphnien spielen (PETERSON et al., 2001). GERRITSEN et al. (1997) vermuten eine Störung der Sexualdifferenzierung in Cladocera durch endokrine Disruptoren. Morphologische Änderungen wie sie für männliche Tiere üblich sind, waren nach Exposition weiblicher Tiere in p-tert.-Pentylphenol beobachtet worden. Ebenso wurden in *Daphnia magna* bei Zugabe des Juvenilhormon-Analogons der Insekten (Altosid ZR-515) Effekte auf die Reproduktion gefunden (TEMPLETON und LAUFERER 1983). Von einigen Chemikalien ist bekannt, dass diese die Einleitung einer Diapause stimulieren, welche bei Crustaceen wahrscheinlich wie bei Insekten neuro-endokrin kontrolliert ist. DODSON et al. (1999) wiesen die vermehrte Produktion männlicher Nachkommen bei Exposition in Atrazin nach, was sich in einer Dosis-Wirkungs-Korrelation darstellen lässt. TRAYLER und DAVIS (1996) gelang es, bei sich parthenogenetisch fortpflanzenden Daphnien die Produktion von Dauereiern durch Anwendung des Wachstumsregulators juveniler Insekten Pyriproxifen, auszulösen. Auch ist für Nonylphenol eine Wirkung auf die sexuelle Determination und Entwicklung bei Daphnien (SHURIN et al. 1997), bzw. eine induzierte Androgenisierung und reduzierte Fruchtbarkeit nachgewiesen (BALDWIN et al. 1997). Chronische Effekte auf die Reproduktion und die Beeinträchtigung des Testosteron-Metabolismus in Daphnien nach Exposition in Diethylstilbestrol, konnte ebenfalls gezeigt werden (BALDWIN et al. 1995). Die hier beschriebenen Beispiele deuten eine Sensitivität hormonell gesteuerter Prozesse, speziell bei der Reproduktion, in Cladocera an. LAESSIG et al. (1999) weisen darauf hin, dass die Entwicklung und Reproduktion von Invertebraten von einem hoch entwickelten neuroendokrinen System abhängig sind, wie es in allen Tieren der Fall ist. Zu diesem Schluss kommt

auch HUTCHINSON (2002), der das Auftreten von Imposex und die Blockade der Cytochrom P450 Aromatase (ALZIEU 2000; VOS et al. 2000) bei an TBT exponierten Schnecken beschreibt., Es wird vermutet, dass TBT-induziert die Exkretion von Testosteron und die Freisetzung eines neuroendokrinen Faktors des Pleuralganglions unterdrückt wird, was zu Imposex führt (MATTHIESSEN and GIBBS, 1998; DEFUR et al., 1999). In eigenen Studien (JASER et al. 2003) konnte eine geringere Nettofortpflanzungsrate von *Ceriodaphnia reticulata* in 17α -EE Konzentrationen ab 80 bis 300 $\mu\text{g/l}$, bedingt durch eine kürzere Reproduktionsphase, eine erhöhte Mortalitätsrate der Juvenilen ab 200 $\mu\text{g/l}$ sowie eine signifikant kürzere Juvenilphase von *Sida crystallina* ab 100 $\mu\text{g/l}$ 17α -EE in Single Species-Tests nachgewiesen werden. Störungen durch Fremdstoffe in ihrer Umwelt, speziell östrogen wirksamer Substanzen wie 17α -Ethinylestradiol, welche durch direkte Effekte auf endokrin gesteuerte Prozesse als Folge die Verschiebung von Individuendichten haben, erscheinen deswegen auch in den durchgeführten Mikrokosmenversuchen als wahrscheinlich. Allerdings ist bislang nicht bekannt, welche neuroendokrinen Signale z.B. sexuelle Reproduktionsmechanismen bei Cladocera auslösen, so dass die Zuweisung direkter Effekte auf eine Substanz sich lediglich auf Vermutungen stützen kann. Ebenso sprechen die sich in der Nachlaufphase abzeichneten steigenden Individuenzahlen in einigen belasteten Mikrokosmen für eine „Recovery“ der Abundanzen, die nach dem Verschwinden der Testsubstanz aus dem Freiwasser auftritt.

4.2.5.3. Entwicklung der Copepoda-Populationen

Die Copepoda-Gesellschaften in den Kontrollmikrokosmen etablierten sich im Vergleich zu Rotatoria und Cladocera erst relativ spät, ab Woche 6. Bis Woche 19 war ein stetiger Anstieg der Individuendichten in den Kontrollen zu beobachten, anschließend, wahrscheinlich aufgrund schlechter werdender Umwelteinflüsse und wegen limitiert zur Verfügung stehender Nahrung, wie z.B. der kühler werdenden Wassertemperatur, war ein konstanter Rückgang zu verzeichnen.

Die Copepoda-Abundanzen in MK A lagen meist im Bereich der Kontrollen oder sogar darüber. In den belasteten Mikrokosmen B, C, D und E entwickelten sich Copepoda-Gesellschaften erst nach Ende der Applikationsphase mit im Vergleich zu den Kontrollen, weit geringeren Individuendichten, bzw. nach einem kurzen

Erscheinen einiger weniger Individuen, fielen die Copepoda wieder aus. In der Postapplikationsphase wurde hinsichtlich der Copepoda-Individuenzahlen nur vereinzelt das Niveau der Kontrollen erreicht. In F zeigte sich ab Beginn der Applikationsphase zunächst eine Entwicklung mit steigenden Individuendichten vergleichbar zu der in den Kontrollen. In Woche 10 jedoch brachen die Copepoda-Populationen plötzlich zusammen und blieben bis Woche 13, wie auch in den übrigen belasteten Mikrokosmen außer A, mit nur sehr niedrigen Abundanzen erhalten oder fielen teilweise sogar komplett aus. Möglicherweise traten auch hier Effekte durch 17α -EE ein, die sich, wie für die Cladocera bereits diskutiert, auf Entwicklung und Reproduktion auswirkten, wobei sicherlich die Art und Dauer der Metamorphose der Larven zum adulten Tier eine Rolle spielte. Die je nach Umweltbedingungen meist über 10 Tage dauernde Entwicklung der Copepoda über mehrere Nauplia- und Copepoditstadien bis hin zum geschlechtsreifen Tier findet im Gegensatz zu den Cladocera, bei denen sich die Jungtiere im Carapax des Muttertieres entwickeln, im Freiwasser statt. Das Durchlaufen larvaler Stadien wird von mehreren Häutungen begleitet. Die Steuerung des Häutungsvorganges bei Crustaceen durch hormonell wirksame Substanzen wurde bereits beschrieben. Weitere Studien belegen die Hemmung der Häutung bei Crustaceen durch Schwermetalle (WEIS et al. 1992) polychlorierte Biphenyle (PCBs) (FINGERMAN und FINGERMAN 1977), Benzen (CANTELMO et al. 1981) und Vertebraten Östrogene (BALDWIN et al. 1995; ZOU und FINGERMAN 1997). Durch Entwicklung im Freiwasser sind die Larven zudem einer Substanz stärker ausgesetzt als z.B. Juvenile, die durch ihre Entwicklung im Muttertier möglicherweise gegenüber einer Chemikalienbelastung weniger sensitiv reagieren. Weiterhin anzuführen ist die bereits beschriebene erhöhte Empfindlichkeit juveniler Tiere im Vergleich zu erwachsenen Tieren. Die Beeinträchtigung der Reproduktion durch Xenobiotika wurde bereits früher an Copepoda untersucht. Untersuchungen im Freiland, bei denen Copepoda an Probestellen, die durch Kläranlagenschlamm verunreinigt waren, gesammelt worden sind, zeigten an diesen abnormale sexuelle Entwicklungen, sogenannten Intersex (MOORE et al. 1991). BECHMANN (1997) verzeichnete reduzierte Überlebensraten und verminderte Fruchtbarkeit bei Copepoda induziert durch das östrogen wirksame Nonylphenol. ANDERSON et al. (2001) beobachteten die larvale Entwicklung der Copepoda-Spezies *Acartia tonsa*, welche bekannten Säugetier-Steroidhormon-Agonisten (Bisphenol A, Östradiol, Östron, 17α -EE, p-Oktylphenol,

Progesteron und Testosteron) und Antagonisten (Flutamid und Tamoxifen) ausgesetzt waren. Die Entwicklung der Nauplia-Larven war bei Exposition in 17α -Ethinylestradiol, Octylphenol und Tamoxifen stark beeinträchtigt. Dagegen konnten in einem 21 Tage Life-cycle Test mit der marinen Copepoda-Spezies *Tisbe battagliai* bis zu 17α -EE Konzentrationen von 100 $\mu\text{g/l}$ keine signifikanten Effekte auf Mortalität und Reproduktion im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Überleben und Entwicklung dieser Copepoda-Spezies waren demnach durch eine Exposition in 17α -EE nicht gehemmt (HUTCHINSON 1999). Dennoch können in naturnahen oder natürlichen Ökosystemen Effekte auf Zooplanktongesellschaften durch 17α -EE Einträge auftreten, welche aufgrund der Ergebnisse aus Laborstudien eigentlich nicht zu erwarten wären. So wäre zusätzlich zur Wirkung der estrogen aktiven Substanz auf Geschlechtsdifferenzierung und Reproduktion eine Beeinflussung der Entwicklung und Funktion der Zellen des Immunsystems möglich, wie es von Säugetieren bekannt ist. Weibliche Säuger haben einen höheren Immunoglobulin-Level als männliche und zeigen eine stärkere Reaktion des Immunsystems bei Immunisierung oder beim Auftreten von Infektionen (VERTHELYI, 2001). Das Immunsystem, das endokrine System und das Zentrale Nervensystem sind durch ein Netzwerk von Signalmolekülen (Zytokine, Hormone und Neurotransmitter) ineinander integriert, wobei über ein Set allgemeiner Rezeptoren agiert wird. Durch Störung des hormonellen Gleichgewichtes, beispielsweise durch eine Applikation von Xenoöstrogenen, wäre folglich auch eine Schädigung oder zumindest eine Schwächung des Immunsystemes denkbar, was als Folge zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Krankheitserregern führen könnte.

Eine Störung der Reproduktion und/oder Beeinflussung des Immunsystems kann letztlich zu geringeren Individuendichten bis hin zum Totalausfall einer Spezies führen. Die zeitlich verzögerte Etablierung der Copepoda in den belasteten Mikrokosmen nach Verschwinden der Substanz aus dem Freiwasser ist zudem Indiz für eine Wirkung von 17α -EE auf die Copepoda-Taxa. Eine Erholung der Copepoda-Populationen mit den Kontrollen vergleichbaren Abundanzen kann wahrscheinlich durch ungünstiger werdende Umwelteinflüsse, welche auch in den Kontrollen zum Rückgang der Individuendichten führten, in den belasteten MK nicht beobachtet werden.

