

**Wirkung von 4-Chloranilin auf verschiedene
biologische Merkmale
bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Adolf Rüdiger Powa

aus Eulau

Dekan: Prof. Dr. H. Puchta
Referent: Dr. habil. H. Bresch
Korreferent: Prof. Dr. W. Hanke
Tag der mündlichen Prüfung: 15. 02. 2006

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele beigetragen, bei denen ich mich herzlich bedanken möchte:

Herrn Dr. habil. H. Bresch, meinem Lehrer und Betreuer danke ich für das Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, für die Überlassung des Themas, sowie für wertvolle Ratschläge und für die Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

Herrn Prof. Dr. W. Hanke danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die vielen anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. W. H. Holzapfel danke ich für sein Entgegenkommen, mir am Institut für Hygiene und Toxikologie der Bundesanstalt für Ernährung und Lebensmittel einen Arbeitsplatz ermöglicht zu haben.

Frau Marianne Urbanek danke ich für ihre genaue Einweisung in die Methodik der HPLC und ihre stete Bereitschaft, mich tatkräftig zu unterstützen.

Herr Dipl. Inform. L. Korn weihte mich in die „Geheimnisse“ der Statistik ein. Dank seiner Hilfe und dem SAS-Programm konnten signifikante Unterschiede gefunden werden.

Meiner Kollegin, Frau Dipl. Math. Walburga von Kayser, danke ich für ihre Geduld, mit der sie meine ersten Versuche im Excel-Programm begleitet hat, und für ihre stete Bereitschaft, aufgetretene Computerprobleme zu lösen.

Ich danke meiner Freundin, Frau OStR'in Anita Gschwandtner, die mit größter Aufmerksamkeit einige Satzkonstruktionen in leicht verständliches Deutsch brachte.

Meinem Freund, Herrn Dr. Karl Kniehl, danke ich für viele aufmunternde Worte während der Arbeit.

Meiner lieben Frau und meinen Töchtern danke ich für ihre Hilfe, ihr Verständnis und vor allem, für ihre Geduld.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
Ziele der Arbeit.....	5
2. Material und Methode.....	7
2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte	7
2.2 Hälterungs- und Bestimmungsmethoden	9
2.2.1 Hälterung und Fütterung der Tiere	9
2.2.2 Bestimmung des Körpergewichts, der Körperlänge und des Korpulenzfaktors.....	11
2.2.3 Blutentnahme und Gewinnung des Blutplasmas.....	12
2.2.4 Blutausschrieb und Färbung der Blutzellen	13
2.2.5 Bestimmung der Veränderung der Blutzellen	13
2.2.6 Präparation der Tiere	17
2.3 Bestimmung der Aminosäure-Konzentration	17
2.4 Statistische Auswertung.....	24
3 Ergebnisse	26
3.1 Einfluss von Chloranilin auf das Körpergewicht.....	26
3.1.1 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 1 mg/l auf das Körpergewicht (Versuch 1).....	26
3.1.2 Einfluss der Chloranilinkonzentration von 2 mg/l auf das Körpergewicht (Versuch 2).....	28
3.1.3 Einfluss der Chloranilinkonzentration von 4 mg/l auf das Körpergewicht (Versuch 3).....	31
3.1.4 Abhängigkeit der Gewichtszunahme vom Startgewicht bei den Kontrolltieren und behandelten Tieren in den drei Konzentrationen.....	33
3.2 Einfluss von Chloranilin auf die Körperlänge	37
3.2.1 Einfluss der Chloranilinkonzentration von 1 mg/l (Versuch 1 – im Herbst).....	38
3.2.2 Einfluss der Chloranilinkonzentration von 2 mg/l (Versuch 2 – im Frühjahr)	38
3.2.3 Einfluss der Chloranilinkonzentration von 4 mg/l (Versuch 3 – im Spätherbst)	38
3.3 Einfluss von Chloranilin auf den Korpulenzfaktor.....	39
3.3.1 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 1 mg/l auf den Korpulenzfaktor (Versuch 1).....	40
3.3.2 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 2 mg/l auf den Korpulenzfaktor (Versuch 2).....	42
3.3.3 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 4 mg/l auf den Korpulenzfaktor (Versuch 3).....	44
3.4 Einfluss von Chloranilin auf das Lebergewicht	47
3.4.1 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 1 mg/l auf das Lebergewicht (Versuch 1).....	47
3.4.2 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 2 mg/l auf das Lebergewicht (Versuch 2).....	48

3.4.3	Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 4 mg CA/l auf das Lebergewicht (Versuch 3).....	48
3.5	Einfluss von Chloranilin auf das Herzgewicht	50
3.5.1	Wirkung einer Chloranilin-Konzentration von 1 mg/l auf das Herzgewicht (Versuch 1).....	50
3.5.2	Wirkung einer Chloranilin-Konzentration von 2 mg/l auf das Herzgewicht (Versuch 2).....	50
3.5.3	Wirkung einer Chloranilin-Konzentration von 4 mg/l auf das Herzgewicht (Versuch 3).....	51
3.6	Einfluss von Chloranilin auf die relative Anzahl der Blutzellen im Plasma	53
3.6.1	Einfluss einer Konzentration von 1 mg CA/l auf die relative Anzahl der Blutzellen (Versuch 1).....	53
3.6.2	Einfluss einer Konzentration von 2 mg CA/l auf die Blutzellen (Versuch 2)	54
3.6.3	Einfluss einer Konzentration von 4 mg CA/l auf die Blutzellen (Versuch 3)	57
3.6.4	Vergleich der Veränderungen der Blutzellenzahl in den drei Chloranilin- Konzentrationen	58
3.7	Einfluss von 4 - Chloranilin auf die Konzentration der Aminosäuren im Plasma	60
3.7.1	Wirkung von 1 mg CA/l auf die Konzentration der Aminosäuren im Plasma (Versuch 1).....	60
3.7.2	Wirkung von 2 mg CA/l auf die Konzentration der Aminosäuren im Plasma (Versuch 2).....	65
3.7.3	Wirkung von 4 mg CA/l auf die Konzentration der Aminosäuren im Plasma (Versuch 3).....	82
3.8	Vergleich der Ergebnisse der zwei Berechnungsmethoden	95
4.	Diskussion.....	98
4.1	Allgemeines.....	98
4.2	Einfluss von Chloranilin auf Körpergewicht, - länge und Korpulenzfaktor	98
4.2.1	Einfluss auf das Körpergewicht	98
4.2.2	Einfluss auf die Körperlänge	101
4.2.3	Einfluss auf den Korpulenzfaktor.....	101
4.3	Einfluss von Chloranilin auf Leber und Herz.....	102
4.3.1	Einfluss auf die Leber	102
4.3.2	Einfluss auf das Herz.....	104
4.4	Blutbild	104
4.5	Einfluss von Chloranilin auf die Konzentration der Aminosäuren	107
4.5.1	Bedeutung des Aminosäuren-Pools	107
4.5.2	Vergleich der Ergebnisse	112
5.	Zusammenfassung	123
5.	Summary	124
6.	Literaturverzeichnis	125
Anlage 1.	137

Anlage 2	Messung der 4-CA-Konzentrationen in den Einzelbecken	138
Anlage 3.....		139
Anlage 3.1.1	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/I) bei den Kontrolltieren K1 – K3.....	139
Anlage 3.1.2	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/I) bei den Kontrolltieren K4 – K6.....	140
Anlage 3.1.3	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/I) bei den Kontrolltieren K7 – K10.....	141
Anlage 3.1.4	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/I) bei den exponierten Tieren P1 – P3	142
Anlage 3.1.5	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/I) bei den exponierten Tieren P4 – P6	143
Anlage 3.1.6	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/I) bei den exponierten Tieren P7 – P10	144
Anlage 3.2.1	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/I) bei den Kontrolltieren K 1 – K 3.....	145
Anlage 3.2.2	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/I) bei den Kontrolltieren K 4 – K 6.....	146
Anlage 3.2.3	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/I) bei den Kontrolltieren K 7 – K 10.....	147
Anlage 3.2.4	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/I) bei exponierten Tieren P 1 – P 3	148
Anlage 3.2.5	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/I) bei exponierten Tieren P 4 – P 6	149
Anlage 3.2.6	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/I) bei exponierten Tieren P 7 – P 10	150
Anlage 3.3.1	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/I) bei den Kontrolltieren K 1 – K 3.....	151
Anlage 3.3.2	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/I) bei den Kontrolltieren K 4 – K 6.....	152
Anlage 3.3.3	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/I) bei den Kontrolltieren K 7 – K 10.....	153
Anlage 3.3.4	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/I) bei den exponierten Tieren P 1 – P 3	154
Anlage 3.3.5	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/I) bei den exponierten Tieren P 4 – P 6	155
Anlage 3.3.6	Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/I) bei den exponierten Tieren P 7 – P 10	156
Anlage 4.....		157
Anlage 4.1.1	As Versuch 3 (4 mg CA/I) : Differenzen der Aminosäure- Konzentrationen (absolut und in Prozent) zwischen 1. und 2. Analyse der Kontrolltiere	157

Anlage 4.1.2	As Versuch 3 (4 mg CA/l) : Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und in Prozent) zwischen 1. und 2. Analyse der Kontrolltiere	159
Anlage 4.1.3	As Versuch 3 (4 mg CA/l): Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und in Prozent) zwischen 1. und 2. Analyse der Kontrolltiere	161
Anlage 4.1.4	As Versuch 3 (4 mg CA/l): Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und in Prozent) zwischen 1. und 2. Analyse der Kontrolltiere	163
Anlage 4.1.5	As Versuch 3 (4 mg CA/l) : Mittelwerte der Mittelwert-Differenzen der prozentualen Abweichungen zwischen der 1. und 2. Analyse	165
Anlage 4.2.1	As Versuch 3 (4 mg CA/l): Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und in Prozent) zwischen 1. und 2. Analyse der exponierten Tiere.....	166
Anlage 4.2.2	As Versuch 3 (4 mg CA/l): Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und prozentual) zwischen 1. und 2. Analyse der exponierten Tiere.....	168
Anlage 4.2.3	As Versuch 3 (4 mg CA/l): Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und prozentual) zwischen 1. und 2. Analyse der exponierten Tiere.....	170

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Erythroblast II / reifer Erythrozyt.....	14
Abb. 2:	Proerythrozyt / Erythroblast II.....	15
Abb. 3:	Erythrozyt – Abbauf orm II und III, überreifer Erythrozyt	15
Abb. 4:	Reifer Erythrozyt, segmentkerniger Granulozyt, Abbauf orm III eines Erythrozyten.....	15
Abb. 5:	Proerythrozyt, Lymphozyt	16
Abb. 6:	Spindelzelle.....	16
Abb. 7:	Erythrozyt-Abbauf orm III - IV	16
Abb. 8:	Reaktion des OPA und einer Aminosäure zu einem Isoindolderivat (aus Alltech Grom, Analytik+HPLC).	18
Abb. 9:	Aufbau des HPLC-Systems (nach Alltech Grom)	19
Abb. 10a:	Chromatogramm eines erweiterten L-Aminosäurestandards der Firma Alltech Grom. Hinzugefügt wurden die Aminosäuren: Asparagin (ASN), Citrullin (CIT), Taurin (TAU), Ornithin (ORN) und der interne Standard Nor-Valin.	22
Abb. 10b:	Chromatogramm der Aminosäuren aus dem Plasma eines unbehandelten Tieres (Kontrolltier 4) in Versuch 2.....	23
Abb. 11a:	Anordnung der Gewichte unbehandelter Tiere (K = Kontrolltiere) nach steigendem Startgewicht. Die linke Säule gibt das absolute Körpergewicht (g) vor Versuchsbeginn, die rechte Säule das absolute Körpergewicht nach Versuchsende wieder. Die Zahl über der rechten Säule steht für die prozentuale Gewichtszunahme des Einzeltieres (Versuch 1, 1 mg CA/I).	27
Abb. 11b:	Anordnung der behandelten Tiere (P = Proben-tiere) nach steigendem Startgewicht (Versuch 1, Anordnung wie in Abb. 11a).	28
Abb. 12:	Anordnung der unbehandelten Tiere nach steigendem Startgewicht (Versuch 2, 2 mg CA/I)	29
Abb. 13:	Anordnung der behandelten Tiere nach steigendem Startgewicht (Versuch 2, 2 mg CA/I, Anordnung wie Abb. 10). Tier 9 starb am 23. Tag nach der Schadstoffexposition. NV steht für Nahrungsverweigerer.	30
Abb. 14:	Anordnung der unbehandelten Tiere nach steigendem Startgewicht (Versuch 3, 4 mg CA/I, Anordnung wie Abb. 10)	32
Abb. 15:	Anordnung der behandelten Tiere nach steigendem Startgewicht (Versuch 3, 4 mg CA/I, Anordnung wie Abb. 10, NV steht für Nahrungsverweigerer)	32
Abb. 16a:	Abhängigkeit der Gewichtszunahmen vom Startgewicht bei unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 1, 1 mg CA/I).....	33
Abb. 16b:	Abhängigkeit der Gewichtszunahmen vom Startgewicht bei unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 2, 2 mg CA/I).....	34
Abb. 16c:	Abhängigkeit der Gewichtszunahmen vom Startgewicht bei unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 3, 4 mg CA/I).....	34
Abb. 17:	Vergleich der Mittelwerte der Gewichtszunahmen zwischen behandelten und unbehandelten Tieren in den verschiedenen Konzentrationen.....	37

Abb. 18:	Messen der Körperlänge (Abb. nach Meyer)	37
Abb. 19:	Vergleich der Mittelwerte der Körperlängenzunahme in den drei Konzentrationen. Der Parameter Körperlänge ist in den Konzentrationen von 1 mg und 4 mg CA/l signifikant unterschieden zwischen den Kontroll- und behandelten Tieren.	39
Abb. 20a:	Werte der Korpulenzfaktoren der Kontrolltiere vor (weiße Säulen) und nach vier Wochen. Die Zahlen über den Säulen geben die Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Anfang und Ende des Versuchs wieder. Die Anordnung der Tiere erfolgt nach steigendem Wert des Korpulenzfaktors vor Versuchsbeginn (Versuch 1). Negativer Wert bedeutet, der Korpulenzfaktor war am Versuchsende größer als zu Versuchsbeginn.	41
Abb. 20b:	Werte der Korpulenzfaktoren der behandelten Tiere vor (gleichmäßig graue Säulen) und nach vier Wochen Schadstoffexposition (Versuch 1, Text wie in Abb. 20a).....	41
Abb. 21:	Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Start und Ende der Schadstoffexposition in 1 mg CA/l (Versuch 1). Anordnung nach steigendem Wert der Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Versuchsanfang und -ende. Positiver Wert bedeutet Abnahme, negativer Zunahme des Korpulenzfaktors.	42
Abb. 22a:	Korpulenzfaktoren der Kontrolltiere vor Versuchsbeginn (weiße Säulen) und am Versuchsende (Versuch 2, Anordnung wie Abb. 20a).....	43
Abb. 22b:	Korpulenzfaktoren der behandelten Tiere vor Versuchsbeginn (gleichmäßig graue Säulen) und am Versuchsende (Versuch 2, Anordnung wie Abb. 20a). Tier 9 starb nach 23 Tagen Schadstoffexposition, es war eines der drei Nahrungsverweigerer. Die Tiere P4 und P5 waren die anderen Nahrungsverweigerer (= NV).	43
Abb. 23:	Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Start und Ende der Schadstoffexposition in 2 mg CA/l (Versuch 2, Anordnung wie in Abb. 21)	44
Abb. 24a:	Korpulenzfaktoren der unbehandelten Tiere vor Versuchsbeginn und am Versuchsende (Versuch 3, Anordnung wie in Abb. 21).....	45
Abb. 24b:	Korpulenzfaktoren der behandelten Tiere vor und nach der Schadstoffexposition in 4 mg CA/l (NV = Nahrungsverweigerer, Versuch 3, Anordnung wie in Abb. 21).....	45
Abb. 25:	Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Start und Ende der Schadstoffexposition in 4 mg CA/l (Versuch 3). Die Anordnung der Tiere erfolgt nach steigendem Wert der Differenz der Korpulenzfaktoren zwischen Versuchsbeginn und -ende.	46
Abb. 26:	Vergleich der Mittelwerte der Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Start und Ende der Schadstoffexposition in den verschiedenen Konzentrationen. Die Berechnung für die Standardabweichung der unbehandelten Tiere im Versuch 2 (2 mg CA/l) ergab den Wert Null. Positive Werte bedeuten Abnahme, negative Werte Zunahme des Korpulenzfaktors.	47
Abb. 27:	Vergleich der Mittelwerte der Quotienten Lebergewicht / Körpergewicht in den verschiedenen Chloranilin - Konzentrationen	50
Abb. 28:	Vergleich der Mittelwerte der Quotienten Herzgewicht / Körpergewicht bei unbehandelten und behandelten Tieren in den verschiedenen Konzentrationen.....	52
Abb. 29:	Vergleich der relativen Anzahl der Blutzellen in unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 1, 1 mg CA/l). Die Summe aller bestimmten Zelltypen entspricht 100 % (Erythrozytenwert s. Text 3.6.1).	54

Abb. 30:	Vergleich der relativen Anteile der Blutzellen in unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 2, 2 mg CA/I). Die Summe aller bestimmten Zelltypen entspricht 100 %. (Erythrozytenwert s. Text 3.6.1)	56
Abb. 31:	Vergleich der relativen Anteile der Blutzellen zwischen Kontrolle und behandelten Tieren (Versuch 3, 4 mg CA/I, Erythrozytenwert s. Text 3.6.1).....	58
Abb. 32:	Relative Anzahl der Spindelzellen (Thrombozyten) in den verschiedenen 4-CA – Konzentrationen.	59
Abb. 33:	Abhängigkeit der Erythroblasten II (links) und der Proerythrozyten (rechts) von den verschiedenen CA-Konzentrationen.....	59
Abb. 34:	Abhängigkeit der Reifen Erythrozyten (links) und Erythrozyten-Abbauförmen (rechts) von den verschiedenen CA-Konzentrationen	59
Abb. 35:	Relative Anzahl segmentkerniger Granulozyten (links) und Lymphozyten (rechts) in den verschiedenen CA-Konzentrationen	60
Abb. 36a:	Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere nach Versuchsende (Versuch 1, 1 mg CA/I). Auf der Abszisse sind links die Konzentrationen der Kontrolltiere (K), rechts die der exponierten Tiere (P) aufgetragen. Die Konzentration ist in nMol/ml angegeben. Aus den Tieren K1, K2, P1 und P2 konnte kein Blut entnommen werden. Da für Citrullin zu wenig Messwerte vorlagen, wurde auf eine Darstellung verzichtet.....	61
Abb. 36b:	Text wie zu Abb. 36a	62
Abb. 36c:	Text wie zu Abb. 36a (Versuch 1, 1 mg CA/I)	63
Abb. 37a:	Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen von Kontrolle und exponierten Tieren nach Versuchsende (Versuch 1, 1 mg CA/I). Für jeden Mittelwert ist die Standardabweichung eingezeichnet. Die Reihenfolge der Aminosäuren entspricht der Retentionszeit in der HPLC.....	64
Abb. 37b:	Text wie zu Abb. 37a.	64
Abb. 38a:	Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere vor Versuchsbeginn (Versuch 2, 2 mg CA/I). Links stehen die Werte der zur Kontrolle vorgesehenen Tiere (= K), rechts die Werte der zu behandelnden Tiere (Probestiere = P). Aus den Tieren P 9 und P10 konnte kein Blut entnommen werden. Bei den anderen Tieren, wie z.B. K10 und P7 / P8 bei der Glutaminsäure, wurde keine Konzentrationsangabe mit der HPLC für diese Aminosäure gemessen. In den Graphen sind die Säulen der Kontrolltiere und der zur Exposition vorgesehenen Tiere in gleicher Weise dargestellt, da die Fische beider Gruppen unbehandelt sind.	67
Abb. 38b:	Text wie zu Abb. 38a	68
Abb. 38c:	Text wie bei Abb. 38a (Versuch 2, 2 mg CA/I)	69
Abb. 39:	Die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen (ASP-ALA) der für die Kontrolle und der für die Exposition vorgesehenen Tiere werden mit den Standardabweichungen wiedergegeben (Versuch 2, 2 mg CA/I).	70
Abb. 40:	Die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen (TAU-LYS) der für die Kontrolle und der für die Exposition vorgesehenen Tiere werden mit den Standardabweichungen wiedergegeben (Versuch 2, 2 mg CA/I).	70

Abb. 41a:	Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere nach vierwöchiger Versuchsdauer (Versuch 2, 2 mg CA/I). Links stehen die Konzentrationen der Kontrolle (K, weiße Säulen), rechts die der behandelten Tiere (P, graue Säulen). Die schattiert gekennzeichneten Säulen (rechts) geben die Konzentrationen der Tiere an, die nach den darüberstehenden Expositionstagen nur ein Drittel – oder noch weniger – des angebotenen Futters aufnahmen. Diese Zeitangabe ist nur bei der Aminosäure Asparaginsäure eingezeichnet, sie gilt jedoch auch für dieselben Tiere bei sämtlichen anderen Aminosäuren.	72
Abb. 41b:	Text wie zu 41a	73
Abb. 41c:	Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere nach vierwöchiger Versuchsdauer (Versuch 2, 2 mg CA/I, Text wie zu Abb. 41a)	74
Abb. 42a:	Vergleich der Mittelwerte der ASK von Kontrolle und behandelten Tieren nach einer vierwöchigen Schadstoffexposition in 2 mg CA/I (Versuch 2, 2 mg CA/I)	75
Abb. 42b:	Vergleich der Mittelwerte der ASK von Kontrolle und behandelten Tieren nach einer vierwöchigen Schadstoffexposition in 2 mg CA/I (Versuch 2, 2 mg CA/I)	75
Abb. 43a:	Die Differenzen der Mittelwert-Differenzen der Aminosäuren-Konzentrationen zwischen Versuchsende und -start von unbehandelten und behandelten Tieren werden miteinander verglichen. Die Werte von Citrullin waren zu gering (bei den Kontrolltieren 2, bei den behandelten Tieren 1 nMol/ml), um hier noch abgebildet werden zu können (Versuch 2, 2 mg CA/I, s. Tab. 20).....	80
Abb. 43b:	Text wie zu Abb. 43a	80
Abb. 44a:	Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere vor Versuchsbeginn. Aus den Tieren K1, K 4 und P10 konnte kein Blut entnommen werden (Versuch 3, 4 mg CA/I). In den Graphen sind die Säulen der Kontrolltiere (linke Hälfte) und der zur Exposition vorgesehenen Tiere (rechte Hälfte des Diagramms) in gleicher Weise dargestellt, da die Fische beider Gruppen unbehandelt sind.	83
Abb. 44b:	Text wie zu Abb. 44a (Versuch 3, 4 mg CA/I)	84
Abb. 44c:	Text wie zu Abb. 44a (Versuch 3, 4 mg CA/I)	85
Abb. 45:	Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen (ASP-ALA) der für die Kontrolle und für die Exposition vorgesehenen Tiere mit ihren Standardabweichungen (Versuch 3, 4 mg CA/I)	86
Abb. 46:	Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen (TAU-LYS) der für die Kontrolle und für die Exposition vorgesehenen Tiere mit ihren Standardabweichungen (Versuch 3, 4 mg CA/I)	86
Abb. 47a:	In den Abbildungen 47a bis c werden die ASK der Einzeltiere nach Versuchsende angegeben. Links stehen die Konzentrationen der Kontrolltiere (K, weiße Säulen), rechts die der exponierten Tiere (P, graue Säulen). Die schattiert gekennzeichneten Säulen (rechts) geben die Konzentrationen der Tiere an, die nach den darüberstehenden Expositionstagen nur noch die Hälfte – oder weniger – des angebotenen Futters aufnahmen (Versuch 3, 4 mg CA/I). Diese Zeitangabe ist zwar nur bei der Aminosäure Asparaginsäure eingetragen, sie gilt jedoch auch für dieselben Tiere bei allen Aminosäuren.....	88
Abb. 47b:	Text wie zu Abb. 47a	89
Abb. 47c:	Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere nach vierwöchiger Versuchsdauer (Versuch 3, 4 mg CA/I, Text wie zu Abb. 47a)	90

Abb. 48a:	Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen von unbehandelten und behandelten Tieren nach vierwöchiger Exposition (ASP - ALA, Versuch 3, 4 mg CA/l).....	91
Abb. 48b:	Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen von unbehandelten und behandelten Tieren nach vierwöchiger Exposition (TAU - LYS, Versuch 3, 4 mg CA/l).....	91

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Berechnung der Variationskoeffizienten der Aminosäuren aus jeweils sechs Analysen. Das kursiv gedruckte Norvalin ist keine Aminosäure und dient als interner Standard.....	24
Tab. 2:	Gewichte und Gewichtszunahme der Tiere während des Versuchs 1 (1 mg CA/l)	27
Tab. 3:	Gewichte und Gewichtszunahme der Tiere von Versuch 2 (2 mg CA/l)	29
Tab. 4:	Veränderungen des Startgewichts bei Kontrolle, Normalfressern und Nahrungsverweigerern (Versuch 2, 2 mg CA/l)	30
Tab. 5a:	Gewichte und Gewichtszunahme der Tiere von Versuch 3 (4 mg CA/l)	32
Tab. 5b:	Veränderungen des Startgewichts bei Normalfressern, Nahrungsverweigerern und Kontrolltieren (Versuch 3, 4 mg CA/l)	33
Tab. 6:	Vergleich der Gewichtsentwicklung zwischen Kontrolle und behandelten Tieren bei Gruppen gleichen Startgewichts	35
Tab. 7a:	Vergleich der Mittelwerte der Wachstumsraten laut OECD-Richtlinie 67/548 von 2001	36
Tab. 7b:	Vergleich der Mittelwerte der Wachstumsraten von Kontrolle mit exponierten Normalfressern und Nahrungsverweigerern	36
Tab. 8a:	Vergleich der Mittelwerte der Längenzunahme von unbehandelten und behandelten Tieren in den drei CA - Konzentrationen	38
Tab. 8b:	Vergleich der Mittelwerte der Längenzunahme von Kontrolltieren mit Normalfressern und Nahrungsverweigerern (Versuch 2 und 3)	39
Tab. 9a:	Vergleich der Mittelwerte der Korpulenzfaktoren vor und nach dem Versuch und deren Differenz in den verschiedenen 4-CA-Konzentrationen (Versuch 1, 1 mg CA/l) ...	40
Tab. 9b:	Vergleich der Mittelwerte der Korpulenzfaktorendifferenzen von Kontrolltieren mit Normalfressern und Nahrungsverweigerern (2 mg CA/l)	44
Tab. 9c:	Vergleich der Mittelwerte der Korpulenzfaktorendifferenzen von Kontrolltieren mit Normalfressern und Nahrungsverweigerern (4 mg CA/l)	46
Tab. 10a:	Vergleich der Mittelwerte der Leber – und Körpergewichte sowie der Mittelwerte der Quotienten Lebergewicht / Körpergewicht in den verschiedenen 4-CA- Konzentrationen. ☆ Signifikanz $P < 0,05$	49
Tab. 10b:	Vergleich der Mittelwerte der Lebergewichte und Mittelwerte der Quotienten Leber- / Körpergewicht bei Kontrolle, Normalfressern und Nahrungsverweigerern.....	49
Tab. 11a:	Vergleich der Mittelwerte der Herzgewichte und Quotienten Herzgewicht/Körpergewicht in den verschiedenen Konzentrationen. Bei 2 mg und 4 mg CA/l sind die Unterschiede zwischen den unbehandelten und behandelten Tieren signifikant (Markierung ☆).	51
Tab. 11b:	Vergleich der Mittelwerte von Herzgewicht und des Quotienten Herz-/ Körpergewicht bei Kontrolle, Normalfressern und Nahrungsverweigerern.....	52
Tab. 12:	Relative Anzahl der Blutzellen bei Kontrollen und behandelten Tieren (Versuch 1, 1 mg CA/l)	54