4.2.5.4. Anzahl der Taxa, Diversität und Evenness

Während der Applikation mit 17 α -EE wurden zeitweise in den belasteten Mikrokosmen C, E und F im Vergleich zu den Kontrollen weniger Taxa gezählt. Auffällig hierbei ist besonders, dass in diesen drei Mikrokosmen zunächst bis Woche 8 bzw. 9 im Vergleich zu den Kontrollen höhere Taxazahlen beobachtet worden waren. Ab Mitte der Applikationsphase nehmen diese dann aber tendenziell ab. Nach Ende der Applikation wurden dann vor allem in den hochdosierten Mikrokosmen E und F eine erneute Zunahme der Taxazahlen beobachtet, möglicherweise ein Anzeichen für eine Erholung der Zooplankton Gesellschaften von der eingesetzten Chemikalie.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das Verschwinden einiger Arten in den hochdosierten Mikrokosmen auf die Wirkung von 17 α -EE zurückzuführen ist. Wie leicht Invertebratengesellschaften durch geringe Mengen an Xenoöstrogenen beeinflusst werden, zeigen Studien von WATTS (2002). Watts exponierte *Chironomus riparius* (Diptera) über 2 Generationen in 17 α -EE und Bisphenol A . Die Dauer bis zum Auftreten und das prozentuale Auftreten von erwachsenen Tieren wurde durch beide Substanzen beeinflusst. Bereits bei sehr geringen 17 α -EE Konzentrationen (1 ng/l) traten sowohl in der 1. wie auch in der 2. Generation erwachsene Tiere signifikant früher auf als in den Kontrollen. Die Exposition von *Gammarus pulex* Populationen in 17 α -EE (0,104-7,5 μ g/l) für 100 Tage führte zu einem signifikanten Rückgang der Populationsgrößen und der Größenverhältnisse der Weibchen in höheren 17 α -EE Konzentrationen. Ein Ausfall an Taxa schlägt sich natürlich auch in Diversität und Evenness nieder, in deren Berechnung ja Anzahl der Taxa und Anzahl verschiedener Individuen eingehen. So ist ein Rückgang von Diversität und Evenness in der zweiten Hälfte der Applikationsphase als Folge der Artenverarmung in diesen Mikrokosmen zu verstehen.

4.2.6. Entwicklung des Zooplanktons, Mikrokosmenversuch 2001, Testsubstanz TB

4.2.6.1. Entwicklung der Rotatoria-Populationen

Aufgrund kurzer Reproduktionszeiten, günstigem Nahrungsangebot und geringem Konkurrenzdruck anderer Organismengruppen, war es den Rotatoria zu Beginn des Versuches möglich, Populationen mit Dichten von mehreren tausend Individuen pro Liter zu bilden. Bis zu Beginn der Applikationsphase sanken diese jedoch in allen Mikrokosmen aufgrund zunehmender Konkurrenz durch Cladocera und Copepoda ab, nach leicht ansteigenden Individuendichten wird in den Kontrollen ein relativ stabiles Niveau bis Versuchsende gehalten. A bis D entsprechen meist den Kontrollen. E und F weisen in der ersten Hälfte der Applikationsphase geringere Individuendichten auf. Die Kontrollen, sowie MK A bis D zeigen einen saisontypischen Verlauf, wie er bereits in früheren Versuchen beobachtet worden war (SEVERIN 2000, SEVERIN et al. 2003). Effekte durch Trenbolon, welche zu Populationsrückgängen führen, treten möglicherweise in den MK E und F auf.

Für die Rotatoria fällt zudem auf, dass nach Entnahme der Dosiereinrichtungen in A, B, D und F die Individuendichten im unteren 25% Quantil-Bereich der Kontrollen oder darunter liegen. Also liegt auch hier die Vermutung nahe, dass durch das Entnehmen eine kurzzeitige Konzentrationserhöhung stattfand die auf populationsdynamische Parameter des Zooplanktons Auswirkungen hatte

Die PRCs zeigen ebenfalls tendenzielle Abweichungen der belasteten Mikrokosmen vom Mittelwert der Kontrollen während der Applikation mit Trenbolon.

Das Auftreten von Reproduktions- und Entwicklungsstörungen durch Beeinflussung des Testosteronspiegels in Organismen durch Xenobiotika ist nicht auszuschließen. Jedoch ist noch nicht hinreichend bekannt, welche funktionelle Rolle Androgene bei Rotatoria, Cladocera und Copepoda spielen. BALDWIN und LEBLANC (1994a, 1994b) wiesen die Fähigkeit von *Daphnia magna* nach, Testosterone in verschiedene Derivate zu metabolisieren. LEBLANC geht außerdem aufgrund persönlicher Beobachtungen davon aus, dass Exposition weiblicher Daphnien in Testosteron zu Störungen bei der normalen Embryonalentwicklung führt. In weiblichen Krabben stimuliert eine Behandlung mit Testosteron die Umwandlung der Ovarien in Hoden

(SAROJINI 1963). Es ist auch bekannt, dass bei Malacostraca die Vitellogeninsynthese durch Androgene gesteuert wird (SUZUKI et al. 1990). Wird männlichen Isopoden (*Armadillidium vulgare*) die Androgendrüse entfernt, kommt es zu Vitellogeninsynthese durch den Fettkörper, implantiert man dagegen weiblichen Tieren eine Androgendrüse wird die Synthese von Vitellogenin im Fettkörper gehemmt. Für Cladocera und Copepoda muss allerdings noch bestätigt werden, ob endokrine Mechanismen, speziell Androgene, Prozesse wie sexuelle Differenzierung und eine eventuelle Synthese von Vitellogenin steuern.

4.2.6.2. Entwicklung der Cladocera-Populationen

Befanden sich die Mikrokosmen A bis F in Woche 5, also in der letzten Probenahme vor Dosierungsbeginn, noch im 50%-Bereich der Kontrollen, zeigten die MK B bis E einen Rückgang der Individuenzahlen nach Einsetzen der Dosiereinrichtungen im Vergleich zu den Kontrollen.

MK A und F blieben zunächst weiterhin im Bereich der Kontrollen. In MK A zeichnete sich ein stetiger Rückgang der Cladocera ab Woche 10 ab, auf Individuendichten weit unterhalb des Medians der Kontrollen. In F blieben die Individuendichten immer im Bereich der Kontrollen, allerdings fällt der plötzliche Rückgang in Woche 15 (also genau nach Entnahme der Dosiereinrichtungen) auf, auf den dann sofort wieder ein stetiges Wachstum der Cladocera-Population folgte. Ein ähnlicher Verlauf war auch in MK E zu sehen. Möglicherweise wurde bei der Entnahme der Dosiereinrichtungen durch das Herausziehen aus dem Wasser, ein verstärkter Transport der Testchemikalie aus den Schläuchen ausgelöst, was kurzzeitig zu einer schnellen Konzentrationserhöhung im Wasser geführt haben könnte. Diese haben sich möglicherweise negativ auf die Populationsdynamik der Cladocera ausgewirkt. Bisher wurden nur äußerst wenige Studien zur Wirkung androgener Stoffe auf Reproduktion und Entwicklung von Crustaceen, speziell Cladocera, publiziert. OLMSTEAD und LEBLANC (1998) konnten eine signifikante Hemmung der Ausbildung des Abdominalanhanges bei einer Exposition weiblicher Daphnien (*Daphnia magna*) in Testosteron und Androstendion nachweisen. Funktion des Abdominalanhanges ist, mögliche Bewegungen und die Sauerstoffversorgung der sich im Brutraum entwickelnden Embryonen zu unterstützen. Bei Juvenilen und männlichen Tieren ist dieser nicht vorhanden und entwickelt sich bei Weibchen bis zur Reproduktionsreife.

Die Körperlänge der in diesen Versuchen exponierten Tiere war jedoch ebenfalls reduziert, weswegen es problematisch ist, direkte Effekte auf die Geschlechtsdifferenzierung zu beschreiben. Studien an Säugern weisen auf die Fähigkeit von Trenbolon hin, sowohl kovalente Bindungen mit Zellproteinen (HOFFMANN et al. 1984), als auch mit der DNA (BARRAUD et al. 1983) eingehen zu können. Direkte Effekte durch Trenbolon auf das Reproduktionsvermögen von Cladocera wären somit also durchaus denkbar, was dann direkt zu einer Abnahme der Individuendichten führen würde, wie dies in den belasteten Systemen B, C und D beobachtet werden konnte. In diesen Mikrokosmen bleiben die Individuendichten lediglich im 25% Quantil-Bereich der Kontrollen, teilweise fällt die Gruppe der Cladocera sogar komplett aus.

Die in den belasteten Mikrokosmen mit Ausnahme von B und C nach Applikationsende auftretende Recovery der Populationen, die in manchen MK aber erst in den letzten Wochen des Versuches erkennbar war (z.B. A), spricht für TB induzierte Effekte auf die Cladocera. In den MK B und C wurde die Recovery entweder aufgrund des Versuchsendes nicht mehr erfasst, oder die Populationen waren bereits so stark geschädigt, dass eine Erholung nicht mehr möglich war.

4.2.6.3. Entwicklung der Copepoda-Populationen

In den Kontrollen ist ein stetiges Populationswachstum von der ersten Woche ab festzustellen mit einem Maximum in Woche 14, dem dann konstant abnehmende Individuendichten folgen, wie es auch bereits beim Vorjahresversuch beobachtet worden war.

Da in den MK A und B schon vor Applikationsbeginn deutlich geringere Individuendichten als die Kontrollen auftraten, die dann auch während und nach der Applikation zu sehen waren, ist eine Rückführung dieser Beobachtung auf Wirkung von TB wohl nicht ohne weiteres denkbar.

In MK F entwickelten sich die Populationen zunächst wie die in den Kontrollen, dann brechen diese in Woche 8 zusammen und steigen anschließend bis 14 wieder an.

Weiterhin fällt auf, dass nach Entnahme der Dosiereinrichtungen in allen belasteten Mikrokosmen die Individuendichten deutlich unter das Niveau der Kontrollen sanken,

anschließend fand wieder eine Annäherung statt. Das selbe Phänomen wurde bereits bei den Cladocera diskutiert.

Insgesamt konnten in den belasteten Mikrokosmen keine Verläufe festgestellt werden, die dem Trend der Kontrollen folgten. Vielmehr hat es den Anschein, als wäre die Entwicklung der Copepoda-Gesellschaft in unregelmäßigen Abständen immer wieder gestört worden sein. Wie bereits auf vorigen Seiten diskutiert, kann auch hier eventuell eine Wirkung von TB verantwortlich gemacht werden, die durch gruppenspezifische Entwicklungsmechanismen und die Dauer der Juvenilphase der Copepoda begünstigt wird, wodurch Effekte von Chemikalien unter Umständen stärker ausgeprägt sind als bei Rotatoria und Cladocera.

4.2.6.4. Anzahl der Taxa, Diversität und Evenness

In der ersten Hälfte der Applikationsphase waren in den mit Trenbolon belasteten Mikrokosmen leicht geringere Taxazahlen verglichen mit den Kontrollen feststellbar. Ansonsten blieben die belasteten MK mit wenigen Ausnahmen stets im Bereich der Kontrollen. Die zu Versuchsbeginn ermittelten Taxazahlen blieben während der gesamten Versuchsdauer konstant. Da mit den Probenahmen im Versuch 2001 im Vergleich zum Vorjahr später begonnen worden war, konnte das durch allmählichen Anstieg der Taxazahlen gekennzeichnete Pionierstadium in den Mikrokosmen nicht erfasst werden. Dafür spricht auch das von Anfang an beobachtete Auftreten von Cladocera in relativ stabilen Populationen. Konstante Taxazahlen sprechen allerdings für eine Stabilität der Biozöosen in den Mikrokosmen. Es wurden zwar immer wieder sukzessionsbedingt Ausfälle einzelner Taxa verzeichnet (z.B. in der Gruppe der Rotatoria), jedoch wurden diese auch stets durch neu auftretende Spezies ersetzt. Die Anstiege von Diversität und Evenness in den ersten Wochen in den meisten Mikrokosmen ist wohl, da die Anzahl der Taxa gleich bleibt, hauptsächlich auf das immer stärker werdende Auftreten der Copepoda zurückzuführen.