Tab. 13a:	Relative Anzahl der Blutzellen in unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 2, 2 mg CA/I)	55
Tab. 13b:	Relative Anzahl der Blutzelltypen bei Kontrolltieren, Normalfressern und Nahrungsverweigerern (2 mg CA/I)	56
Tab. 14a:	Relative Anteile der Blutzelltypen bei unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 3, 4 mg CA/I)	57
Tab. 14b:	Relative Anteile der Blutzelltypen bei Kontrolltieren, Normalfressern und Nahrungsverweigerern (Versuch 3, 4 mg CA/I)	58
Tab. 15:	Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen bei unbehandelten nach der Kontrollzeit und behandelten Tieren nach der Schadstoffexposition (Versuch 1, 1 mg CA/I, V_K ist der Variationskoeffizient des Mittelwertes. (-) bedeutet Abnahme, (+) Zunahme der Konzentration nach Versuchsende). Die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen der Kontrolltiere entsprechen 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure (Essential Amino Acid), V_K für Variationskoeffizient.	65
Tab. 16:	Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen bei den Kontrolltieren und zu behandelnden Tieren vor der Schadstoffexposition (Versuch 2, 2 mg CA/I, (-) bedeutet geringere, (+) größere Konzentration bei den zu behandelnden Tieren). Die Mittelwerte der ASK der Kontrolltiere entsprechen 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure (Essential Amino Acid), V_K für Variationskoeffizient.	71
Tab. 17:	Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen bei unbehandelten nach der Kontrollzeit und behandelten Tieren nach der Schadstoffexposition (Versuch 2, 2 mg CA/I, (-) bedeutet Abnahme, (+) Zunahme der Konzentration behandelter Tiere nach Versuchsende). Die Mittelwerte der ASK der Kontrolltiere entsprechen 100%. EAA steht für essentielle Aminosäure (Essential Amino Acid), V_K für Variationskoeffizient.....	76
Tab. 18:	Vergleich der Mittelwerte der ASK zwischen Normalfressern (sechs Tiere) und Nahrungsverweigerern (zwei Tiere, Versuch 2, 2 mg CA/I). Die Mittelwerte der Normalfresser entsprechen 100%. EAA steht für essentielle Aminosäuren.....	77
Tab. 19:	Vergleich der Mittelwerte der ASK von Kontrolle und Normalfressern. Der Mittelwert der Kontrolltiere entspricht 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure (Versuch 2, 2 mg CA/I).	78
Tab. 20:	Vergleich der Differenzen der Mittelwerte - Differenzen der ASK zwischen Versuchsende und -beginn bei unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 2, 2 mg CA/I). Der Mittelwert der Differenzen der unbehandelten Tiere entspricht 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure. Für Spalten 1 und 2: negativer Wert bedeutet Abnahme, positiver Wert Zunahme der Konzentration nach Versuchsende. Für Spalten 3 und 4: negativer Wert: den kleineren Wert der Mittelwert - Differenzen weisen die behandelten Tiere auf positiver Wert: den höheren Wert zeigen die behandelten Tiere.....	81
Tab. 21:	Vergleich der Mittelwerte der ASK der Kontrolltiere und der zu behandelnden Tieren vor der Schadstoffexposition (Versuch 3, 4 mg CA/I, (-) bedeutet geringere, (+) größere Konzentration bei den zu behandelnden Tieren). V_K steht für den Variationskoeffizienten. Die Mittelwerte der Kontrolle entsprechen 100 %. Mit EAA sind die essentiellen Aminosäuren gekennzeichnet.....	87

Tab. 22:	Vergleich der Mittelwerte der ASK von unbehandelten und behandelten Tieren nach der Exposition (Versuch 3, 4 mg CA/l). (+) bedeutet: der größere Mittelwert liegt bei den behandelten, (-) bei den unbehandelten Tieren vor. V_K steht für Variationskoeffizient, EAA für Essential Amino Acid. Die Mittelwerte der Kontrolle entsprechen 100 %.....	92
Tab. 23:	Vergleich der Mittelwerte der ASK zwischen Normalfressern und Nahrungsverweigerern in einer 4 mg CA/l -Lösung (Versuch 3). (+) bedeutet Zunahme, (-) bedeutet Abnahme des Mittelwertes bei den Nahrungsverweigerern. Die Mittelwerte der Normalfresser entsprechen 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäuren.	93
Tab. 24:	Vergleich der Mittelwerte der ASK von Kontrolle mit exponierten Normalfressern (Versuch 3, 4 mg CA/l). Der ASK Mittelwert der Kontrolle entspricht 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure.	94
Tab. 25:	Vergleich der Differenzen der Mittelwert-Differenzen der ASK. Zwischen Versuchsende und –beginn bei Kontrolle und behandelten Tieren (Versuch 3, 4 mg CA/l, negativer Wert bedeutet Abnahme, positiver Wert Zunahme der Konzentration nach Versuchsende). Die Mittelwerte der Kontrolle entsprechen 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure. Für Spalten 1 und 2: negativer Wert bedeutet Abnahme, positiver Wert Zunahme der Konzentration nach Versuchsende Für Spalten 3 und 4: negativer Wert: den kleineren Wert der Mittelwert- Differenzen weisen die behandelten Tiere auf positiver Wert: den höheren Wert zeigen die behandelten Tiere.....	95
Tab. 26:	Vergleich der zwei Berechnungsmethoden für Versuch 2 und 3. Hier sind nur die Differenzen der Aminosäuren- Konzentrationen aufgeführt, deren unterschiedliche Werte zu den unbehandelten Tieren mehr als 10 % betragen (s.o.).	97
Tab. 27:	Die prozentualen Veränderungen der Mittelwerte zwischen Kontrolltieren und exponierten Tieren werden wiedergegeben. (-) bedeutet Abnahme, (+) Zunahme des Mittelwertes der exponierten Fische. Die statistisch signifikanten Unterschiede sind fett gedruckt.	112

1. Einleitung

Das Vorliegen von toxisch wirksamen Stoffen in Umweltgewässern stellt, global gesehen, immer noch ein Problem dar. Der intensive Einsatz des Insektizides DDT während des Zweiten Weltkriegs und danach sowie der bis dahin im Wesentlichen unkontrollierte Eintrag aller möglichen Chemikalien und Schwermetalle wie Quecksilber (Minamata-Krankheit) oder Cadmium in die Umwelt führte zu Schäden, die die Wissenschaft erst ab Mitte der sechziger Jahre zu erkennen begann. Diese Erkenntnis hatte zur Folge, dass zuerst wenige, in den folgenden Jahren praktisch alle hochentwickelten Staaten Gesetze erließen zum Schutz der Umwelt vor diesen Stoffen. So entstand auch das „Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen“ (ChemG) der Europäischen Union, das seit 1980 für die Bundesrepublik Deutschland rechtsgültig ist.

Dieses Gesetz soll sowohl den Menschen als auch seine Umwelt vor unerwünschten Folgen der unter das Gesetz fallenden Stoffe schützen. Nachdem das Ausbringen von Stoffen, deren Schädlichkeit bereits bekannt war, durch spezielle Gesetze in vielen Staaten geregelt wurde, befasste sich die Umweltgesetzgebung besonders mit neuen Produkten, deren potentiell schädliche Wirkungen auf den Menschen und auf seine Umwelt zu erfassen sind, bevor sie in den Verkehr kommen.

Es galt eine Reihe biologischer Testsysteme zur Abschätzung solch unerwünschter Effekte zu entwickeln. Hinsichtlich der Umwelt war nicht zu erwarten, dass sich mit einem einzigen Verfahren die Wirkung einer Substanz auf das Gesamtökosystem in Erfahrung bringen ließe. So wurden für Luft, Wasser und Boden spezielle Methoden entwickelt. Bezüglich des hier diskutierten aquatischen Systems versuchte man in der Anfangsphase der Entwicklung von Prüfvorschriften auch Miniökosysteme einzusetzen, welche die Realität am geeignetsten widerspiegeln sollten und die aus einem Primärproduzenten, einem primären und einem sekundären Konsumenten als Testorganismus bestanden (Fent, 1998). Bald stellte sich jedoch heraus, dass diese Systeme noch zu komplex waren, keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferten und somit nicht justizierbar waren. Schließlich blieb als einfachstes Testmodell die einzelne Spezies übrig.

Doch welche Spezies sollten für die Untersuchungen herangezogen werden? Nach jahrelangen Studien und Sitzungen auf nationaler und internationaler Ebene kam man überein, dass für das aquatische Süßwassersystem Prüfungen an einem primären Produzenten, einer einzelligen Grünalge, an einem primären Konsumenten, meistens einer Daphnienart, und an einem sekundären Konsumenten, oft einer Fischart, durchzuführen sind (OECD, 1982).

Hinsichtlich der Fischart entwickelten sich lange Diskussionen zunächst darüber, an welcher Art geprüft werden sollte. Aus ökonomischer Sicht wurde man sich in der Umweltgesetzgebung, was Chemikalien anbetrifft, bald klar darüber, dass es einen kaum zu leistenden Aufwand bedeuten würde, wenn jedes Land einen eigenen Test vorschreiben würde. So kamen zumindest die Mitgliedsländer der OECD überein, dass die vorgeschlagenen Prüfverfahren von allen Mitgliedern anzuerkennen seien, was zur Folge hat, dass der Hersteller eines zu prüfenden Produktes jeweils nur einen Test ansetzen muss.

Karpfen und Regenbogenforellen waren als geschätzte Speisefische, von deren Zucht man sich einigen Profit versprach, zu beliebten Testorganismen geworden. Lange vor der Veröffentlichung der OECD-Richtlinien waren diese zwei Fischarten - Bewohner unterschiedlicher Biotope – schon zu „Haustieren“ der Physiologen geworden, wobei mit Karpfen als einfacher zu haltende Spezies wesentlich mehr Fütterungs-, Aufzucht- und Expositionsversuche durchgeführt wurden. Durch die Exposition der Tiere in verschiedenen Schadstoffkonzentrationen sind relativ schnell die LC_{50} -Konzentrationen verschiedener Schadstoffe zu ermitteln. In Testverfahren, in denen es darum ging, auch subletale Wirkungen zu erfassen, wurden morphologische (Körperlänge und – gewicht, Flossengröße, Veränderungen der Schleimhaut) und ethologische Veränderungen (Fress- und Paarungsverhalten) berücksichtigt. Die Schwimmaktivität nach Schadstoffexposition lässt sich ebenfalls überprüfen. Außer rein visueller Beobachtung wurden hier auch Methoden zur quantitativen Auswertung entwickelt (Spieser, 1980; Zachmann und Hanke; 1986, Besch et al., 1977). Auch physiologische Parameter reagieren auf Schadstoffeinfluss: wie z.B. die Veränderung des Blutbildes und des Hormonhaushalts, der Elektrolyten und des Blutzuckers und weitere Veränderungen lassen sich nur über Plasmaanalysen ermitteln. So hatten Schadstoffexpositionen Stress-Reaktionen zur Folge, die sich über veränderte Cortisol- und Glucose-Konzentrationen im Plasma der Karpfen (*Cyprinus carpio*) nachweisen ließen (z.B. Müller et al., 1980; Assem et al., 1983). Die Glykogengehalte von Leber und Muskel waren unter Schadstoffeinfluss ebenfalls verändert. Nach längerer Schadstoffexposition konnte auch eine Abnahme der Cholesterin- und Serum-Protein-Konzentration bei Karpfen festgestellt werden. Alle in dieser Untersuchung (Gluth u. Hanke et al., 1984) eingesetzten 10 Schadstoffe (u.a. auch Lindan) erhöhten die Cortisol- und Glucosewerte. Sie sind als typische Stressoren zu bezeichnen. Die Thyroxinabgabe der Schilddrüse erhöht sich ebenfalls unter Schadstoffeinfluss (Schwarz und Hanke, 1986). Untersuchungen zum Elektrolyt-Haushalt sollten Fragen zur osmotischen Regulationskapazität (Bittner et al., 1980) der Fische beantworten.