4.2.7. Intra- und interspezifische Wechselwirkungen in den Mikrokosmen

Da sich sowohl östrogen, als auch androgen induzierte Effekt auf das Zooplankton in den Mikrokosmen lediglich vermuten lassen, sollen im folgenden mögliche indirekte Effekte anhand eines Nahrungsnetzes, wie es wahrscheinlich in den Systemen zu finden war, diskutiert werden.

Folgendes stark vereinfachtes Nahrungsnetzmodell kann für die Erläuterungen der Verhältnisse in den Mikrokosmen herangezogen werden (nach SEVERIN 2000) (Abb. 76):

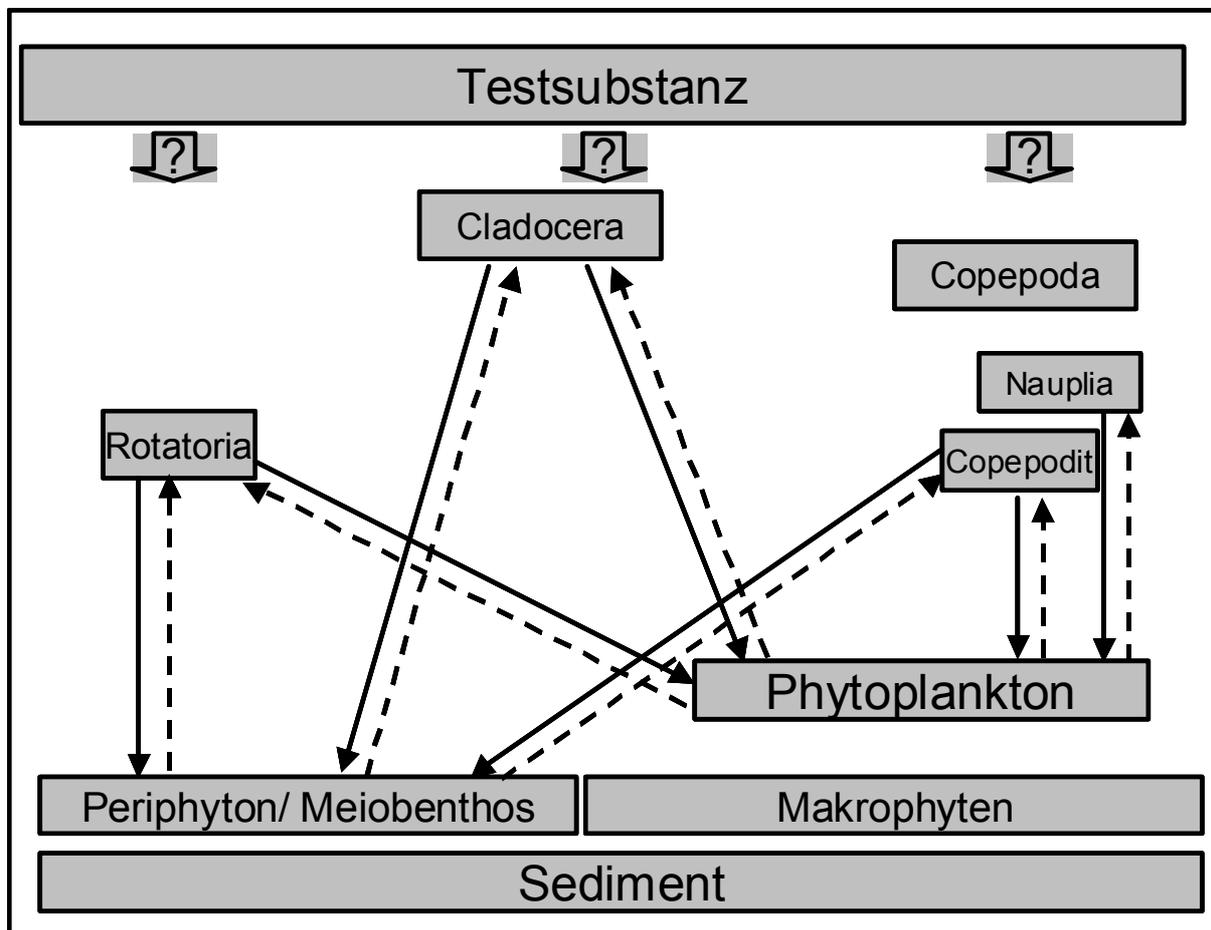


Abbildung 76: Nahrungsnetzgefüge in den Modellökosystemen nach SEVERIN 2000, vereinfacht. Durchgezogene Pfeile bedeuten Top Down, gestrichelte Bottom Up Steuerung.

Die Produktion von Biomassen, bzw. -volumina aller in einem Nahrungsgefüge vorkommenden Organismen wird von zwei Richtungen bestimmt. Es findet zum einen eine Einschränkung der Ressourcen „von unten“ statt, man spricht dann von „Bottom Up Steuerung“, zum anderen üben Konsumenten Druck „von oben“ aus,

sogenannte „Top down Steuerung“ (SCHWOERBEL 1993). Durch direkte Beeinflussung einer Organismengruppe, kommt es also auch zu indirekten Auswirkungen in anderen Gruppen.

4.2.7.1. Wechselwirkungen im Nahrungsnetz im Versuch mit 17 α -EE

In den Mikrokosmen sind generell herbivore Zooplankter in hohen Abundanzen und Biovolumina vertreten. Die im Vergleich zu den Kontrollen geringeren Biovolumina der Algenfresser ab der zweiten Hälfte der Applikationsphase in den Mikrokosmen C, D, E und F ist wahrscheinlich durch den Einfluss von 17 α -EE auf die Cladocera- und Copepoda-Populationen verursacht, da sich die Biovolumina der Räuber während des gesamten Versuchszeitraumes in diesen Mikrokosmen nicht von den übrigen belasteten und den Kontrollen unterscheiden und somit ein erhöhter Räuberdruck in den MK C, D, E und F auf herbivore Zooplankter auszuschließen ist. Die nach Ende der Applikation zunehmenden Biovolumina der herbivoren Zooplankter, einhergehend mit abnehmenden Zelldichten und Biovolumina der Phytoplanktongesellschaften bis zum Ende des Versuches in den Mikrokosmen sprechen ebenfalls dafür. Eventuelle Effekte auf Reproduktion, Immunsystem und Entwicklung führen demnach in den dosierten Mikrokosmen zu einem Rückgang der Individuendichten des Zooplanktons. Durch Ausfall ihrer Konsumenten in den Mikrokosmen C, E und F (B und D wurden nicht ausgewertet) kann sich in Folge das Phytoplankton stark entwickeln, was sich in einer Zunahme der Biovolumina sowie in hohen Chlorophyll-a-Gehalten ausdrückt. Während in den Kontroll-Mikrokosmen algenkonsumierende Zooplankter nach deren Etablierung in den Systemen vom Futterangebot kontrolliert werden, löst die direkte Einwirkung der Chemikalie auf Cladocera und Copepoda indirekte Effekte auf das Phytoplankton aus.

Ebenso ist eine direkte Wirkung auf Nematoda-Gesellschaften nicht auszuschließen. In Vorversuchen zur Wirkung von 17 α -EE auf Körperlänge und Anzahl der Nachkommen wurden direkte Effekte nachgewiesen. Reproduktionsvorgänge werden demnach zumindest in Laborversuchen beeinflusst. Inwieweit sich diese Feststellung auf die in den Mikrokosmen durchgeführten Experimente übertragen lässt, ist noch unklar. Eine Beurteilung der Bedeutung der Nematoda in dem für diese Versuche aufgestellten Nahrungsnetz ist derzeit nicht möglich.

4.2.7.2. Wechselwirkungen im Nahrungsnetz im Versuch mit TB

In den belasteten Mikrokosmen A, C und D wurden während der Applikation mit TB sowohl höhere Zelldichten als auch erhöhte Biovolumina des Phytoplanktons beobachtet. Gemessene erhöhte Chlorophyll-a-Gehalte in diesen Mikrokosmen sprechen ebenfalls für ein verstärktes Vorkommen phytoplanktischer Organismen. Die Biovolumina der herbivoren Zooplankter nahmen in den Mikrokosmen A, B, C und D teilweise schon ab Beginn, teils ab Mitte der Applikationsphase, ab. Durch Wegfall der Konsumenten, also der Top Down Steuereinheit, konnte sich in diesen Mikrokosmen das Phytoplankton verstärkt ausbreiten. Anders in MK F: hier führt das Vorkommen herbivorer Zooplankter in höheren Biovolumina zu, verglichen mit den Kontrollen, niedrigeren Phytoplanktendichten und -biovolumina. Effekte von TB auf das Zooplankton beeinflussen demzufolge indirekt die Phytoplanktongesellschaften.

Inwieweit die Nematoda-Gesellschaften direkt durch TB beeinflusst werden, ist nicht klar zu beantworten. Einerseits konnten in Vorversuchen zu Körperlänge und Anzahl Nachkommen pro Weibchen, direkte Effekte nachgewiesen werden. Während mit steigenden TB-Konzentrationen die Körperlängen von *Caenorhabditis. elegans* zunahmen, produzierten die Tiere bereits ab 0,05 µg/l TB signifikant weniger Jungtiere als die Kontrollen. Ein Einfluss von TB auf die Reproduktion würde demnach erwartet werden. Andererseits verhielten sich die Abundanzen sowohl sämtlicher bestimmter Meiobenthosorganismen als auch die der Nematoda in den belasteten Mikrokosmen, wie die in den Kontrollen. Im Vergleich zu diesen zeigt lediglich MK C höhere Abundanzen und höhere relative Häufigkeiten während der Applikationsphase. Negative Einflüsse von TB auf die Reproduktion, welche zu Populationsrückgängen führen, kommen in den MK C, D und F scheinbar nicht zum Tragen. Für mögliche direkte Effekte auf die Reproduktion spricht dagegen der Dominanzverlust der Nematoda in MK E ab der 3. Woche nach Applikationsbeginn. Mit den Bakterienfressern als dominantestem Ernährungstyp innerhalb der Nematoda, sind auch Erkenntnisse zu Bakterienzusammensetzung in den Mikrokosmen notwendig, um Zusammenhänge im Nahrungsgefüge korrekt diskutieren zu können. Derartige Untersuchungen werden zur Zeit am Institut für Bodenökologie der GSF betrieben.