Aus den durchgeführten Versuchen mit Forellen und Karpfen, mitunter auch mit kleineren Aquariumsfischen, war bekannt, dass Salmoniden zu den empfindlich reagierenden Spezies gehörten. So stellen die Forellenartigen im Freiland auch höhere Ansprüche an die Wasserqualität (Donaldson und Joyner, 1983). Dies freilich muss nicht generell so zutreffen, wenn auch anthropogene Fremdstoffe vorliegen. Aus dieser frühen Erfahrung heraus wurden zu Beginn der Umweltforschung viele Toxizitätstests mit der Regenbogenforelle, seltener sogar mit Lachsen, durchgeführt. Hier stand meistens die Prüfung auf akute Toxizität im Vordergrund. Solche Untersuchungen erstrecken sich in der Regel nicht über 120, oft nur über 48 Stunden. Bei diesen Tests wurde fast immer auf letale Wirkung einer Substanz geprüft, wonach sich als charakteristische Größe die letale Dosis errechnen ließ, die innerhalb der Testzeit und unter den gewählten weiteren Testparametern wie Wasserbeschaffenheit und Temperatur zum Tode der Hälfte der eingesetzten Tiere führte. Der so gewonnene LC_{50} -Wert stellt einen Standardwert dar, der zu Vergleichszwecken und als Ausgang für subletale Toxizitätsstudien recht tauglich ist, aber nichts über die Wirkung kleinerer Konzentrationen über längere Zeit aussagt. Interessanter für die Umwelt sind Untersuchungen über längere Zeiträume, in denen praxisrelevante Konzentrationen zu prüfen sind. Hier nun ergeben sich mit Salmoniden einige Komplikationen auf verschiedenen Ebenen.

Zunächst erweisen sich diese Fische empfindlich gegenüber Infektionen, wenn sie über längere Zeiten, auch unter ungenügendem Wasserdurchfluss, wie im Laboratorium üblich, oft auch bei höheren

Wassertemperaturen gehältert werden. Ein hoher Durchfluss bedeutet höheren Aufwand, z.B. den Einsatz von Kühlgeräten und höhere Wasserkosten.

Ein ausführlicher Test, der nicht nur die gesamte Wachstumsphase von der Entwicklung des Eies bis zum adulten Tier beinhaltet, wobei danach auch noch die Gametenabgabe und die folgende Generation zumindest eine Zeit lang zu beobachten wäre, erweist sich, an Forellen durchgeführt, als ungewein schwierig, allein schon der Größe der Tiere wegen. Tatsächlich wurden vereinzelt die Ergebnisse solch aufwändiger Studien publiziert, als Standardtestmethode kamen sie nicht in Betracht. Die Ergebnisse dieser früheren Untersuchungen wurden von Chorus (1987) zusammengestellt und auf ihre Bedeutung hingewiesen. Spiesser und Yediler (1986) listeten empfindliche Parameter auf, die bei der Entwicklung von Langzeittests an Fischen berücksichtigt werden sollten.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten entwickelte sich die Diskussion über den Einsatz kleinerer Fische. Diese ließen sich einerseits wesentlich leichter halten; ihre Geschlechtsreife würde in bedeutend kürzeren Zeiten erreicht sein als bei der Regenbogenforelle, und sie würden sich nicht nur innerhalb einer kurzen Zeit des Jahres reproduzieren. Andererseits sollten sie aber doch ähnlich empfindlich wie die Salmoniden auf Fremdstoffe reagieren. Des Weiteren wünschten zunächst nicht wenige Wissenschaftler, dass der Fisch ein einheimischer sein sollte, der auch zu Monitorzwecken im Freiland einzusetzen wäre und dessen natürliche Population sich bei Bedarf auch überwachen ließe. In den USA wurde hier bereits in frühen Untersuchungen die Dickkopfritze (*Pimephales promelas*) eingeführt (Adelman und Smith, 1976).

Im Zusammenhang mit der Prüfung auf subakute und chronische Toxizität am Fisch - wie im ChemG vorgesehen - wird als Testorganismus der Zebraäbrbling (*Brachydanio rerio*) vorgeschlagen, wobei allerdings auch die Dickkopfritze und einige weitere Spezies eingesetzt werden dürfen (Rudolph und Boje, 1986). Der Zebraäbrbling, ein dem Aquarianer bekannter „Anfängerfisch“, erfüllt die oben angegebenen Kriterien nahezu ideal; er erreicht die Geschlechtsreife innerhalb von drei Monaten und pflanzt sich danach, zumindest im Laboratorium, saisonunabhängig gleichmäßig das ganze Jahr über fort (Laale, 1977). Die Eier kleben nicht fest und lassen sich mittels einer Pasteurpipette leicht in Gefäße umsetzen. Da das Ei durchsichtig ist, kann man die Entwicklung unter schwacher Vergrößerung leicht beobachten. Allerdings wird immer wieder eingewendet, dass diese Art ein wichtiges Kriterium, nämlich eine hohe Empfindlichkeit gegen stoffliche Verunreinigungen des Wassers, wie bei der Forelle, nicht besitzt.

Diese Meinung geht auf die Tatsache zurück, dass der Zebraäbrbling sich noch in einer Wasserbeschaffenheit wohl fühlt und sich sogar fortpflanzt, in der Regenbogenforellen nicht lange überleben würden. Als ein aus den Tropen eingeführter Fisch ließe er sich in einheimischen Gewässern zu Überwachungszwecken auch nicht halten.

Das ChemG fordert in seiner zweiten Stufe für neue Substanzen, die in einer Menge von über 1000 Tonnen pro Jahr in den Verkehr gebracht werden, eine Langzeituntersuchung am Fisch unter Berücksichtigung der Fortpflanzung. Für solche Untersuchungen kommen nur schnell wachsende und in der Praxis gut handhabbare Fische, wie z. B. der Zebraäbrbling, in Frage.

In einem Programm zur Überprüfung verschiedener Testverfahren wurden 25 Stoffe getestet, darunter 4-Chloranilin. Es ist ein Abbauprodukt der Herbizide Monuron, Monolinuron und Guturon. Die Abbauprodukte vieler Pestizide können mutagen, canzerogen oder auch teratogen wirken (Vassileva u. Kazakova, 1977; Dunkel u. Simmon, 1980; Maier-Bode u. Hartel, 1981; Rippen, 1984; Holm, 2000; Karg u. Köster, 2002). Hierbei ergab sich, dass 4-Chloranilin in einem Reproduktionstest an Wasserflöhen in Konzentrationen wirksam war, die noch weit unterhalb der an Fischen Effekte verursachenden lagen (Rudolph u. Boje, 1986). Interessant war nun zu prüfen, ob auch in einem Reproduktionstest am Fisch diese Substanz in ähnlichen Konzentrationen noch Wirkung zeigte.

Wie ein Test sich mit dem Zebraärbüchling durchführen lässt, wurde von Bresch et al. (1990) veröffentlicht. Der Test ist trotz der günstigen biologischen Eigenschaften des Zebraärbüchlings technisch aufwändig, wobei zur Aufrechterhaltung eines für die Fische guten biologischen Milieus das Wasser kontinuierlich fließen muss, was wiederum eine kontinuierliche Zugabe der Testsubstanz voraussetzt. Aus Gründen des Aufwandes ist es nur möglich, wenige Substratkonzentrationen in einem Test zu prüfen. Hier liegt bereits eine Unsicherheit vor; ideal sollten unter der kleinsten Konzentration keine und unter der größten eindeutige Effekte zu erkennen sein. Zu prüfen wäre daher ein Minimum von drei Konzentrationen bei Ansatz jeweils mindestens eines Duplikats. Der geeignete Bereich lässt sich in Vorversuchen nur abschätzend ermitteln.

Im veröffentlichten Test wurden die Konzentrationen 0,04, 0,2 und 1 mg 4-Chloranilin/Liter Wasser geprüft. Der Test wurde mit adulten Fischen begonnen, zwei Monate nachdem sie geschlechtsreif geworden waren. Unter allen Konzentrationen lebten die Fische normal weiter und die Gametenabgabe verlief ebenfalls wie bei den Kontrollen. Auch die Aufzucht eines Geleges verlief zunächst normal, doch nach einigen Wochen zeigten sich Anomalitäten in der Entwicklung bei den unter der höchsten Konzentration gewachsenen Fischen. Das Wachstum unter den kleineren Konzentrationen verlief wie bei den Kontrolltieren; die Eiproduktion, gemessen an der Anzahl abgegebener Eier, war aber selbst unter der kleinsten Konzentration im Vergleich zur Kontrolle noch gestört; es hätten eigentlich noch niedrigere Konzentrationen angewendet werden müssen. Diese Effekte wurden auch in einer zweiten Generation beobachtet. Der Test bewies neben der hohen Empfindlichkeit des Parameters Eiproduktion auch, dass es hinsichtlich der Auswahl der Konzentrationen tatsächlich schwierig ist, die „ideale“ Abstufung nach oben erwähntem Prinzip praktisch zu realisieren, ohne dass der Test unter veränderten Schadstoffkonzentrationen zu wiederholen wäre.

In einem weiteren, ebenfalls mit 4-Chloranilin durchgeführten Test an Regenbogenforellen, in welchem das Wachstum unter denselben Konzentrationen über zwei Monate verfolgt wurde, konnte lediglich unter dem Einfluss von 1 mg Substanz/Liter Wasser ein anomales Wachstum festgestellt werden. Die Entwicklung unter den kleineren Konzentrationen verlief wie diejenige der Kontrollfische (Bresch, 1991). Da sich die Gametenproduktion praktisch an der Regenbogenforelle nicht prüfen lässt, bleibt offen, ob der Zebraärbüchling oder die Regenbogenforelle in einem „life-cycle-test“ gleich oder unterschiedlich auf die Substanz reagiert hätten.

Aus Tierschutzgründen wurde in den letzten 15 Jahren in verstärktem Maße gefordert, Tiere nicht mehr in Toxizitätsuntersuchungen einzusetzen, sondern sie, wenn immer möglich, durch Zellkulturen zu ersetzen. Unter dieser Maxime wurde auch mehrfach versucht, die von den verschiedenen Umwelt-

Chemikaliengesetzen vorgeschriebenen Versuche zur Erfassung der Fischtoxizität in Zellkulturen zu ermitteln. Als einer der ersten hat Ahne (1985) mit inzwischen auch kommerziell erhältlichen Leberzellen aus der Regenbogenforelle gearbeitet. Braunbeck (1993), Lenz et al., (1993) und Troge (1997) haben an Karpfenhepatocyten, einer selbst gewonnenen Primärkultur, und an Rattennierenzellen 4-Chloranilin geprüft. Untersucht wurde die Wirkung im MTT-Test (die Anzahl der das Tetrazoliumsalz aufgenommenen Zellen wurde ausgezählt), im Ausschlusstest mit Kristallviolett (damit wurde die Anheftungsfähigkeit der Zellen auf der Kulturgefäßoberfläche überprüft), wurde die Wirkung auf verschiedene physiologische Parameter untersucht. In keinem der Experimente, die sich allerdings nur über eine Zeitspanne von maximal 20 Stunden erstreckten, konnten Wirkungen bei Konzentrationen < 5 mg Substanz/Liter Medium festgestellt werden; nicht selten mussten Konzentrationen > 50 mg Substanz/Liter Medium eingesetzt werden, um Effekte zu erkennen. Nachdem es sich als schwierig erwies, Untersuchungen mit Zellkulturen länger als eine Woche durchzuführen, besonders wenn hochspezialisierte Zellen verwendet wurden, scheint es doch sehr fraglich, ob die Zellkultur einen Toxizitätstest am Fisch ersetzen kann. Wie das Beispiel 4-Chloranilin zeigt, darf keineswegs erwartet werden, dass im Test mit Zellen toxische Grenzwerte zu erhalten sind, wie sie sich aus einem Test am Tier über zwei Generationen ergeben.

Im Gegensatz zu einem Langzeittest, in dem die Entwicklung eines Organismus verfolgt wird und sich verhältnismäßig kleine Unregelmäßigkeiten über morphologische Veränderungen unschwer erkennen lassen, sind Schäden in einer Zellkultur nicht immer leicht festzustellen, besonders wenn es um kleine Effekte geht. Hochspezialisierte Zellen degenerieren leicht, auch ohne Schadstoffzusätze. Schließlich ist durchaus damit zu rechnen, dass die Testsubstanz in einer Zellkultur keine Effekte bewirkt, sie aber in anderen, hochspezialisierten Zellen und Geweben innerhalb eines Organismus unerwünscht zu wirken vermag.

Der „sicherste“ Test bei Anwendung einer einzelnen Spezies ist ein life-cycle-Test, der alle ökologisch zweifelsfrei bedeutsamen Stadien eines Lebewesens umfasst, wie die Prüfung der Modellsubstanz 4-Chloranilin am Zebraquarienfisch. Ein solcher Test, über zwei Generationen ausgeführt, dauert recht lang und ist technisch sehr aufwändig. Vermutlich wäre auch im selben Testverfahren, aber mit der Regenbogenforelle als Testorganismus, die Eiproduktion empfindlich gestört worden; das Verfahren wäre aber, wie bereits erwähnt, technisch kaum durchführbar.

Studien zu Veränderungen bei Blutzellen und Enzymen im Plasma nach Fremdstoffeinwirkung wurden mehrfach durchgeführt (Fogels und Sprague, 1977, Folmar, 1993, Schramm, 1998). Bei diesen Untersuchungen wurde aber nur einmal nach Versuchsende Blut abgenommen; die Fische wurden danach getötet.

Ziele der Arbeit

In vorliegender Arbeit ging es darum, eine vielleicht vorhandene höhere Empfindlichkeit der Regenbogenforelle im Vergleich zum Zebraquarienfisch auszunutzen und ein Verfahren zu entwickeln, das kürzer dauert als eine life-cycle-Untersuchung, das aber in Bezug auf *toxische Grenzkonzentrationen* möglichst so empfindlich sein sollte wie der Langzeittest. Hierbei sollten sich zumindest einige der Para-

meter mehrmals zeitabhängig bestimmen lassen, d.h. ohne Tötung der Tiere. Einzelhälterung der Fische war nötig, da Regenbogenforellen sich bei gemeinsamer Hälterung gegenseitig stark beeinflussen. Solche zusätzlichen Stressfaktoren würden durch die Einzelhälterung vermieden.

Untersucht wurde der Einfluss des 4-Chloranilins (CA) auf

1. Körpergewicht und –länge, da diese Parameter auch in der Praxis leicht bestimmt werden können, ohne die Tiere zu schädigen. In Verbindung hiermit steht die Berechnung der Wachstumsrate und des Korpulenzfaktors.
2. Leber- und Herzgewicht am Ende des Versuchs,
3. die relative Anzahl der Blutzellen im Plasma am Ende des Versuchs,
4. die Konzentration der Aminosäuren im Blut am Anfang und Ende des Versuchs.

Mit Hilfe der Messwerte zu den morphologischen Veränderungen und zu den physiologischen Effekten sollte versucht werden, die allgemeine Situation der Tiere zu erfassen.

Da mit möglichst jungen Forellen gearbeitet werden sollte, konnten dem Tier keine größeren Blutvolumina entnommen werden. Dadurch war es auch nicht möglich, Konzentrationen bestimmter Enzyme zu bestimmen. Es sollte aber versucht werden, möglichst viele Parameter zu erfassen. Nachdem jede Aminosäure als physiologisch eigenständiges Merkmal zu betrachten ist, lassen sich auch aus einem kleinen Plasmavolumen viele Parameter ermitteln.

Eine kontinuierliche Veränderung der Organe könnte mit bildgebenden Verfahren beobachtet werden. Daher wurde mit Unterstützung der Firma Brucker (Ettlingen) über die Kernspintomographie versucht, Ergebnisse über die Veränderungen der Organe zu erhalten. Das Problem wurde nicht weiter verfolgt, da die Tiere für die Zeit der Messung mit so hohen Konzentrationen an Betäubungsmittel (MS 222 oder Benzocain) ruhig gestellt werden mussten, dass ein Einfluss auf die Blutparameter nicht auszuschließen war.

2. Material und Methode

2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte

Untersucht wurden junge Regenbogenforellen aus der Fischzuchtanstalt W. Dietmayer, Hettingen. Die Fische für Versuch 1 (Start Ende Oktober) wurden Anfang September, die für Versuch 2 (Start Anfang März) Mitte Januar und die für Versuch 3 (Start Anfang November) wurden im September aus den Teichen der Fischzucht entnommen. Nach Aussage des Züchters waren seine Becken mit Fischen jeweils gleichen Alters besetzt. Die Überprüfung der Fische auf Pilzbefall und andere Krankheiten ließ keine Infektionen erkennen. Die im Versuch 1 eingesetzten Fische waren etwa 10 Monate alt und hatten ein Durchschnittsgewicht von 56 g, die im Versuch 2 waren ca. 15 Monate mit einem Durchschnittsgewicht von 77 g, die Fische für Versuch 3 waren ca. 11 Monate alt mit einem Durchschnittsgewicht von 68,5 g.

Zur Gewöhnung an die Karlsruher Wasserqualität wurden die Tiere in einem gut belüfteten, unter Durchfluss stehenden, 400 – 600 l fassenden Kunststoffbecken bei 16°C gehalten. Dieses Gewöhnungsbecken stand im Keller des Zoologischen Instituts II der Universität Karlsruhe. Die Gesamthärte des Wassers entsprach 360 mg (als CaCO_3). Über den starken Durchfluss und die Messung der Temperatur war die Sauerstoffversorgung gesichert. Weitere Parameter: pH-Wert des Wassers bei 7,3, Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 : 12 Stunden, Fütterung der Tiere täglich am Vormittag (Standardfutter Trouvit pro aqua 20 der Firma Milkivit, Burgheim), maximales Angebot von Pellets; schwammen nach zehn Minuten noch Pellets auf der Wasseroberfläche, wurde die Fütterung eingestellt, Futterreste auf dem Beckenboden und Faeces wurden zwei Mal pro Woche entfernt.

Herstellen des Stammsatzes der Testsubstanz

Kristallines 4-Chloranilin (zur Synthese, Reinheit > 99%, MG = 127,58) löst sich nicht vollständig bei Zimmertemperatur im Wasser. Durch kurzzeitiges Erhitzen auf 70°C und unter ständigem Rühren in einem Liter Aqua dest. wurde die abgewogene Menge Chloranilin für den Stammsatz in Lösung gebracht. Nachdem sich die Kristalle gelöst hatten, wurde diese Stammlösung durch Verdünnen mit Aqua dest. auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Versuchsaufbau zur Prüfung der Testsubstanz (Anlage 1)

Eine Wasservorratswanne (aus PVC), die Vorratsbehälter für die Stammlösungen, die Dosiergeräte, die 2 l -Erlenmeyerkolben und die Aquarien waren in einem vierstöckigen Regal untergebracht (s. Anlage 1). Auf dem obersten Regalboden befand sich die Wasservorratswanne, auf dem zweiten Regalboden von oben standen auf der Vorderseite die mit den Chloranilinlösungen gefüllten Ganzglasbehälter, die 40 Liter fassten. Dahinter standen die Erlenmeyerkolben. Die tieferen Regale waren mit

den Fischbecken (18 l Inhalt, Vollglasbecken) besetzt. Die Stammlösungen wurden mittels Telabpumpen in ein aus einem 2 l -Erlenmeyerkolben bestehendes Mischgefäß gepumpt, dem auch das zur Verdünnung erforderliche Leitungswasser zugeführt wurde. Die Durchmischung der Medien erfolgte mit Hilfe eines dem Erlenmeyerkolben untergestellten Magnetrührers. Die Erlenmeyerkolben waren mit jeweils drei in Bodennähe vom Glasbläser angebrachten Abflüssen versehen. Ein weiterer Abfluss war im oberen Drittel des Kolbens angebracht und diente als Überlauf des zugeführten Wassers. Die Zuflüsse wurden ca. 10% höher eingestellt als es der in die Aquarien fließenden Wassermenge entsprach. Dadurch blieb gewährleistet, dass stets die gleichen Wassermengen in die Aquarien flossen. Der Zulauf des Leitungswassers in die Erlenmeyerkolben erfolgte über einen Polyethylen-Schlauch aus einer noch oberhalb der 4-CA - Lösung sich befindenden Vorratswanne, wobei das Wasser über die Schwerkraft dem Mischgefäß zugeführt wurde. Die Fließrate wurde mittels einer Plastik-Pipettenspitze dosiert und täglich überprüft. Von drei Mischgefäßen wurden jeweils drei Aquarien über Polyethylen-Schläuche mit der 4-Chloranilin-Lösung versorgt, ein Mischgefäß hatte nur einen Ausfluss. Alle zuführenden Schläuche wurden mit Isoliermaterial gegen Erwärmung des Wassers geschützt.

Berechnung des Verbrauchs

Verbrauch von 5 ml Stammlösung / min bedeutet 300 ml / h und 7,2 l / d, daher Verbrauch in 3 Tagen 21,6 l. Um mögliche chemische Veränderungen zu vermeiden, wurde jeden dritten Tag die Stammlösung durch frisch angesetzte Lösung ersetzt. Die verbliebene Stammlösung wurde über einen Aktivkohlefilter geleitet bevor sie ins Abwasser abgelassen wurde.

Geräte zur Hälterung der Fische und zur chemischen Analytik (ohne HPLC)

Waage, zur Gewichtsbestimmung der Fische und zur Einwaage des Chloranilins: Sartorius (Nr. 1265 MP),

Magnetrührer (Firma Janke und Kunkel, Staufen i. Br.),

Telabpumpen (Labordosierpumpe der Firma Telab Technology GMBH, Moers),

Elektrische Wasserpumpe zum Absaugen der Futter- und Kotreste (bezogen aus einem Baumarkt),

Messgeräte zur Temperatur-, Sauerstoff- und pH-Bestimmung: WTW Digi 88 und WTW pH 90 der Firma WTW (Weilheim, Obb.)

Eppendorfcentrifuge, Vortex

Chemikalien für die HPLC

Die für die HPLC verwendeten Standardchemikalien wurden bezogen von den Firmen Merck (Darmstadt), Alltech Grom, GmbH (Rottenburg-Hailfingen) und von Baker (Griesheim).

Chemikalien von Merck: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ p.a., $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ p.a., Natronlauge 32 % p.a., o-Phosphorsäure 85 % p.a., Tetrahydrofuran LiChrosolv, Wasser für HPLC (Merck) LiChrosolv, Methanol, 4-Chloranilin zur Synthese, Gehalt > 99 %, Heparin

Chemikalien von Alltech Grom : Boratpuffer, 5-Sulfosalicylsäure 30 % w/v in 1.02 mM
L-Norvalinlösung,
OPA-Reagenz (o-Phthdialdehyd-3-mercaptopropion-Säure) zum
Derivatisieren, L-Aminosäurenstandard, Aminosäuren

Chemikalien von Baker: Acetonitril ultra gradient grade

Zur HPLC benötigte Geräte:

Entgaser, VDS optilab (Montabaur)
HPLC-Pumpen: Pharmacia LKB Pumpe 2150 (Freiburg)
Gradientensteuergerät Pharmacia LCC 2252 (Freiburg)
Autosampler: Shimadzu Sil 9A Autoinjector (Duisburg)
Säulenofen: VDS optilab
Detektor: Shimadzu Fluoreszenzdetektor RF 551
Integrator: Shimadzu C-R5A
Reinigungsvorsäule: 40 x 4.6 mm (Alltech Grom)
Vorsäule: 10 x 4,6 mm (Alltech Grom)
Trennsäule: OPA – Spezialsäule Grom-SIL OPA - 1,3 µm, 150 x 4,6 mm.

Verbrauchsmaterial: 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (Brand), Autosampler Vials (1,5 ml
Probefläschchen aus Braunglas (Wicom, Heppenheim)
Latex-Handschuhe (Merck)

Messbedingungen:

Elutionsmittel A : Stammpuffer:
Phosphatpuffer 25 mM, pH 7,2, (1,6 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O,
2,1 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O in 1000 ml Aqua dest.)
5 ml Tetrahydrofuran

Elutionsmittel B: 350 ml Methanol
150 ml Acetonitril
500 ml Stammpuffer

2. 2 Hälterungs- und Bestimmungsmethoden

2.2.1 Hälterung und Fütterung der Tiere

Nach einer 3-wöchigen Adaptionphase in der Großgruppe im Keller des Zoologischen Instituts II der Universität Karlsruhe wurden die Fische einzeln in Vollglasbecken (im Keller der BfE Karlsruhe) überführt, damit sie sich in den folgenden 7 Tagen vor der Schadstoffexposition an die Einzelhaltung gewöhnen konnten. Danach erfolgte die Exposition über eine Zeitspanne von 26 Tagen.

Die Vollglasaquarien der Maße 36x23x26 cm (Länge x Breite x Höhe, Modell Assistent) fassten bis zum Abfluss 18 Liter. Auf der vorderen Schmalseite war in einem Bohrloch ein Abflussrohr angebracht. Der Wasserzufluss erfolgte an der hinteren Schmalseite über ein tief nach unten reichendes Glasrohr, dessen Mündung mit einer Pipettenspitze bis auf den Boden verlängert war. Die Wassermenge wurde über einen Anschnitt am unteren Ende einer Plastik-Pipettenspitze geregelt. Durch diese Anordnung war gewährleistet, dass ein diagonaler Wasserdurchfluss von hinten unten rechts nach vorne oben Mitte zustande kam (s. Anlage 1).

Für jede Konzentration bzw. Kontrolle wurden jeweils 10 Kontroll- und 10 Probenfische in Einzelbecken eingesetzt (s. Anlage 1). Auf einem Regalboden standen je fünf Becken für die Kontrollfische und für die zur Exposition vorgesehenen Tiere in alternierender Anordnung, d.h. neben dem Becken eines Kontrollfisches stand eines, das den dem Schadstoff ausgesetzten Fisch enthielt. Zur Vermeidung eines optischen Kontakts der Fische und zur zusätzlichen Temperaturisolierung wurden zwischen die Aquarien Styroporplatten gestellt. Über jeweils fünf Becken lag eine schwere, durchsichtige Kunststoffplatte, die das Herausspringen der Tiere verhinderte, ein genaues Beobachten aber zuließ.

Wie bei der Haltung im großen Becken wurde auch hier eine Photoperiode Licht : Dunkel = 12 : 12 eingestellt. Als Lichtquelle dienten vier Leuchtstoffröhren der Marke Philips Universal Weiss (je 40 Watt) weiß, die 20 cm über den Becken angebracht waren (s. Anlage 1).

Beim Umsetzen in die Einzelbecken wurden die Tiere auf Pilz- und Ektoparasitenbefall überprüft und es wurde darauf geachtet, dass in alle Becken etwa gleich große Tiere gesetzt wurden. Auf eine genauere Auswahl nach Länge oder Gewicht wurde verzichtet, weil die Tiere so wenig wie möglich gestresst werden sollten, um eine Infektionsgefahr zu vermeiden. Die Einzelbecken waren vor dem Besatz mit Actomar B 100 (Desag AG, CH 4107 Ettingen) desinfiziert worden.