4.3. Versuche zur Katecholaminanalytik

4.3.1. Methodenvergleich

In der vorliegenden Studie ging es darum, den Gehalt verschiedener Katecholamine in Bezug zu Stressoren zu setzen, die auf Organismen einwirken, um so neue ökotoxikologisch relevante Endpunkte für neue Testansätze definieren zu können. Zunächst war es wichtig, die Eignung diverser Spezies und Matrices für die Katecholaminmessung zu testen. Es konnten mit verschiedenen Methoden Katecholamine in aquatischen Vertebraten und Invertebraten nachgewiesen werden. Während sich durch Methode „Chloroformextraktion“ Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin sowohl in gesamten Schnecken, als auch in einzelnen Kompartimenten detektieren ließen, war diese Methode für Fische (Lachs) und *Daphnia magna* ungeeignet. Beste Ergebnisse ließen sich hier mit der „Plasmakit“-Methode erzielen. Es konnten sowohl in Schnecken, Fischen und Daphnien alle drei detektierbaren Katecholamine gemessen werden. Eine Kombination beider Methoden war für Schnecken und Daphnien weniger erfolgreich.

4.3.2. Versuche mit *Danio rerio*

Um *Danio rerio* in Versuchen zu Veränderungen des Katecholaminspiegels bei Einwirkung von Stress zu verwenden, war es notwendig einen sogenannten „Basic Level“ in möglichst ungestressten, gesunden Fischen zu erfassen.

Response auf Stress, z.B. ausgelöst durch Keschern, wie er bereits in anderen Arbeiten (ANDERSON 1990, WEDEMEYER 1970, MELOTTI et al. 1992) für Regenbogenforellen, Silberlachse und Bachforellen gezeigt worden war, bestätigen auch die Ergebnisse dieser Studie für *D. rerio*. Ebenso konnten, neben bereits beobachteten Effekten wie Erhöhung der Kortisolkonzentration, Neutrophilie, Lymphopenie und Hämokonzentrationen mit Steigerung der Hämoglobinkonzentrationen, Hämokritwerte und Erythrozytenzahlen (WEDEMEYER 1970, SMIT et al. 1979a, 1979b, FERREIRA et al. 1981, ISHIOKA 1984, LAIDLEY und LEATHERLAND 1988) erhöhte Adrenalin und Noradrenalinwerte, durch zu lange Induktionszeit des Betäubungsmittels als Zeichen für das Auftreten von Stress bestätigt werden. Bei Tricainkonzentrationen von 500 mg/l konnten signifikant

geringere Adrenalin- und Noradrenaliningehalte gemessen werden. In Tricainkonzentration von 500 mg/l entstehende Stressantworten konnten somit ausgeschlossen oder zumindest minimiert werden. Für weitgehend ungestresste Fische (500 mg/l Tricain) konnten Adrenalin und Noradrenalinwerte im Bereich von wenigen ng/g bis 35 ng/g und Dopaminkonzentrationen bis 8,6 ng/g Frischgewicht bestimmt werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen ist nun auch ein Einsatz der Katecholaminbestimmung in *D. rerio* in verschiedenen ökotoxikologischen Testansätzen zur Erfassung möglicher Effekte von Xenobiotika auf aquatische Organismen, speziell das endokrine System denkbar. Vorteile wie eine problemlose Standardisierbarkeit der Messmethode, sowie eine gute Reproduzierbarkeit, umfassendes Wissen über *D. rerio* (genetischer Code entschlüsselt) und eine mögliche Übertragung auf andere bereits in Ökotoxtest verwendeten Spezies, z.B. Cladocera oder Mollusca, liegen auf der Hand.

5. Zusammenfassung

Zielsetzung der Arbeit war es, mögliche Effekte von Xenobiotika auf aquatische Modellökosysteme, speziell auf das Zooplankton, zu untersuchen. Mit 17α -Ethinylestradiol (17α -EE) sollte exemplarisch eine östrogen, mit Trenbolon (TB) eine androgen wirksame Substanz getestet werden. Komplexität und Heterogenität der Mikrokosmensysteme lassen es zu, Verhalten einer Chemikalie sowie deren Einflüsse auf Biozönosen unter sehr ähnlichen Bedingungen zu betrachten, wie sie in natürlichen Ökosystemen gegeben sind. Zum einen ist somit die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf natürliche Gewässer, wenn auch sicherlich unter Vorbehalt, möglich, zum anderen kann eine darauf basierende Risikobewertung von Umweltchemikalien im Vergleich zu Laborstudien genauer abgeschätzt werden.

In der Mikrokosmenanlage der GSF wurden für die Versuche je 12 Edelstahlzylinder (230l Fassungsvermögen) mit Sediment und Wasser aus einer oligo-mesotrophen Litoralstelle des Ammersees (Süddeutschland, südlich von München) befüllt und mit Zooplankton angeimpft. Zur Dosierung der jeweiligen Testsubstanz wurden semipermeable LDPE-Schläuche verwendet, die eine kontinuierliche Diffusion der Testchemikalie in das Wasser ermöglichten, um so realistische Einträge von Umweltchemikalien, wie z.B. über Kläranlagen, zu simulieren. In wöchentlichen Probenahmen wurden funktionelle (Wassertemperatur, pH-Wert, Leitfähigkeit, Sauerstoffverhältnis und Nährstoffkonzentrationen) und strukturelle Parameter (Zoo- und Phytoplankton-, sowie Meiobenthosabundanzen) gemessen.

Die funktionellen Parameter blieben sowohl durch die Applikation mit 17α -EE, als auch mit TB unbeeinflusst. Diesbezüglich erwiesen sich die Mikrokosmen auch im Vergleich zu früheren Versuchen als reproduzierbar. Messungen der physikalisch-chemischen Werte des Ammersees (Sediment und Wasserentnahmestelle für die Installation der Mikrokosmen) deuten auf eine diesbezügliche Ähnlichkeit der Modellökosysteme zu natürlichen Systemen hin.

In Vorversuchen mit *C. elegans* (Nematoda) wurden Effekte auf Längenwachstum und Anzahl der Nachkommen sowohl bei Applikation mit 17α -EE, als auch TB beobachtet. Eine direkte Wirkung der Testsubstanzen auf das endokrine System dieser Nematoda-Spezies muss folglich angenommen werden. Basierend auf diesen Ergebnisse und Daten aus der Literatur war ein Einsatz von 17α -EE und TB in den

Mikrokosmen zur Beurteilung der Wirkungen auf Zooplankton-Gesellschaften begründet.

Nach Installation der Dosiereinrichtungen konnte in den belasteten Mikrokosmen ein rascher Anstieg der 17 α -EE Konzentrationen bis zu Maximalwerten zwischen 50 ng/l und über 400 ng/l gemessen werden. Einem Rückgang der 17 α -EE-Gehalte im Wasser wurde durch das Einbringen zusätzlicher Schlauchstücke in der Mitte der Applikationsphase entgegengewirkt. Absolute Maximalwerte zwischen 59 ng/l und über 720 ng/l wurden gegen Ende der Dosierungsphase gemessen. Insgesamt wurden in den 6 dosierten Mikrokosmen integrierte 17 α -EE Konzentrationen in Abstufungen zwischen 270 ng*d/l (A) und 12772 ng*d/l (F) erreicht. Wenige Tage nach Entnahme der Dosiereinrichtungen konnte 17 α -EE nicht mehr in der Wasserphase nachgewiesen werden. Nach spätestens 10 Tagen sanken die 17 α -EE-Konzentrationen in allen Mikrokosmen unter die Nachweisgrenze.

Da eine den Versuch begleitende Online-Messung der TB-Konzentrationen im Wasser nicht möglich war, wurden für die Arbeit pauschal zwischen belasteten und unbelasteten Mikrokosmen unterschieden. Die Analytik der entnommenen Sedimente konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr abgeschlossen werden.

Die sukzessionsbedingte Entwicklung der Zooplanktongruppen der Rotatoria, Cladocera und Copepoda in den Kontrollmikrokosmen im Versuch mit 17 α -EE ähnelte der früherer Versuche. Durch den jahreszeitlich späteren Versuchsbeginn im Versuch mit Trenbolon konnte die Etablierung der Rotatoria nicht erfasst werden. Die Populationsentwicklung der Cladocera und Copepoda geht mit den Versuchen aus 2000, 1999 (SEVERIN 2000) und 1998 (SEVERIN et al. 2003) konform.

Eine Applikation von 17 α -EE in den Mikrokosmen hat auf die Gruppe der Rotatoria scheinbar keinen Effekt. Im Vergleich zu den Kontrollen geringere Individuendichten der Cladocera und Copepoda und abnehmende Taxazahlen, mit entsprechenden Folgen für Diversität und Evenness in belasteten Mikrokosmen, während und nach der Applikationsphase, deuten auf einen Einfluss von 17 α -EE auf die Populationsdynamiken der Zooplankter hin. Zudem sprechen auf das Niveau der Kontrollen steigende Individuendichten der Cladocera nach Ende der 17 α -EE-Applikation für eine Erholung der Populationen in belasteten Mikrokosmen.

Im Experiment mit Trenbolon wurden für Rotatoria, Cladocera und Copepoda in einigen belasteten Mikrokosmen von den Kontrollen abweichende populationsdynamische Entwicklungen zu verschiedenen Zeitpunkten festgestellt. Auffällig ist ein Rückgang der Individuendichten bei den Rotatoria, Cladocera, und Copepoda in der ersten Woche der Postapplikationsphase auf die Entnahme der Dosiereinrichtung folgenden Woche.

Abweichungen der belasteten Mikrokosmen von den Kontrollen wurden mittels uni- (Kruskal-Wallis-Test) und multivariater (Principal-Response-Curve Methode) statistischer Verfahren unter Berücksichtigung der zeitlichen Verläufe innerhalb der Testsysteme überprüft und ausgewertet.

Anhand diverser Beispiele aus der Literatur konnte die Anfälligkeit hormonell gesteuerter Prozesse, wie Entwicklung und Reproduktion unter der Einwirkung von Xenobiotika, an verschiedenen Vertebraten und Invertebraten gezeigt werden. Wenngleich Daten aus Einzeltests auf natürliche oder naturnahe Systeme nicht ohne weiteres übertragen werden können, lassen diese doch Rückschlüsse auf den Einfluss von 17α -EE auf die Populationsentwicklung des Zooplanktons in den Mikrokosmen zu. Da noch erheblicher Forschungsbedarf zur Funktionsweise des endokrinen Systems der Invertebraten und zum Einfluss speziell androgen wirksamer Substanzen auf Entwicklung und Reproduktion der in der Studie betrachteten Zooplankter besteht, können hier nur bedingt Aussagen zum Einfluss von Trenbolon auf die Planktongesellschaften der Mikrokosmen getroffen werden.

In beiden Versuchen ermöglichte allerdings das Erstellen einfacher Nahrungsnetze, durch die intraspezifische Beziehungen berücksichtigt werden konnten, das Aufzeigen sowohl von Wechselwirkungen zwischen trophischen Ebenen in unbelasteten Systemen, als auch des Einwirkens von Substanzen durch indirekte Effekte über mehrere Trophieebenen hinweg.