Zur Wasserversorgung der Einzelbecken wurde ein Durchfluss von 8 Liter Wasser pro Stunde eingestellt. Diese Rate wurde gewählt, um einerseits eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, andererseits sollte auch eine Wassertemperatur von 16°C nicht überschritten werden. Das Leitungswasser lief, bevor es in die Vorratswanne gelangte, zur Stickstoff - Entgasung durch einen mit Tonröhrchen (Tonringe von Eheim, Deizisau) bestückten Kunststoffzylinder, in den im Gegenstromprinzip zum Strippen des Wassers Luft von unten eingeblasen wurde. Das aus den Fischbecken ablaufende Wasser wurde zur Entfernung des 4-Chloranilins über einen mit Aktivkohle gefüllten Filter geleitet, bevor es in die Kanalisation gelangte. Das Abwasser wurde auf seinen Gehalt an CA in wöchentlichem Abstand überprüft.

Vor jeder Fütterung wurden die Tiere auf Pilzbefall per Augenschein überprüft, danach wurden Sauerstoffkonzentration und Temperatur gemessen. Die Fütterung der Tiere in den Einzelbecken erfolgte regelmäßig am Nachmittag mit dem Alleinfuttermittel für Forellen Trouvit pro aqua 20. Mit diesem Futter wurden die Tiere nicht nur in der Vorhaltung, sondern bereits in der Fischzuchtanstalt gefüttert. Da Körperlänge und -gewicht vor Versuchsbeginn gemessen wurden, konnte für jede Forelle die Futtermenge abgewogen werden, die ihr laut „Einsatzempfehlung für Forellen“ der Milkivit-Werke zustand. So erhielten Fische mit einer Länge zwischen 16 – 22 cm und einem Gewicht zwischen 50 –

130 g bei einer Wassertemperatur von 14,5°C eine tägliche Nahrungsmenge, die 1,5 % ihres Gewichts entsprach.

pH – Wert, Temperatur und Sauerstoffkonzentration

Der pH – Wert in den Becken lag im Mittel bei 7,3. Temperatur und O₂ – Konzentration wurden täglich gemessen (s. Anlagen 3). Die in den Diagrammen erkennbare Zunahme der Wassertemperatur von 10,2°C auf 12,2°C ist durch die Jahreszeit begründet. Da diese Temperaturzunahme sowohl bei den Kontrolltieren wie auch bei den behandelten Tieren auftrat, dürften die Auswirkungen auf die Versuchsergebnisse bei den Kontroll – und Versuchsfischen in gleicher Weise erfolgt sein; freilich ist nicht völlig auszuschliessen, dass die exponierten Tiere auf diese geringe Temperaturveränderung anders reagiert haben als die weniger gestressten Kontrolltiere. Vor jeder Fütterung wurden Temperatur und Durchflussrate überprüft. Um Infektionen vorzubeugen, wurde für jedes Becken ein eigener Absaugschlauch benutzt, mit dem Faeces und Futterreste entfernt wurden.

Die Konzentration von CA in den Aquarien ergibt sich, wie bereits erwähnt, aus den Zuläufen von Stammlösung und Wasser in die Erlenmeyerkolben. Diese Zuflüsse wurden täglich überprüft. Ferner erfolgte am zweiten Tage nach Versuchsbeginn eine analytische Bestimmung der 4-CA - Konzentration in den Aquarien mittels HPLC und danach jede Woche einmal. Einzelheiten: 20 µl Wasser aus dem Schadstoff zugeführten Becken wurden auf eine Nucleosil 100-SL 18 Säule, Länge 20 cm (Mackerey-Nagel, Düren) aufgebracht, die Substanz wurde mit Acetonitril - Wasser 1:1 eluiert . Die Messung erfolgte bei 238 nm, Fließrate 1 ml/min, Retentionszeit 4,5 min. Bei Mehrfachbestimmungen wichen die Ergebnisse weniger als 5 % voneinander ab. Daher wurde jede Probe nur einmal injiziert. Die Ergebnisse sind in der Anlage 2 wiedergegeben.

In den Versuchen mit 2 und 4 mg CA/ l gab es Tiere, die mit zunehmender Versuchsdauer immer weniger bzw. keine Nahrung mehr aufnahmen. Die Überprüfung der Sauerstoffkonzentrationen und des Temperaturverlaufs in den Becken der Nahrungsverweigerer ließ keine Unterschiede zu den Normalfressern erkennen. Folglich können die Veränderungen der Parameter auf die Wirkung des Chloranilins zurückgeführt werden.

2.2.2 Bestimmung des Körpergewichts, der Körperlänge und des Korpulenzfaktors

Bestimmung des Körpergewichts und der Körperlänge

Körpergewicht und –länge der Forellen wurden jeweils vor Versuchsbeginn und am Versuchsende ermittelt. Um die empfindliche Schleimhaut der Tiere zu schützen, wurden sie mit nassen Plastikhandschuhen dem Fangnetz entnommen und in einer nassen, mit Kunststoffolie ausgekleideten Wanne gewogen. Die Messung der Körperlänge erfolgte mit Hilfe eines in die Wanne gelegten Maßstabes.

Definition und Berechnung des Korpulenzfaktors

Der Wachstumszuwachs eines Fisches sollte immer mit einer guten Nahrungsverwertung verbunden sein. Fulton (zitiert in Steffens, 1985) fand heraus, dass die Beziehung zwischen Länge und Masse bei den einzelnen Fischarten relativ konstant ist und sich in der nach ihm benannten Formel wiedergeben lässt.

Die durch Einwirkung des Schadstoffs sich ergebenden Veränderungen auf Masse und Länge der Fische gehen somit beide in die Berechnung des Korpulenzfaktors ein. Der Korpulenzfaktor wird auch als Körperfülle- oder Konditionsfaktor bezeichnet. Er berechnet sich wie folgt:

$$K = \frac{100 \times p}{L^3}$$

wobei L die Gesamtlänge in (cm) und p die Masse des Fisches in (g) wiedergibt.

Je höher der Korpulenzfaktor, desto größer ist die auf die Längeneinheit entfallende Masse (Steffens, 1985). Danach können unterschiedliche Werte des Korpulenzfaktors auf verschiedene Füllungsgrade des Darmes zurückzuführen sein. Neben dem Ernährungszustand nimmt auch die geschlechtliche Entwicklung Einfluss auf diesen Faktor. Nach Steffens liegt der Korpulenzfaktor für Regenbogenforellen im Schnitt bei 1,1 (1,0 – 1,2), bei Karpfen schwankt er zwischen 2,0 und 2,5.

2.2.3 Blutentnahme und Gewinnung des Blutplasmas

Zwei Tage vor der Schadstoffexposition wurden die Forellen gewogen, vermessen und punktiert. Die Blutentnahme erfolgte aus der caudalen Schwanzvene. Heparinisierte Einwegspritzen (1ml) wurden am distalen Ende der Afterflosse eingestochen. Das entnommene Blutvolumen sollte so klein wie möglich gehalten werden, um Schäden bei den Tieren zu vermeiden. Für die geplanten Untersuchungen war ein Minimalvolumen von 450 µl ausreichend. Am Ende des Versuches wurde dann den Tieren das doppelte Blutvolumen entnommen.

Gewinnung des Blutplasmas

Das entnommene Blut wurde sofort in ein Eppendorf – Gefäß überführt und bei 10.000 U/m und drei Minuten Laufzeit zentrifugiert, womit eine Trennung von Plasma und festen Bestandteilen erreicht wurde. Das überstehende Plasma wurde sorgfältig abpipettiert, gleichmäßig auf zwei bzw. drei Eppendorf – Gefäße verteilt und bei – 80°C eingefroren.

2.2.4 Blutausstrich und Färbung der Blutzellen

Die Entnahme für die Blutzell - Untersuchung erfolgte jeweils nur am Versuchsende. Sofort nach der Blutentnahme wurde je ein Tropfen Blut auf drei mit Ethanol entfettete Objektträger gegeben. Dieser Tropfen wurde dann mit einem Deckglas im spitzen Winkel (45°), gleichmäßig und nicht zu langsam ausgestrichen. Um ein differenziertes Blutbild zu erhalten, wurden die luftgetrockneten Objektträger nach PAPPENHEIM gefärbt.

In der Färbekbank:

- Objektträger mit konzentrierter MAY – GRÜNWALD - Lösung bedecken 3 min.
- mit Pipette A. dest. zufügen, einwirken lassen 1 min.
- Färbelösung abkippen, Unterseite der Objektträger abwischen
- Auftragen verdünnter GIEMSA-Lösung 20 min.
(30 Tropfen GIEMSA und 30 ml A. dest.) Spritzflasche
- Objektträger zum Trocknen schräg stellen

Zur Herstellung der Dauerpräparate wurde auf die Ausstriche Eukitt (O. Kindler, Freiburg) als Einschlußmittel aufgetragen. Ein Deckglas in der Größe des Objektträgers ermöglichte die Auswertung des gesamten Blutausstriches.

2.2.5 Bestimmung der Veränderung der Blutzellen

Auszählen der Blutkörperchen

Von jedem Tier wurden drei Blutausstriche erstellt. Von jedem Blutausstrich wurden bei 1000-facher Vergrößerung jeweils drei verschiedene Ausschnitte photographiert (Agfa HDC 100, Negativ), in denen eine relativ gleichmäßige Blutzelldichte vorlag. Die Ausschnitte wurden so gewählt, dass bei mäanderartigem Verschieben des Objektträgers ca. 1000 Zellen erfasst wurden. Über die davon angefertigten Farbbilder (19 x 12,5 cm) wurde eine Glasplatte zum Auszählen der Zellen gelegt. Auf diese Weise konnte jede erfasste Blutzelle auf der Glasplatte markiert werden; Doppelzählungen ließen sich so vermeiden. Die Anzahl bestimmter Zellen in Prozent wird auf die Gesamtzahl ausgezählter Zellen (jeweils etwa 1000) bezogen.

Von den deutlich unterscheidbaren Blutzelltypen waren 7 von quantitativer Bedeutung :

Erythroblast II, Proerythrozyten, reife Erythrozyten, Erythrozyten-Abbauförmchen, segmentkernige Granulozyten, Lymphozyten und Spindelzellen (Thrombozyten). Die Wirkung der verschiedenen Chloranilin-Konzentrationen auf die relative Anzahl dieser Blutzelltypen wird beschrieben.

Die Beschreibung der Blutzellformen entspricht im Wesentlichen derjenigen von Lehmann und Stürenberg (1974):

Erythroblast II (a) : Zellform noch rund, Tendenz zur ovalen Form erkennbar; Durchmesser etwa 8 µm;
Form des Zellkerns noch rund mit Tendenz nach oval; Plasmasaum um den Zellkern deutlich breiter und heller als im Stadium zuvor; zentrales Chromatin

dichter als im Randbereich.

- Proerythrozyt (b) : Zellform schwach oval, Zelllänge 12 - 13 μm , Breite: ca. 8 μm ; Kern liegt zentral, Kernform schwach oval; Cytoplasmaschicht um den Kern breiter als in (a).
- Reifer Erythrozyt (c₁): Zellform deutlich oval; Länge etwa 15 μm , Breite etwa 9 -10 μm ; Kernform deutlich oval und zentral gelegen. Cytoplasma umgibt relativ gleichmäßig den Kern.
- Überreifer Erythrozyt (c₂): Zellform wie (c₁), Chromatin des Zellkerns mehr zum Zellkernrand verlagert, dadurch erscheint die Zellkernmitte heller, Chromatin zeigt körnige Struktur.
- Erythrozyten – Abbauformen (d): ovale Zellform geht verloren, Zellmembran wird abgebaut, ovaler Kern rundet sich ab, bevor er seine Form verliert, das Chromatin lockert sich auf und läuft ins Cytoplasma, Unterscheidung Cytoplasma – Kern nicht mehr möglich.
- Segmentkernige Granulozyten (e): Zellform leicht oval bis unregelmäßig gerundet, Zellkern in zwei bis mehrere Segmente unterteilt, die durch dünne Chromatinbrücken verbunden sind; Chromatin uneinheitlich gefärbt.
- Lymphozyten (f) : Zellform mehr oder weniger rund, Durchmesser etwa 8 μm , Plasmaaum nur an einer Stelle erkennbar.
- Spindelzellen (Thrombozyten), (g) : Zellform stäbchenartig, Länge etwa 12 μm , Durchmesser ca. 4 μm ; langgestreckter Zellkern wird von einem Plasmaaum umgeben, der an den Enden stärker ausgebildet ist.

Abb. 1 - 7 Blutausstriche von Forellen (Färbung nach Pappenheim, Vergrößerung 1000 fach)

Abb. 1: Erythroblast II / reifer Erythrozyt

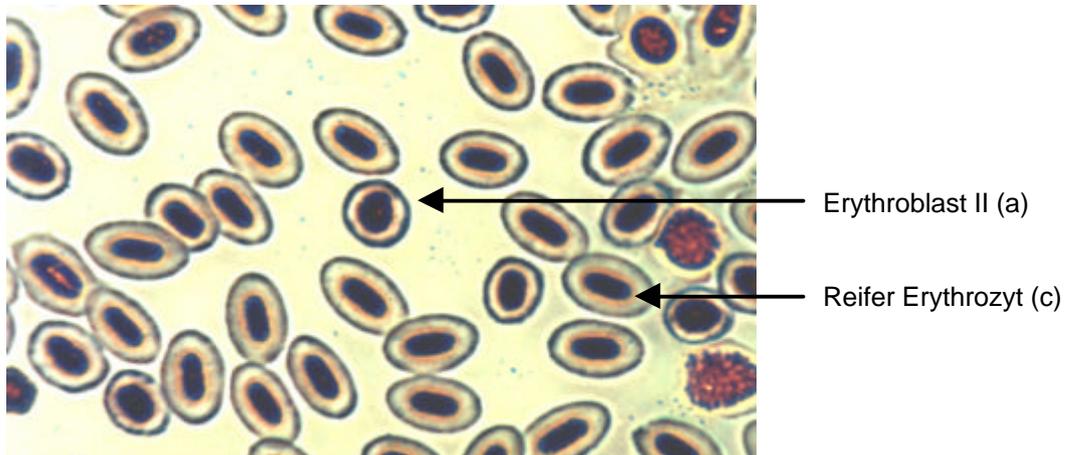
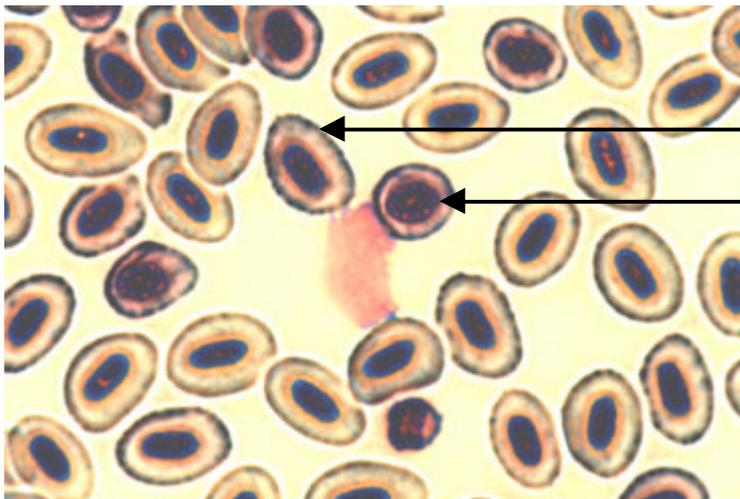


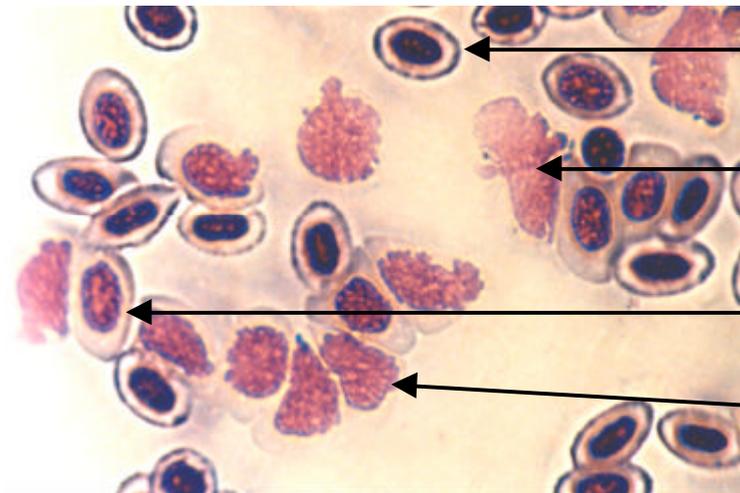
Abb. 2: Proerythrozyt / Erythroblast II



Proerythrozyt (b)

Erythroblast II (a)

Abb. 3: Erythrozyt – Abbauf orm II und III, überreifer Erythrozyt



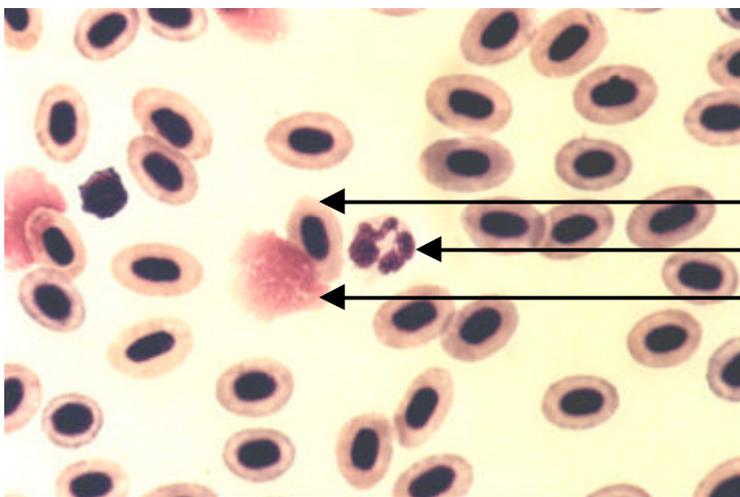
Erythroblast II (a)

Erythrozyt - Abbauf orm III (d)

Überreifer Erythrozyt (c₂), Chromatin zeigt in der Kernmitte eine deutliche Auflockerung.

Erythrozyt - Abbauf orm II

Abb. 4: Reifer Erythrozyt, segmentkerniger Granulozyt, Abbauf orm III eines Erythrozyten

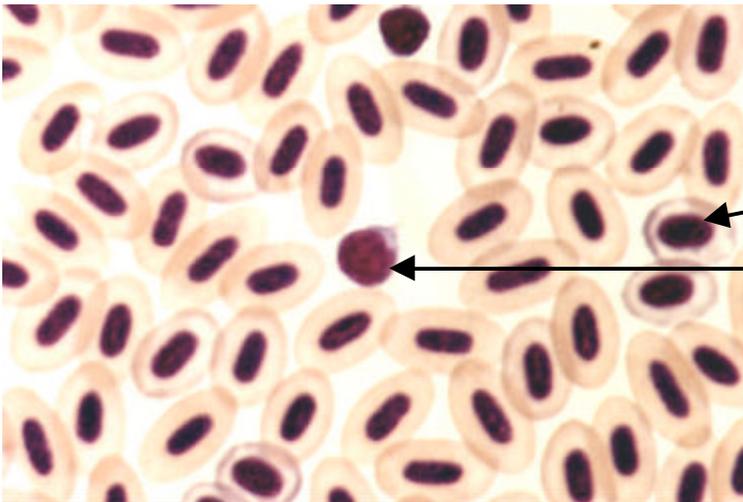


Reifer Erythrozyt

Segmentkerniger Granulozyt (e)

Abbauf orm III eines Erythrozyten

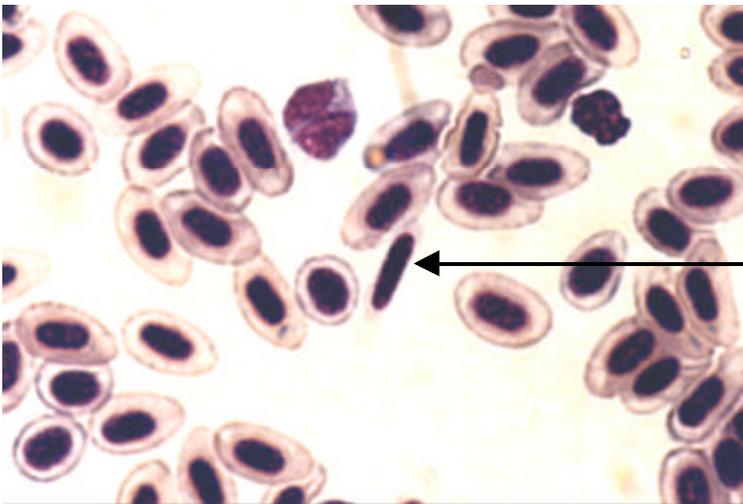
Abb. 5: Proerythrozyt, Lymphozyt



Proerythrozyt

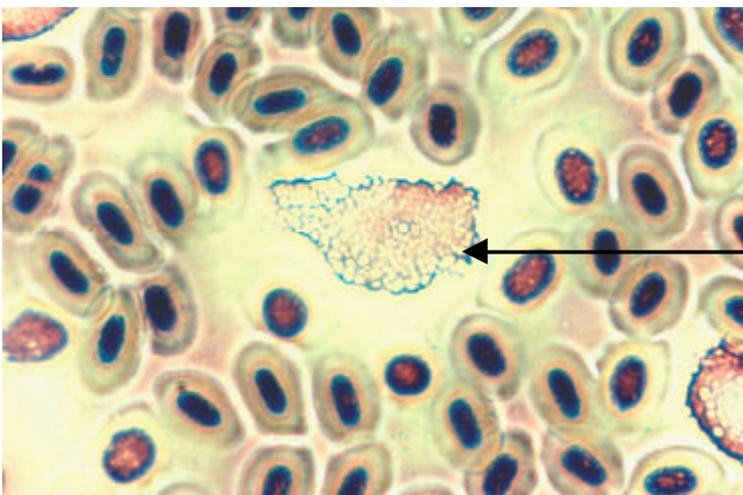
Lymphozyt (f), mit dem nur an einer Stelle erkennbaren Plasmasaum, umgeben von reifen Erythrozyten

Abb. 6: Spindelzelle



Stäbchenartige Spindelzelle (Thrombozyt, g) mit deutlich erkennbaren Plasmakappen

Abb. 7: Erythrozyt-Abbaustufe III - IV



Erythrozyt - Abbaustufe III - IV. Der Plasmasaum ist gerade noch geschlossen, das Chromatin hat sich aufgelöst.

2.2.6 Präparation der Tiere

Nach der letzten Blutentnahme erfolgte das Töten der Tiere durch einen Schlag auf den Kopf. Körperlänge und – gewicht wurden bestimmt. Danach wurden die Organe freigelegt. Mit einem von caudal nach cranial geführten Längsschnitt wurden die Tiere ventral geöffnet. Die linke Rumpfseite wurde bis zur Wirbelsäule entfernt. Durch Abtragen der hinteren Teile des Kiemendeckels (Inter- und Suboperculum) wurde der Situs freigelegt. Mit einem von lateral nach medial geführten Schnitt wurde die Scheidewand (Septum transversum) zwischen Pericard und Peritonealhöhle zur Seite geklappt. Jetzt waren Leber und Herz gut sichtbar.

Leber und Herz wurden so schnell wie möglich entnommen, um jegliche Art von postmortalen autolytischen Veränderungen so gering wie möglich zu halten. Die Leber wurde vorsichtig von den sie versorgenden Gefäßen getrennt. Da die Leber bei der Regenbogenforelle ein kompaktes Organ darstellt, nicht wie beim Karpfen in Lappen unterteilt ist, in denen Darmschlingen liegen, konnte das Herauslösen der Leber sehr schnell erfolgen. Nach Entfernen der Gallenblase wurde sie gewogen.

Nach Durchtrennen der Vene und Aorta wurde das Herz – mit Atrium, Ventriculum und Bulbus arteriosus – aus dem Pericard entnommen und gewogen.

2.3 Bestimmung der Aminosäure-Konzentration

Vorbereitung des Blutplasmas für die Bestimmung der Aminosäuren

Enteweißung der Probe

Nach dem Auftauen der Plasmaprobe wurden 9 Teile Plasma zur Enteweißung mit 1 Teil der Lösung S (5-Sulfosalicylsäure 30% W/V) versetzt. Sie enthält 1,02 mM L-Norvalin-Lösung als internen Standard. Damit eine vollständige Proteinfällung erreicht wird, wird die Probe 30 min bei 4°C im Kühlschrank stehen gelassen und dann zentrifugiert ($g = 14.000$ U/m). Der klare Überstand wird abpipettiert und bis zur Analyse bei – 80°C aufbewahrt.

Derivatisierung

Die Derivatisierung der Aminosäuren erfolgte als Vorsäulenderivatisierung in der Chromatographie mit der ortho-Phthaldialdehyd (OPA) – Mercaptoethanol – Methode (Cooper et al., 1984). Aminosäuren reagieren bei $\text{pH} > 7$ mit OPA und einem Thiol zu einem instabilen, intensiv fluoreszierenden Indolderivat (siehe Abb. 8). Dieses lässt sich bei $\text{pH} 7,2$ stabilisieren (Firma Alltech Grom, Empfindliche Bestimmung von Aminosäuren, 1995). Die zur Derivatisierung notwendigen Reagenzien stammten von der Firma Alltech Grom GmbH (Rottenburg-Hailfingen). Mit diesem Verfahren lassen sich noch Konzentrationen von 1 – 5 fMol in der Standard HPLC (4 mm ID-Säulen) erfassen.

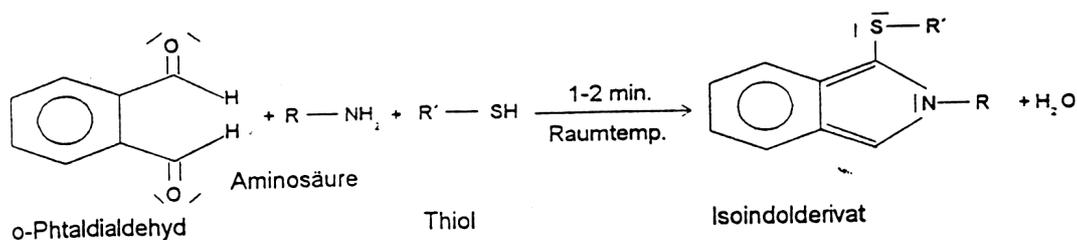


Abb. 8: Reaktion des OPA und einer Aminosäure zu einem Isoindolderivat (aus Alltech Grom, Analytik+HPLC).

OPA-Reagenz:

Das mitgelieferte OPA-Reagenz wird mit Boratpuffer 1:10 verdünnt.

Boratpuffer:

1 M, pH = 10,7

61,8 g Borsäure in ca. 900 ml HPLC-Wasser lösen und mit Natronlauge (NaOH : H₂O = 1:1) auf pH 10,7 einstellen. Danach mit HPLC-Wasser zu 1000 ml auffüllen.

Die Reinheit der eingesetzten Borsäure beeinflusst die Nachweisgrenze sehr deutlich, deshalb sollte besonders bei empfindlichen Messungen höchste Reinheit verwendet werden.