Wie die Freilandversuche gezeigt haben, ist, um Aussagen zur Wirkungsweise von Substanzen auf Spezies- oder Populationsebene machen zu können, die Kenntnis hormonell gesteuerter Prozesse auf molekularer Ebene unbedingt notwendig. Der Einsatz der Katecholaminanalytik, wie er in der Humanmedizin zur Diagnostik verschiedener Krankheitsbilder bereits Verwendung findet, ist eine Möglichkeit zur Etablierung neuer Testansätze und Definition neuer Biomarker für die Ökotoxikologie.

Demzufolge wurden verschiedene Methoden zur Messung der Katecholamine Adrenalin (A), Noradrenalin (NA) und Dopamin (D) in diversen Matrices aquatischer Organismen getestet. Die aus der Humanmedizin stammende Methode Plasmakit (PK) konnte dabei auf Fische, Schnecken und Cladocera übertragen werden. In Vertretern dieser Gruppen konnten alle drei untersuchten Katecholamine (A, NA und D) nachgewiesen werden.

Aufgrund beschriebener Vorteile, wurde *Danio rerio* als weitere Testspezies herangezogen. Es konnte eine stressinduzierte Veränderung des Katecholaminspiegels aufgezeigt werden, sowie ein Basic-Level in ungestressten oder zumindest minimiert gestressten Fischen bestimmt werden. In weiteren Experimenten wäre es nun notwendig, die gewonnenen methodischen Erkenntnisse auf Testkonzepte zu übertragen, um so zur Aufklärung chemikalieninduzierter Effekte auf das endokrine System beitragen zu können.

6. **Ausblick**

Zur Einschätzung der Auswirkungen einer Chemikalienbelastung auf natürliche Ökosysteme, ist neben der Betrachtung negativer direkter Effekte auf einzelne Spezies, das Augenmerk auch auf daraus resultierende Einflüsse auf das Gesamtsystem zu richten. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten bereits anhand vereinfachter Nahrungsnetze Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Organismengruppen und die mögliche Einflussnahme eingebrachter endokriner Modulatoren aufgezeigt werden. Durch das Erfassen weiterer trophischer Ebenen könnte eine detailliertere Darstellung intraspezifischer Beziehungen erreicht werden und so weitere Erkenntnisse über direkte und indirekte Effekte bei Chemikalienapplikation auf die Biozöosen in den Mikrokosmen gewonnen werden. Denkbar wäre hierfür einerseits der Einsatz artifiziell geschaffener Räuber- Beutesysteme mit definierter Zusammensetzung, andererseits die Nutzung mathematischer Modellierungsansätze zur Beschreibung der Nahrungsnetze.

Zur Klärung der Wirkmechanismen von Xenobiotika wären weiterhin Untersuchungen zum Einfluss auf Genom-Proteom-Interaktionen an Einzelorganismen notwendig, was durch die Anwendung entsprechender Substanzen mit geeigneten, bekannten Wirkmustern, wie z.B. Zytostatika oder Antibiotika, unterstützt werden könnte.

Die durch den Einsatz der Katecholaminanalytik gewonnenen methodischen Erkenntnisse sollten in weiteren Experimenten auf Testkonzepte übertragen werden, um so zur Aufklärung chemikalieninduzierter Effekte auf das endokrine System beitragen zu können.

7. Literaturverzeichnis

Anderson G.L., Boyd W.A., Williams P.L. 2001: Assessment of sublethal endpoints für toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. Environ Toxicol Chem; 20: 833-838.

Arcand-Hoy LD, Nimrod AC, Benson WH. Endocrine modulating substances in the environment-oestrogenic effects of pharmaceutical products. Int J Toxicol 1998; 17:139-158.

Alzieu C. 2000. Impact of tributyltin on marine invertebrates. Ecotoxicology; 9: 71-76.

Baldwin WS, LeBlanc G.A. 1994a. Identification of multiple steroid hydroxylases in *Daphnia magna* and their modulation by xenobiotics. Environ Toxicol Chem; 13: 1013-1021.

Baldwin WS, LeBlanc G.A. 1994b. In vivo biotransformation of testosterone by phase I and II detoxication enzymes and their modulation by 20-hydroxyecdysone in *Daphnia magna*. Aquatic Toxicol; 29: 103-117.

Baldwin WS, Milan DL, LeBlanc JA. 1995. Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol. Environ Toxicol Chem; 14:945-952.

Baldwin WS, Graham S, Shea D, LeBlanc GA. 1997. Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. Environ Toxicol Chem; 16:1905-1911.

Bährmann R., Heinrich W., Marstaler R., Müller H.J., Schäller G., Hrsg.: Müller H.J. 1984. Ökologie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Barraud B., Lugnier A., Dirheimer G. 1983. In vivo covalent binding to rat liver DNA of trenbolone as compared to 17 β -estradiol, testosterone and zeranol. *Anabolics in Animal Production – Public health aspects, analytical methods and regulation*. Edt. E. Eissonnier, OIE, Paris.

Baronti C., Curini R., D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Saperi R. 2000. Monitorino natural and synthetic estrogens at activated treatment plants and in receiving river water. *Environ Sci Technol*; 34:5059-66.

Bechmann RK. 1997. Responses to toxic stress: life tables and reproductive parameters. PhD thesis. University of Oslo, Norway.

Belfroid A.C., Van der Horst A., Vethaak A.D., Schafer A.J., Ris G.B.J., Wegener J., et al. 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *Sci Total Environ*; 225:101-8.

Bongers T. 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*; 83: 14-19.

Bongers T., Alkemade R., Yeates G.W. 1991. Interpretation of disturbance-induced maturity decrease in marine nematode assemblages by means of the Maturity Index. *Mar Ecol Prog Ser*; 76: 135-142.

Bongers T., Ilieva-Makulec K., Ekschmitt K. 2001. Acute sensitivity of nematode taxa to CuSO₄ and relationships with feeding-type and life-history classification. *Environ Toxicol Chem* ; 20 : 1511-1516.

Burns B.G., Sangalang G.B., Freeman H.C., McMenemy M. 1984. Isolation of testosterone from the serum and testes of the American lobster (*Homarus americanus*). Gen Comp Endocrin; 54: 429-435.

Bushèe E.L., Edwards D.R., Moore P.A. 1998. Quality of runoff from plots treated with municipal sludge and horse bedding. Trans ASAE; 41:1035-41.

CAMPBELL, N.A., 1997. Biologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

Cannon W.B. 1914. The interrelations of emotions as suggested by recent physiological researchers. Am J Psych; 25: 256-282.

Cantelmo A.C., Lazell R.J., Mantel L.H. 1981. The effects of benzene on molting and limb regeneration in juvenile *Callinectes sapidus*. Mar Biol Lett; 2: 333-343.

Cantelmo F.R., Rao K.R. 1978. Effects of pentachlorophenol (PCP) on meiobenthic communities established in an experimental system. Mar Biol; 46: 17-22.

Carlsen E., Giwercman A. and Skakkebaek N.E. 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Brit. Med. 305, 609-613.

Clark E.J., Norris D.O. and Jones R.E. 1997. Interactions of Gonadal Steroids and Pesticides (DDT, DDE) on Gonaduct Growth in Larval Tiger Salamanders, *Ambystoma tigrinum*. Gen and Comp Endocrin 109: 94-105.

Colborn T., Dumanoski D. and Myers J.P. 1997. *Die bedrohte Zukunft*. Droemer Knaur, München.

COMER, R.J., 1995. Klinische Psychologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

Connel J.H., Slatyer R.O. 1977. Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *Amer Natur*; 111: 1119-1144.

Daxenberger A., Lange I.G., Meyer K., Meyer H.D.D. 2000. Residues of anabolic preparations in misplaced implantations sites. *J. AOAC Int.* 83: 809-819.

DeFur P.L., Crane M., Ingersoll C., Tattersfield L (Editors) 1999. Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing, and Assessment. Proceedings of the EDIETA Workshop. SETAC Technical Publication Series. ISBN: 1-880611-27-9.

DeLoof A., DeClerk D. 1986. Vertebrate-type steroids in arthropods: Identification, concentrations, and possible functions. In: Porchet M., Andriesm J.C., Dhainaut A. (Editors). *Advances in invertebrate reproduction 4*. Amsterdam: Elsevier; 117-123.

Deutscher Sportbund 2000. Anti Doping Kodex der Olympischen Bewegung.

Desbrow C., Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldlock MJ. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol*; 32 :1549-1558.

Eckert, R., 2000. Tierphysiologie. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Eidgenössisches Department für Verteidigung, Bevölkerungsschutz und Sport 2001. Verordnung des VBS über Dopingmittel und –methoden (Dopingmittelverordnung).

Enmin Zou and Milton Fingerman, 1997, *Ecotoxicol and Environ Saf* 38, 281-285.
Article No. ES971589

EPA 1997. Special report on environmental endocrine disruption: an effect assessment and analysis. EPA/630/R-96/012.

FAO Statistical Databases (<http://apps.fao.org>), Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs (MRLVDs) adopted by the Codex Alimentarius Commission up to and including its Twenty-second Session (July 1997) based on the advice of the Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods.

Fent K. 1998. *Ökotoxikologie, Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.

Fent K. and Stegeman J.J. 1991. Effects of tributyltin chloride on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish *Stenotomus chrysops*. *Aquat. Toxicol.* 20: 159-168.

Ferreira J.T., Smit G.L., Schoonbee H.J. (1981b). Haematological evaluation of the anaesthetic benzocain hydrochloride in the freshwater fish *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol*; 18: 291 - 297:

Fingerman S.W., Fingerman M. 1977. Effects of a polychlorinated biphenyl and polychlorinated dibenzofuran on molting of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Bull Environ Contam Toxicol*; 18: 138-142.

Gerritsen A., van der Hoeven N., Seinen W. 1997. Masculinization of female *Daphnia magna* due to treatment with p-tert-pentylphenol (TPP). Doctoral thesis. The Netherlands: Univ of Utrecht.

Gorbman A., Davey K. 1991. Endocrines. In: Prosser CL, editor. Neurel and integrative animal physiology. New York: Wiley-Liss; 693-754.

Greten H., 2001. Innere Medizin, Verstehen-Lernen-Anwenden. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Grime J.P. 1986. Plant strategies and vegetation processes. John Wiley & Sons, Chichester, 222 S.

Guang-Guo Ying, Rai S. Kookana, Ying-Jun Ru. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ Int*, 28 (2002) 545-551

Gunkel G. 1994. Bioindikation in aquatischen Ökosystemen. Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart 1994.

Harper J.L. 1977. Plant population biology. Academic Press, London, 892 S.

Heip, C. 1980. Meiobenthos as a tool in the assessment of marine environmental quality. *Rapp.P.V.Reun.Cons.Int.Explor.Mer.* 179, 182-187.

Hines G.A., Watts S.A., Sower S.A., Walker C.W. 1992. Sex steroid levels in the testis, ovaries, and pyloric caeca during gametogenesis in the sea star *Asterias vulgaris*. *Gen Comp Endocrin*; 87: 451-460.

Hoehn E, Ketelaars HAM, Ewig B. 1998. Erfassung und Bewertung von Planktonorganismen. ATT Technische Informationen Nr.7. 1998, R. Oldenbourg Verlag, München, Germany.

Hoffmann B., Schopper D., Karg H. 1984. Investigations on the occurrence of non-extractable residues of trenbolone acetate in cattle tissues in respect to their bioavailability and immunological reactivity. *Food Additives and Contaminants*; 1: 253-259.

Hopkins, T., Morgan, T., Mueller, D., Tomer, K., Kramer, K., 1995. Identification of Catecholamine β -Glucosides in the Hemolymph of the Tobacco Hornworm, *Manduca sexta* (L.), during Development. *Insect. Biochem. Molec. Biol.*; 25 (1): 29-37.

Horn D.H.S., Middleton E.J., Wunderlich J.A., Hampshire F. 1966. Identity of the molting hormones of insects and crustaceans. *Chem Commun*1966: 339-340.

Höss S., Traunspurger W. 2003. Nematodes, In Breure, AM, Markert, B, Zechmeister, H (Hrsg.), *Bioindicators/Biomonitors - Principles, Assessments, Concepts*, Elsevier, Amsterdam.

Hutchinson T.H., Pounds N.A., Hampel M., Williams T.D. 1999. Impact of natural and synthetic steroids on the survival, development and reproduction of marine copepods (*Tisbe battagliai*), *Sci Total Environ*; 233: 167-179.

Hutchinson T. H. 2002. Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicol Lett*; 131: 75-81.

Hüther G., Bonney H. 2002. Neues vom Zappelphilipp ADS: verstehen, vorbeugen und behandeln. Patmos Verlag GmbH und Co. KG, Walter Verlag, Düsseldorf; Zürich

Ishioka H. 1984. Stress response to transportation in the red sea bream, *Pagrus major*. *Bull Nansei Reg Fish Res Lab*; 16: 63-71.

Jaser W., Severin G.F., Jütting U., Jüttner I., Schramm K.-W., Kettrup A. 2003. Effects of 17 α -Ethinylestradiol on the reproduction of the cladoceran species *Ceriodaphnia reticulata* and *Sida crystallina*. *Environ Int*; 28:633-638.

Jobling S. and Sumpter J.P. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 27: 361-372.

Jobling S, Sheahan D., Osborn J., Mathiessen P. and Sumpter J.P. 1995. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol and Chem* 15: 194-202.

Johnson A.C., Belfroid A., Di Corcia A. 2000. Estimate steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci Total Environ*; 256:163-73

Jurgens M.D., Williams R.J., Johnson A.C., Research and Development Technical Report P161 for the Environment Agency 1999.

Jürgens M.D., Holthaus K.I.E., Johnson A.C., Smith J.J.L. 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environ Toxicol Chem*; 21:480-8.

Kalbfus W. 1995. Belastung bayerischer Gewässer durch synthetische Östrogene. 50. Fachtagung des Bayerischen Landesamtes für Wasserforschung, Institut für Wasserforschung. 7./8. Nov. 1995.

Kanazawa A., Teshima S. 1971. In vivo conversion of cholesterol to steroid hormones in the spiny lobster, *Panulirus japonicus*. *Bull Japan Soc Fish*; 37: 891-898.

Kelce W.R., Stone C.R., Laws S.C., Gray L.E., Kemppainen J.A., Wilson E.M. 1995. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*; 375:581-585.

Koller G. 1925. Farbwechsel bei *Crangon vulgrus*. *Verh Deutsch Zool Ges*; 30: 128-132.

Koller G. 1927. Über Chromatophorensystem, Farbensinn und Farbwechsel bei *Crangon vulgrus*. *Z Vergl Physiol*; 5: 191-246.

Kopf W. 1997. Wirkung endokriner Stoffe in Biotests mit Wasserorganismen, In: *Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie, Band 50, Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser* 82-101. R. Oldenbourg Verlag, München Wien.

Korsgaard B., Andreassen T.K., Rasmussen T.H. Effects of an environmental estrogen, 17 α -ethinyl-estradiol, on the maternal-fetal trophic relationship in the eelpout *Zoarces viviparous*. *Mar Environ Res* 54 (2002) 735-739.

Korthals G.W., Alexiev A.D., Lexmond T.M., Kammenga J.E., Bongers T. 1996. Long-term effects of copper and pH on the nematode community in an agroecosystem. *Environ Toxicol Chem* ; 15 : 979-985.

Kreyszig E. 1979. *Statistische Methoden und ihre Anwendung*. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen.

Kuch H.M., Ballschmitter K. 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the pictogram per liter range. *Environ Sci Technol*; 35:3201-6.

Lacoste, A., Malham, S., Cueff, A., Poulet, S., 2001. Stress-Induced Catecholamine Changes in the Hemolymph of the Oyster *Crassostrea gigas*. Gen Comp Endocrin; 122: 181-188.

Laessig S.A., McCarthy M.M., Silbergeld E.K. 1999. Neurotoxic effects of endocrine disruptors. Curr Opin Neurol; 12: 745-751.

Lai K.M., Johnson K.L., Scrimshaw M.D., Lester J.N. 2000. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. Environ Sci Technol; 34:3890-4.

Laidley C.W., Leatherland J.F. 1988. Cohort sampling, anaesthesia and stocking-density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J Fish Biol; 33: 73-88.

Lamshead P.J.D. 1986. Sub-catastrophic sewage and industrial waste contamination as revealed by marine nematode faunal analysis. Mar Ecol Prog Ser; 29: 247-260.

Länge R, Schweinfurth H, Croudace CP, Panter GH. Growth and reproduction of fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposed to a synthetic steroid hormone ethynylestradiol in a life-cycle test. 1997 SETAC-Europe 7th Annual Meeting, Amsterdam, 6-10 April 1997. Presentation Reference T1-3.3.

Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.E., Forlin L. 1999. Ethynylestradiol – an undesired fish contraceptive? Aquat Toxicol; 45(2-3):91-97.

Layton A.C., Gregory B.W., Seward J.R., Schultz T.W., Saylor G.S. 2000. Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee, USA. *Environ Sci Technol*; 34:3925-31.

Margalef F. 1968. *Perspectives in ecological theory*. Univ Chicago Press, Chicago, Illinois.

Martin G., Juchalt P., Sorokine O.A.V.D. 1990. Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacea, Oniscidea). *Gen Comp Endocrin*; 80: 349-354.

Matthiessen P. and Gibbs P.E. 1998. Critical Appraisal of the Evidence for Tributyltin-Mediated Endocrine Disruption in Mollusks. *Environ Toxicol and Chem* 17: 37-43.

McLachlan J.A. 1993. Functional toxicology: A new approach to detect biologically active xenobiotics. *Environ Health Perspect*; 101: 386-387.

Melloti P., Roncarati A., Garella E., Carnevali O., Mosconi G., Polzonetti-Magni A. 1992. Effects of handling and capture stress on plasma glucose, cortisol and androgen levels in brown trout, *Salmo trutta* morpha fario. *J Appl Ichthyol*; 8: 234-239.

Melzer A., Harlacher R., Held K., Vogt E. 1988. Die Makrophytenkartierung des Ammer-, Wörth- und Pilsensees sowie des Weißlinger Sees. Informationsbericht des Bayerischen Landesamts für Wasserwirtschaft 1988/1: 1-266.

Meyer H.H.D., Rapp M. 1985. Reversible binding of the anabolic steroid trenbolone to steroid receptors. *Acta Endocrinol*, 108 (267), 129.

Moore CG, Stevenson JN. 1991. The occurrence of intersexuality in harpacticoid copepods and its relationship with pollution. *Mar Pollut Bull*; 22:72-74

Nagamine C., Knight A.W., Maggenti A., Paxman G. 1980a. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de man) (Decapoda, Palaemonidae), with first evidence of induce feminization in a nonhermaphroditic decapod. *Gen Com Endocrin*; 41: 423-441.

Nagamine C., Knight A.W., Maggenti A., Paxman G. 1980b. Masculinization of female *Macrobrachium rosenbergii* (de man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation. *Gen Comp Endocrin*; 41: 442-457.

Nicols D.J., Daniel T.C., Moore Jr P.A., Edwards D.R., Pote D.H. 1997. Runoff of estrogen hormone 17 beta-estradiol from poultry litter applied to pasture. *J Environ Qual*; 26:1002-106.

Nicols D.J., Daniel T.C., Edwards D.R., Moore Jr P.A., Pote D.H. 1998. Use of grass filter strips to reduce 17 beta-estradiol in runoff from fescue-applied poultry litter. *J Soil Water Conserv*; 53:74-7

Noble I.R., Slatyer R.O. 1979. The effects of disturbance on plant succession. *Proc Ecol Soc Austr*; 10: 135-145.

Nusch, E.A. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol*;14: 14-36.

Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Leffler U.S., Bauer B., Fioroni P., Oetken M., Kayser G., Korhammer S., Markert B. 1996. Umweltchemikalien mit hormonähnlicher

Wirkung im Wasser – eine Gefahr für die Fortpflanzungsfähigkeit von Mensch und Tier? IHI-Schriften 2: S. 31 – 40.

Olmstead A.W., LeBlanc G.A. 1998. Effects of endocrine active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*. 19th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry; Charlotte NC.

Pagano et al. 2001 (Pagano G., de Baise, A., Deeva, I.B., Degan, P., Doronin Y.K., Iaccarino, M., Oral R., Trieff, N.M., Warnau M., Korkina, L.G., 2001. The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. Life Sci, 68, 1735-1749:

Papoulias D.M., Noltie D.B., Tillitt D.E. (1999). An in vivo model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: exposure to ethinylestradiol. Aqu Toxicol, 48, 37-50.

Peterson E.W., Davis R.K., Orndorf H.A. 2001. 17 β -Estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. J Environ Qual; 29:826-34.

Peterson J.K., Kashian D.R., Dodson S.I. 2001: Methoprexene and 20-OH-ecdysone affect male production in *Daphnia pulex*. Environ Toxicol Chem; 20 (3): 582-588.

Petrovic M., Eljarrat E., Lopez de Alda M. J., Barcelo D., 2001. Analysis and environmental levels of endocrine disrupting compounds in freshwater sediments. Trends Analyt Chem, vol. 20, no. 11

Pickett S.T.A. 1982. Population patterns through twenty years of oldfield succession. Vegetatio; 49: 45-59.

Prochnow, D. 1997. Schweb- und Schadstoffe der unteren Spree 1994-1996, Modellierung und Simulation des dynamischen Verhaltens von Schwebstoffen in eutrophen Fließgewässern. Berichte des IGB, 3, ISSN 1432-508X, Berlin 1997.

Purdome C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol*; 8:275-85.

Radix P., Severin G., Schramm K.-W. and Kettrup A. 2002. Reproduction disturbances of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) for the screening of environmental endocrine disruptors, *Chemosph*; 47(10):1097-1101.

Rajfer B., Sikka S.C., Handelsmann D.J. 1986. Mechanism of inhibition of human testosterone steroidogenesis by oral ketoconazole. *Clin Endocrin Met*; 63: 1193-1198.

Recipe, ClinRep® 2001. Arbeitsanleitung für die Bestimmung von Katecholaminen im Plasma mittels HPLC. Recipe Chemicals & Instruments GmbH, Version 3.0. 10/01, www.recipe.de.

Rehmann K., Schramm K.-W., Kettrup A. 1999. Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples. *Chemosph*; 38(14):3303-12.

Renz-Polster, H., Braun, J., 2000. Basislehrbuch Innere Medizin: kompakt-greifbar-verständlich. Urban & Fischer Verlag, München.

Sarojini S. 1963. Comparison of the effects of androgenic hormone and testosterone propionate on the female ocypod crab. *Curr Science*, 33:55-56.

Schiffer B., Daxenberger A., Meyer K., Meyer H.H.D. 2001. The fate of trenbolone acetate and melengestrol acetate after application as growth promoters in cattle: environmental studies. *Environ Health Perspect*; 109:1145-51.

Schweinfurth H, Länge R, Günzal P. Environmental fate and ecological effects of steroidal estrogens. 1996 Presented at the IBC Conference Oestrogenic Chemicals in the Environment. London, 9 and 10 May 1996.

Schwoerbel J. 1993. Einführung in die Limnologie. UTB für Wissenschaft / UNI Taschenbücher 31, 7. Auflage. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.

Severin G.F. 2000. Effekte hormonell wirksamer Substanzen auf das Zooplankton aquatischer Modellökosysteme. Dissertation. Technische Universität München.

Severin G.F., Welzl G., Jüttner I., Pfister G., Schramm K.-W. 2003. Effects of Nonylphenol on zooplankton in aquatic microcosms. *Environ Toxicol Chem*, Vol. 22, No. 11, pp. 92-97, 200

Seyle H. 1950. Stress and general adaption syndrome. *Br Meg J*; 1: 1383-1392.

Shore L.S., Correll D.L., Chakraborty P.K. 1995. Relationship of fertilization with chick manure and concentrations of estrogens in small streams. In: Steele K., editor. *Animal waste and the land-water interface*. Boca Raton, FL: CRC Press; 155-62.

Shurin JB, Dodson SI. 1997. Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in *Daphnia* sp. *Environ Toxicol Chem*; 16:1269-1274.

Smit G.L., Hattingh J. und Burger A.P. 1979a. Haematological assessment of the effects of the anaesthetic MS 222 in natural and neutralized form in three freshwater fish species: interspecies differences. *J Fish Biol*; 15: 633 - 643.

Smit G.L. und Hattingh J. 1979b. Anaesthetic properties of MS 222 and neutralized MS 222 as studied in three freshwater fish species. *Comp Biochem Physiol*; 55: 12 - 20.

Smith, A., 1977. Phenethylamine and related compounds in plants. *Phytochemistry*; 16: 9-18.

Snyder S.A., Keith T.L., Verbrugge D.A., Snyder E.M., Gross T.S., Kannan K., Giesy J.P. 1999. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environ Sci Technol*; 33:2814-20.

Sommer U. 1989. Toward a Darwinian ecology of phytoplankton. In: Sommer U. (Editor) 1989. *Plankton ecology: succession in plankton communities*. 1. Plankton-Ecology. Springer Verlag New York.

Soyez D., LeCaer J.P., Noel P.Y., Rossier J. 1991. Primary structure of 2 isoforms of vitellogenesis inhibiting hormone from the lobster *Homarus americanus*. *Neuropeptides*; 20: 25-32.

Soyka, 1991. *Kurzlehrbuch für Neurologie*. 5. Auflage. Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart

Seinhorst J.W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*; 4: 67-69.

Stefano, G., Hiripi, L., Catapane, E., 1977. The effects of short and long term temperature stress on serotonin, dopamine and norepinephrine concentrations in molluscan ganglia. *J. Thermal Biology*; 3: 79-83.

Stumpf M., Ternes T.A., Haberer K., Baumann W. 1996. Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser* 87:251-261.

Subramoniam T. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comp Biochem Phys Part C*, 125 (2000) 135-156

Suzuki S, Yamasaki K, Katakura Y. 1990. Vitellogenin synthesis in andrectomized males of the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare* (Malacostracan Crustacea). *Gen Comp Endocrin* 77:283-291.

Templeton N.S., Laufer H. 1983. the effects of a juvenil hormone analog (Altosid ZR-515) on the reproduction and development of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera). *J Invert Reprod*; 6: 99-110.

Ternes T.A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R.D., Servos M. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ*, 225:81 – 90.

Trayler K.M., Davis J.A. 1996. Sensitivity of *Daphnia carinata* sensu lato to the insect growth regulator, pyriproxyfen. *Ecotoxicol Environ Safety*; 33: 154-156.

Uexküll, Th. von, mit R. Adler, J.M. Herrmann, K. Köhle, O.W. Schonecke, W. Wesiack (Hrsg.): *Psychosomatische Medizin*. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1979, 2. Auflage 1981, 3.Auflage 1986, 4. Auflage 1990, 5. Auflage 1996, 6. Auflage 2002.

Utermöhl H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt Int Ver Theor Angew Limnol; 9:1-38.

Van den Brink P.J., Ter Braak C.J.F. 1999. Principal response curves: analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. Environ Toxicol Chem; 18 (2): 138-148.

Verthelyi D., 2001. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. Int Immunopharmacol, 1 (983-993).

Vonier P.M., Crain D.A., McLachlan J.A., Guillette L.J. and Arnold S.F. 1996. Interaction of Environmental Chemicals with the Estrogen and Progesterone Receptors from the Oviduct of the American Alligator. Environ Health Perspect, 104: 1318-1322. USA.

Voogt P.A., Broertjes J.J.S., Oudejans R.C.H.M. 1985. Vitellogenesis in sea star: Physiological and metabolic implications. Comp Biochem Physiol; 80A: 141-147.

Voronezhskaya E., Hiripi L., Elekes K., Groll, R., 1999. Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. Embryonic development of dopamine-containing neurons and dopamine-dependent behaviors. J Comp Neurol; 404: 285-296.

Vos J.G., Dybing E., Greim H., Ladefoged O., Lambré C., Tarazona J.V., Brandt I., Vetkaak A.D. 2000. Health effects of endocrine disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. Crit Rev Toxicol; 30: 71-133.

Vranken G., Tire C., Heip C. 1988. The toxicity of paired metall mixtures to the nematode *Monohystera disjuncta* (Bastian, 1865). Mar Environ Res ; 26 : 161-171.

WADA 2001. WADA, IOC Issue new list of prohibited substances and methods. IOC meeting, May 2001.

Walker, R. J., 1986. Transmitters and modulators. In.: Willows AOD, editor. The Mollusca. Orlando: Academic Press; 9: 279-485.

Warwick R.M., Clarke K.R. 1991. A comparison of some methods for analysing changes in benthic community structure. J Mar Biol Ass, UK 71: 225-244.

Watts M.W., Pascoe D., Carroll K., 2002 Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental oestrogen, 17 α -ethinylestradiol. Environ. Toxicol. Chem; 21, 445-450.

Wedemeyer, G. 1970. Stress of anaesthesia with MS-222 and benzocain in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish Res Board Can; 27: 1162 - 1164.

Weis J.S., Cristini A., Rao K.R. 1992. Effects of pollutants on molting and regeneration in Crustacea. Amer Zool; 32: 495-500.

Witorsch R. J., 2002, Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted?, Reg Toxicol and Pharmacol 36, 118-130 (2002).

Yamaguchi, S., Yokoyama, M., Iida, T., Okai, M., Tanaka, O., Takimoto, A., 2001. Identification of a Component that Induces Flowering of Lemna among the Reaction Products of α -Ketol Linolenic Acid (FIF) and Norepinephrine. Plant Cell Phys; 42 (11): 1201-1209.

Yano I. 1985. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp *Metapenaeus ensis*, by progesterone. *Aquacult*; 47: 223-229.

Ying G.G., Kookana R.S., Ru Y.J. 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ Int*, 28; 545-551.

Zou E., Fingerman M. 1997. Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Safety*; 38: 281-285.

Zullini A. 1976. Nematodes as indicators of river pollution. *Nematol Medit*; 4: 13-22.

Bestimmungsliteratur

Flößner D. 1972. Die Tierwelt Deutschlands. Krebstiere, Crustacea; Kiemen- und Blattfüßer, Branchiopoda; Fischläuse, Branchiura 60. Gustav Fischer Verlag, Jena.

Herbst H.V. 1976. Blattfußkrebse (Phyllopoden: echte Blattfüßer und Wasserflöhe). Franckh'sche Verlagsbuchhandlung, W. Keller & Co, Stuttgart.

Hildrew A.G. and Townsend C.R. (Editors) 2000. Freshwater Biology. 44 (1), ISSN 0046-5070, Blackwell Science LTD, UK.

Kiefer F. 1978. freilebende Copepoda. – In: Die Binnengewässer Band 26. Das Zooplankton der Binnengewässer 2. Teil. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart.

Koste W. 1978. Rotatoria – Die Rädertiere Mitteleuropas. I. Textband. Verlag Gebr. Borntraeger Berlin, Stuttgart.

Koste W. 1978. Rotatoria – Die Rädertiere Mitteleuropas. II. Tafelband. Verlag Gebr. Borntraeger Berlin, Stuttgart.

Krause Dellin D. 1997. Die Bestimmung des Zooplanktons in Flüssen und Seen. Lauterbornia 30. Dinkelscherben.

Ruttner-Kolisko A. 1972. Die Rotatoria. In: Die Binnengewässer Band 26. Das Zooplankton der Binnengewässer 1. Teil. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart.

Streble H., Krauter D. 1978. Das Leben im Wassertropfen. Franckh'sche Verlagshandlung Stuttgart.

Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. A. Kettrup für die Aufnahme am Institut für Ökologische Chemie, für die Vergabe des Themas und die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. habil. K.-W. Schramm für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, seine stetige Diskussionsbereitschaft in fachlichen und organisatorischen Fragen.

Frau Dr. G.F. Severin trug als Leiterin des Mikrokosmenprojektes maßgeblich zum Gelingen der Versuche bei. Für ihre fachlich kompetente Betreuung, ihr stets offenes Ohr für jegliche Fragen und Probleme und ihr großer Beitrag zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre sei ihr gedankt.

Herr Dr. B. Hense (Institut für Biomathematik und Biometrie) bearbeitete die Phytoplanktonproben und stellte mir seine Ergebnisse zur Verfügung. Hierfür sei ihm ebenso wie für seine Gesprächsbereitschaft bei Fragestellungen gedankt.

Herr Dr. G. Welzl (Institut für Biomathematik und Biometrie) half mir bei der statistischen Bearbeitung der Daten. Für seine aufgewendete Zeit und Geduld bei der Vermittlung des Verständnisses statistischer Analysen und zudem für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre sei ihm gedankt.

Mein Dank geht auch an Herrn Dr. G. Pfister für die Herstellung der Dosiereinrichtungen für die Mikrokosmen in beiden Versuchen und Durchführung der Analytik der Wasserproben.

Ich danke Herrn Dr. W. Beisker (Durchflußzytometrie) für die Durchführung der Messungen der Chlorophyll-a-Proben im Versuch mit Trenbolon und die Überlassung der Ergebnisse.

Herrn Univ.-Prof. W. Huber (Institut für Ökophysiologie und Botanik, TU München, Weihenstephan) danke ich für die Übernahme des Korreferates sowie die zeitweise Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut, wodurch die Messung der Chlorophyll-a-Proben im Versuchsjahr mit 17 α -Ethinylestradiol ermöglicht wurden. Außerdem danke ich den dortigen Mitarbeiter, insbesondere Herrn H. Grünwald für die Einweisung in entsprechende Gerätschaften.

Frau Dr. E. Knapik und Frau Dr. L. Bally-Cuif überließen mir *Danio rerio* aus dem Bestand des Institutes für Säugetiergenetik und gaben mir Hilfestellung bei der Haltung und Beprobung. Hierfür bin ich ihnen sehr dankbar.

Frau J. Kotalik möchte ich für die Einweisung in die HPLC-Anlage, welche zur Messung der Katecholaminproben verwendet wurde, sowie für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft bei der Lösung technischer Probleme danken. Mein Dank gilt ebenfalls Frau V. Meyer, die mir bei der Probenpräparation nützliche Tipps gab.

Besonderer Dank gebührt auch Frau I.U. Grande und Herrn A. Behechti für Hilfestellungen bei der Haltung von Daphnien und Bedienung diverser Geräte im Labor und die vielen nützlichen Tipps, sowie Herrn W. Bergheim für die Hilfsbereitschaft bei Computer-Problemen.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle, die bei der Einrichtung und Beprobung der Mikrokosmen während der Versuche beteiligt waren. Namentlich aufgeführt seien hier Frau V. Barbossa de Silva, F. Stadler, Frau J. Ruberg, Frau A. Sommer.

Besondere Erwähnung soll in diesem Zusammenhang auch die Zusammenarbeit mit Herrn M. Kasberger, mit dem mich zudem eine langjährige Freundschaft verbindet, finden. Neben seiner tatkräftigen Mitarbeit, waren es vor allem auch seine humoristischen Anmerkungen, die für eine stets gute Stimmung bei den Probenahmen sorgten.

Frau S. Theimer gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit während ihrer Diplomarbeitszeit am IÖC und das Überlassen ihrer Ergebnisse.

Weiter möchte ich allen Mitdoktoranden und Kollegen am IÖC, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Abschließend danke ich besonders meinen Eltern, meinen Brüdern Peter und Martin und meiner Freundin Gaby. Durch ihre vielfache Unterstützung haben sie mir das Anfertigen meiner Dissertationsarbeit sehr erleichtert und so zum Erfolg maßgeblich beigetragen.

Anhang

Tabelle 16: Zeitlicher Ablauf und Probenahmeschema des Versuchs mit 17 α -EE 2000.

VERSUCH ETHINYLESTRADIOL 2000				
Datum	Versuchswoche	ZP/ PP/ PC	WA	Chl <u>a</u>
22.05.00	1	+		
29.05.00	2	+		+
05.06.00	3	+		
07.06.00	3			+
12.06.00	4	+	+	
13.06.00	4			+
19.06.00	5	+	+	
20.06.00	5			+
21.06.00	5		+	
23.06.00	5		+	
26.06.00	6	+	+	
27.06.00	6			+
29.06.00	6		+	
03.07.00	7	+	+	
04.07.00	7			+
10.07.00	8	+	+	
11.07.00	8			+
13.07.00	8		+	
17.07.00	9	+	+	
21.07.00	9			+
24.07.00	10	+	+	
25.07.00	10			+
31.07.00	11	+	+	
02.08.00	11		+	
04.08.00	11		+	+
07.08.00	12	+	+	
08.08.00	12			+
14.08.00	13	+	+	
21.08.00	14	+	+	
22.08.00	14			+
28.08.00	15	+	+	
29.08.00	15			+
04.09.00	16	+	+	
05.09.00	16			+
11.09.00	17	+	+	
12.09.00	17			+
25.09.00	19	+		
09.10.00	21	+		
10.10.00	21			+
23.10.00	23	+		

+ Probenahme fand statt

Tabelle 17: Zeitlicher Ablauf und Probenahmeschema des Versuchs mit Trenbolon 2001.

VERSUCH TRENBOLON 2001				
Datum	VersuchsWoche	ZP/PP/PC	MB	Chl <u>a</u>
05.06.01	1	+		
12.06.01	2	+		
19.06.01	3	+		+
26.06.01	4	+		+
03.07.01	5	+	+	+
10.07.01	6	+	+	+
17.07.01	7	+	+	+
24.07.01	8	+	+	+
31.07.01	9	+		+
02.08.01	9		+	
07.08.01	10	+		+
09.08.01	10		+	
14.08.01	11	+		+
16.08.01	11		+	
21.08.01	12	+		+
23.08.01	12		+	
28.08.01	13	+		+
30.08.01	13		+	
04.09.01	14	+	+	+
11.09.01	15	+		+
18.09.01	16	+		+
25.09.01	17	+	+	
02.10.01	18	+		
16.10.01	20	+		+
18.10.01	20		+	

Tabelle 18: Liste der zur Einrichtung und Beprobung der Mikrokosmen notwendigen Geräte und Materialien in den Versuchen 17 α -EE und TB.

MATERIALLISTE MIKROKOSMEN	
Sedimententnahme aus Ammersee	
	VW-Bus, Anhänger
8	Plastikwannen je 100 l
2	PE Kanister, Deckel, (25 l)
1	Sieb Maschenweite 63 μ m
2	Plastikeimer mit Ausguss (10 l)
	Sackkarre
	Wattstiefel/-hose
	Schaufeln
	Gummihandschuhe
Befüllen der Mikrokosmen mit Sediment	
2	Sieb mit Maschenweite 0,5 cm
2	Plastikwannen (100 l)
2	Messbecher aus PP (2 l) mit Henkel und Ausguss
	Betonmischer
	Verlängerungskabel
2	Plastikeimer (10 l) mit Ausguss
	Gummihandschuhe
	Meterstab
	kreisförmige PE-Folienstücke (90 cm)
Wasserentnahme aus Ammersee	
	VW-Bus mit Anhänger
	PE Rundtank (1000 l)
5	PE Kanister (25 l) mit Deckel
	Seil/ Spanngurte
	Plastikeimer (10 l)
	Sieb mit Maschenweite 63 μ m
	Förderpumpe
	Schlauch
	Generator
	Verlängerungskabel
	Plastikeimer

Fortsetzung Tabelle 3: Liste der zur Einrichtung und Beprobung der Mikrokosmen notwendigen Geräte und Materialien in den Versuchen 17α-EE und TB.

MATERIALLISTE MIKROKOSMEN	
Befüllen der Mikrokosmen mit Wasser	
	Plastikeimer (10 l)
	Gaze mit Maschenweite 63 µm
Entnahme des Zooplanktons aus Ammersee	
	Planktonnetz mit Maschenweite 63 µm
	Analysensieb mit Maschenweite 2 mm
	flache weiße Fotoschale
	Federstahl-Pinzette
3	PE Kanister (25 l)
	Sieb mit Maschenweite 63 µm
	Plastikeimer
Beimpfung der Mikrokosmen mit Zooplankton	
	PE Ballon (20 l)
2	Messbecher hochtransparent (2 l)
Chemisch-physikalische Messungen	
16	Szintillationsgefäße
	Einmalfilter (0,45 µm)
	Einwegspritzen
	Macherey-Nagel Rundküvettentests
	MN-Photometer
	WTW Messgeräte und Sonden
	Schreibunterlage
	Tagesprotokoll

Fortsetzung Tabelle 3: Liste der zur Einrichtung und Beprobung der Mikrokosmen notwendigen Geräte und Materialien in den Versuchen 17 α -EE und TB.

MATERIALLISTE MIKROKOSMEN	
Plankton	
	Wasserschöpfer
	Eimer
	Gazefiltriereinrichtung
	Glastrichter
	Spritzflasche mit Leitungswasser
	Pumpzerstäuber
	Glasschraubgläser (50 ml) für Zooplankton
	Glasschraubgläser (100 ml) für Phytoplankton
	4%ige Procainhydrochloridlösung
	Zuckerformollösung (20 g Zucker auf 1000 ml Formaldehyd 37%)
	Lugol'sche Lösung
	Glutaraldehyd
Benthos	
2	Sedimentstecher
2	Schneidevorrichtungen
	Stempel mit Laborstativ
	große Glaspipette
	Metalllöffel
	Spritzflasche mit Leitungswasser
	Abfalleimer
2	Glasschalen zum Mischen der 3 Kerne
	Schraubgläser (50 ml) für Meiobenthos
	Gefäße für Mikrobiologie
	Schraubgläser für Analytik
	4%ige Procainhydrochloridlösung
	Zuckerformollösung (20g Zucker auf 1000 ml Formaldehyd 37%)
	Kühltasche

Tabelle 19: Ernährungstypen und Biovolumina der in den Mikrokosmen bestimmten Zooplankter.

TAXON	ERNÄHRUNGSTYP	BIOVOLUMEN/Ind ($\mu\text{m}^3/\text{L}$)
Macrocyclops albus	Räuber, Allesfresser	108909959
Eucyclops serrulatus	Räuber, Allesfresser	40251672
Polyphemus pediculis	Räuber, Allesfresser	74478
Dicranophorus	Räuber, Allesfresser	1000000
Asplanchna	Räuber, Allesfresser	19171664
Cephalodella spec	Räuber, Allesfresser	146154
Pleosoma	Räuber, Allesfresser	1037094
Acroperus harpae	Algenfresser	22113000
Chydorus sphaericus	Algenfresser	9706000
Daphnia longispina groß	Algenfresser	221978000
Daphnia longispina mittel	Algenfresser	72063000
Daphnia longispina klein	Algenfresser	11937000
Diaphanosoma groß	Algenfresser	21390000
Diaphanosoma mittel	Algenfresser	12734000
Diaphanosoma klein	Algenfresser	2755000
Scapholeberis mucronata	Algenfresser	9717000
Sida crystallina	Algenfresser	1106614000
Eudiaptomus	Algenfresser	28591000
Notholca	Algenfresser	417353
Ascomorpha ecaudis	Algenfresser	231085
Keratella cochlearis	Algenfresser	26241
Keratella quadrata	Algenfresser	825622
Filinia spec	Algenfresser	40832
Brachyonus calyciflorus	Algenfresser	3707062
Gastropus stylifer	Algenfresser	1485991
Lepadella patella	Algenfresser	81507
Hexarthra	Algenfresser	375022
Kellicottia	Algenfresser	106444
Notommata	Algenfresser	100000
Proales	Algenfresser	500000
Ascomorpha saltans	Algenfresser	79165
Synchaeta	Algenfresser	1129377
Bosmina longirostris	Sonstige	7114000
Polyarthra spec	Sonstige	221263
Colurella	Sonstige	86493
Habrotrocha	Sonstige	53407
Lecane monostyla	Sonstige	80000
Lecane distyla	Sonstige	80000
Trichotria	Sonstige	329256
Monommata	Sonstige	141801
Trichocerca	Sonstige	175578
Canthocamptus	Sonstige	2929615

Fortsetzung Tabelle 4: Ernährungstypen und Biovolumina der in den Mikrokosmen bestimmten Zooplankter.

TAXON	ERNÄHRUNGSTYP	BIOVOLUMEN/Ind ($\mu\text{m}^3/\text{L}$)
Nauplia	Sonstige	1858000
Copepodit	Sonstige	4165000
Cyclopoide	Sonstige	50000
Rotaria	Sonstige	500000
Testudinella	Sonstige	500000
Wierzejskiella	Sonstige	200000