Stammpuffer

ist ein Phosphatpuffer (25 mM) mit pH = 7,2

1,60 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O und 2,10 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O zu 1000 ml HPLC-Wasser

Überprüfung des pH-Wertes, Einstellen des pH-Wertes auf 7,2 mit verdünnter Natronlauge bzw. H₃PO₄.

Vorgang:

Das enteweißte, in Eiswasser langsam aufgetaute Plasma wurde mit HPLC-Wasser 1:1 verdünnt. Hiervon 25 µl entnehmen, mit 1 ml Wasser und 200 µl Boratpuffer versetzen und mit Hilfe eines Vortex - Gerätes vermischen. Diese Mischung eine Stunde stehen lassen.

Aus dieser Mischung 460 µl entnehmen und in ein Autosampler - Fläschchen pipettieren.

Bestückung des Autosamplers:

20 ml des OPA-Reagenz in das für eine Vorsäulenderivatisierung bestimmte Vorratsgefäß

füllen. Alle weiteren Schritte erfolgen automatisch. Zu jeder Probe soll das Gerät 200 µl OPA - Reagenz zugeben.

Am Sampler wird eine Derivationszeit von 1,7 min eingestellt. Unmittelbar danach erfolgt die Injektion auf die Trennsäule von 10 µl des Reaktionsansatzes.

Durchführung der HPLC

Der Aufbau des HPLC-Systems ist aus Abb. 9 ersichtlich (aus: Versuchsanleitung der Firma Alltech Grom, Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung der Firma).

1. Eluentenreservoirs
2. binäres Gradientensystem
3. Reinigungsvorsäule
4. Autosampler
5. Säulenofen mit
6. Trennsäule
7. Fluoreszenzdetektor
8. Integrator

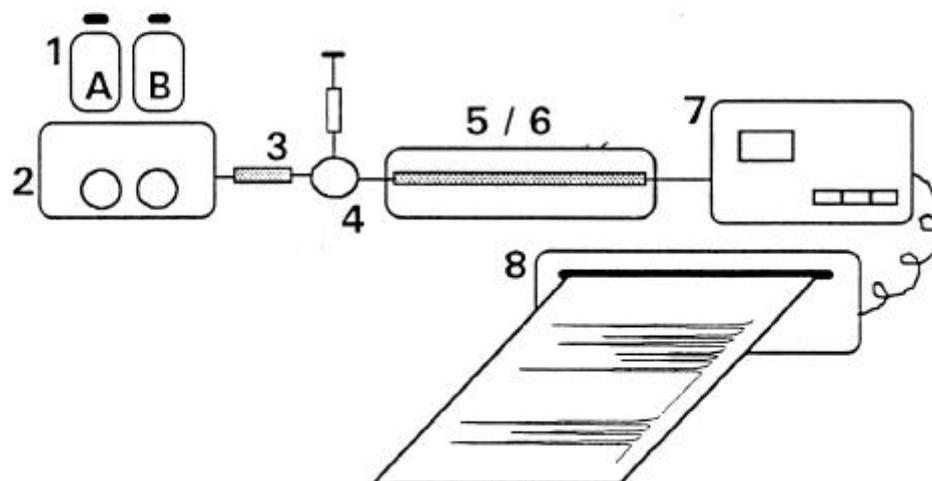


Abb. 9: Aufbau des HPLC-Systems (nach Alltech Grom)

Die Elution der Aminosäuren erfolgte mittels eines Gradienten.

Elutionsmittel A: 1000 ml Stammpuffer
5 ml Tetrahydrofuran

Elutionsmittel B: 350 ml Methanol
150 ml Acetonitril
500 ml Stammpuffer

Fließrate	1,1 ml/min
Anregungswellenlänge	330 nm
Emissionswellenlänge	450 nm
Injektionsvolumen	10 µl
Temperatur	26°C
Detektion	Fluoreszenz
Empfindlichkeit	Attenuation 10

Zeitabfolge (nach eigener Erfahrung, von der Alltech Grom-Vorgabe abweichend):

Zeit t in min.	Flow (ml)	% Elutionsmittel B (s. S. 19)
0	1,1	0
3	1,1	0
20	1,1	18
25	1,1	35
36	1,1	45
40	1,1	60
43	1,1	75
45	1,1	90
47	1,1	100
52	1,1	100
54	1,1	0
75	1,1	0

Derivatisierung des Aminosäurestandards (enthält zusätzliche Aminosäuren):

1. 9990 µl Wasser in einen Erlenmeyerkolben pipettieren
2. 10 µl des Aminosäurestandards (jede As 2,50 µMol/ml) zupipettieren
3. 10 µl Interner Standard, Norvalin (2,50 µMol/ml) zugeben
4. 10 µl zusätzliche Aminosäuren (Konz. 2,5 µMol/ml) zugeben
5. 2 ml Boratpuffer zugegeben

12,03 ml enthalten 25 nMol jeder As

1 ml enthält 2,08 nMol As-Standard-Konzentration

6. Der Probengeber wird auf folgendes Mischungsverhältnis programmiert:
Standardprobe: 2,3 Volumenteile
OPA-Reagenz: 1,0 Volumenteile

Da der L-Aminosäurestandard der Firma Alltech Grom nur 17 Aminosäuren (Ala, Arg, Asp, ½ (Cys₂), Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, The, Tyr, Val) enthielt, wurde der Standard noch um folgende Aminosäuren erweitert: Asn (Asparagin), Cit (Citrullin), Tau (Taurin), Gln (Glutamin), und Orn (Ornithin); Taurin und Ornithin gehören nicht zu den primären oder Standard-Aminosäuren; Taurin wurde deshalb in die Messung mitaufgenommen, weil es sich hier um eine Aminosäure handelt, die bei Fischen in relativ hoher Konzentration vorkommt; Citrullin deshalb, weil sie im Harnstoffcyclus vorkommt. Die biogenen Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin lassen sich mit dieser Methode nicht nachweisen.

Berechnung bei interner Standardisierung

Eine Plasmaprobe wird auf freie Aminosäuren untersucht. Standard und Probe werden wie beschrieben vorbereitet. Bei Verwendung der Lösung S (Sulfosalicylsäure) ist bereits der interne Standard (Norvalin) in der Probe enthalten.

Der Aminosäure-Standard und der interne Standard weisen eine Konzentration von 2,5 µMol/ml auf. Er wird zur Derivatisierung um den Faktor 30 + 12 000 (1:1203) auf eine Konzentration von 2,08 nMol/ml verdünnt.

9 Teile (µl) der Probe werden mit 1 Teil (µl) der Lösung S verdünnt (Verdünnungsfaktor: 1,11). Die Konzentration an Norvalin beträgt dann 102,0 nMol/ml. Bei der Pufferung der Probe ergibt sich ein Verdünnungsfaktor von 49. Fasst man beide Verdünnungsfaktoren zusammen, so beträgt dieser 54.44. Die Endkonzentration von Norvalin beträgt 2,08 nMol/ml und ist damit identisch mit der Norvalinkonzentration des Standards.

Da die Probe (Derivatisierung, 10 µl Injektion) für die Messung mit HPLC-Wasser 1:1 verdünnt werden musste, um saubere Peaks zu erhalten, wurde für die Berechnung der Aminosäurekonzentration für den internen Standard der Wert der Peakhöhe für Norvalin in der Probe verdoppelt. Abweichend von der Vorgabe der Firma Alltech-Chrom wurden hier aus analytischen Gründen die Peakhöhen zur Berechnung der Aminosäurekonzentrationen eingesetzt.

Höhe _{ALA Std}	Peakhöhe von Alanin im Standard: 129824 (Nr. von Alltech Grom, entspricht 2,08 nMol/ml)
Höhe _{ALA Probe}	Peakhöhe von Alanin in der Probe: 226515 (entspricht x nMol/ml)
Höhe _{ISStd}	Peakhöhe von Norvalin im Standard: 145231
Höhe _{IS Probe}	Peakhöhe von Norvalin in der Probe: 142786
C _{ALA}	Konzentration von Alanin in der Probe
C _{ALA Std}	Konzentration von Alanin im Standard: 2,08 nMol/ml
VF _P	Verdünnungsfaktor der Probe: 98 * 1,1111 = 108,8

Eichfaktor: EF

$$EF = \frac{\text{Höhe}_{IS\ Std} * C_{ALA\ Std}}{\text{Höhe}_{ALA\ Std}}$$

Berechnung der Probenkonzentration (interner Standard):

$$C_{ALA\ Probe} = \frac{\text{Höhe}_{ALA\ Probe} * EF * VF_P}{\text{Höhe}_{IS\ Probe}}$$

Diese zwei Einzelschritte können zusammengefasst werden:

$$C_{ALA\ Probe} = \frac{\text{Höhe}_{ALA\ Probe} * \text{Höhe}_{IS\ Std} * C_{ALA\ Std} * VF_P}{2 * \text{Höhe}_{IS\ Probe} * \text{Höhe}_{ALA\ Std}}$$

Konstante Parameter sind: VF = 108,88 und C_{ALA Std} = 2,08, diese ergeben einen Faktor F = 226,47
Mit diesem Faktor ergibt sich folgende Gleichung:

$$C_{\text{ALA Probe}} = \frac{\text{Höhe}_{\text{ALA Probe}} * \text{Höhe}_{\text{IS Std}} * F}{2 * \text{Höhe}_{\text{IS Probe}} * \text{Höhe}_{\text{ALA Std}}}$$

Da der hier eingesetzte Standard durch zusätzliche Aminosäuren erweitert wurde, ergab sich ein Verdünnungsfaktor von 108,88.

In den Abbildungen 10a und 10b sind zwei Chromatogramme wiedergegeben, wie sich mit der sehr empfindlichen Bestimmung der Aminosäuren durch Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd ergaben. Abb. 10a zeigt die Aminosäuren eines um die Aminosäuren Asparagin, Citrullin, Taurin und Ornithin erweiterten L-Aminosäurenstandards der Firma Alltech Grom. Zusätzlich wurde Nor-Valin als interner Standard zugefügt. Abb. 10b demonstriert eine Trennung der Aminosäuren eines Plasmas mit dieser Methode. Allerdings war die Trennung der Aminosäuren Asparagin und Serin in der Mehrzahl der Analysen nicht so deutlich, so dass sie nicht in die Auswertung aufgenommen wurden. Da Tryptophan und Ornithin ebenfalls nicht in allen Plasmen nachgewiesen werden konnten, wurde auch auf eine Auswertung dieser Aminosäuren verzichtet. Fraglich ist auch die Auswertung der Aminosäure Citrullin, deren Konzentrationen in den Versuchen 2 und 3 stark differierten und /oder nicht in Plasmen detektierbar waren.

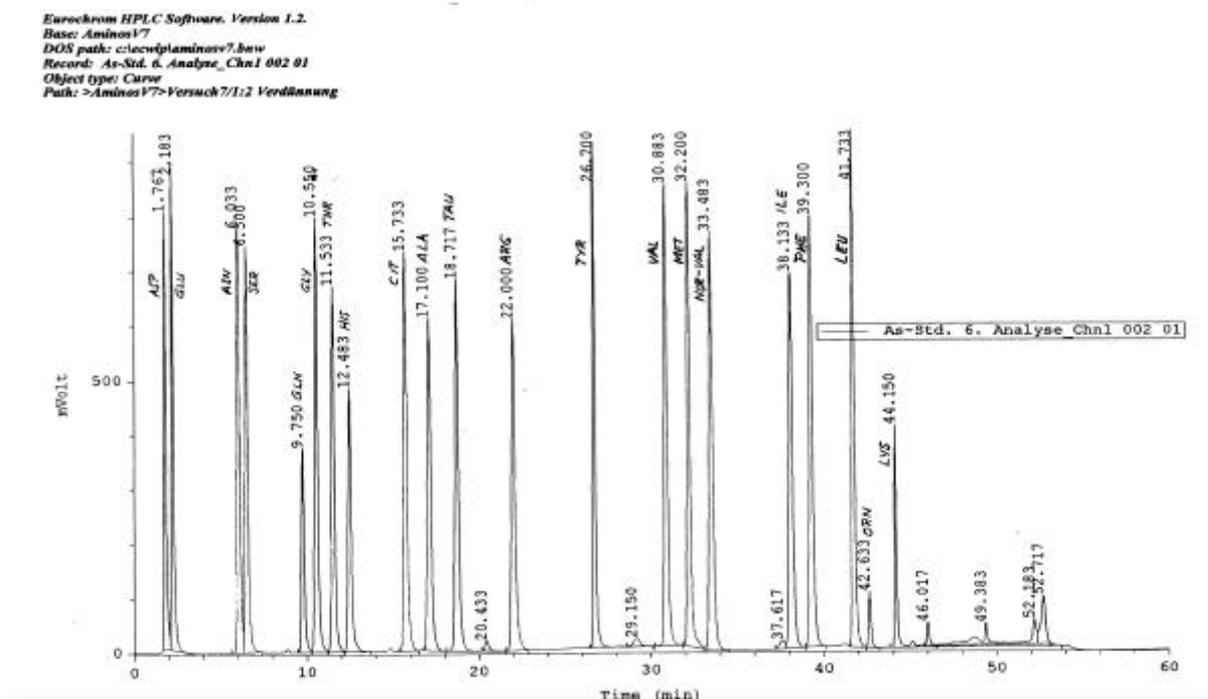


Abb. 10a: Chromatogramm eines erweiterten L-Aminosäurestandards der Firma Alltech Grom. Hinzugefügt wurden die Aminosäuren: Asparagin (ASN), Citrullin (CIT), Taurin (TAU), Ornithin (ORN) und der interne Standard Nor-Valin.

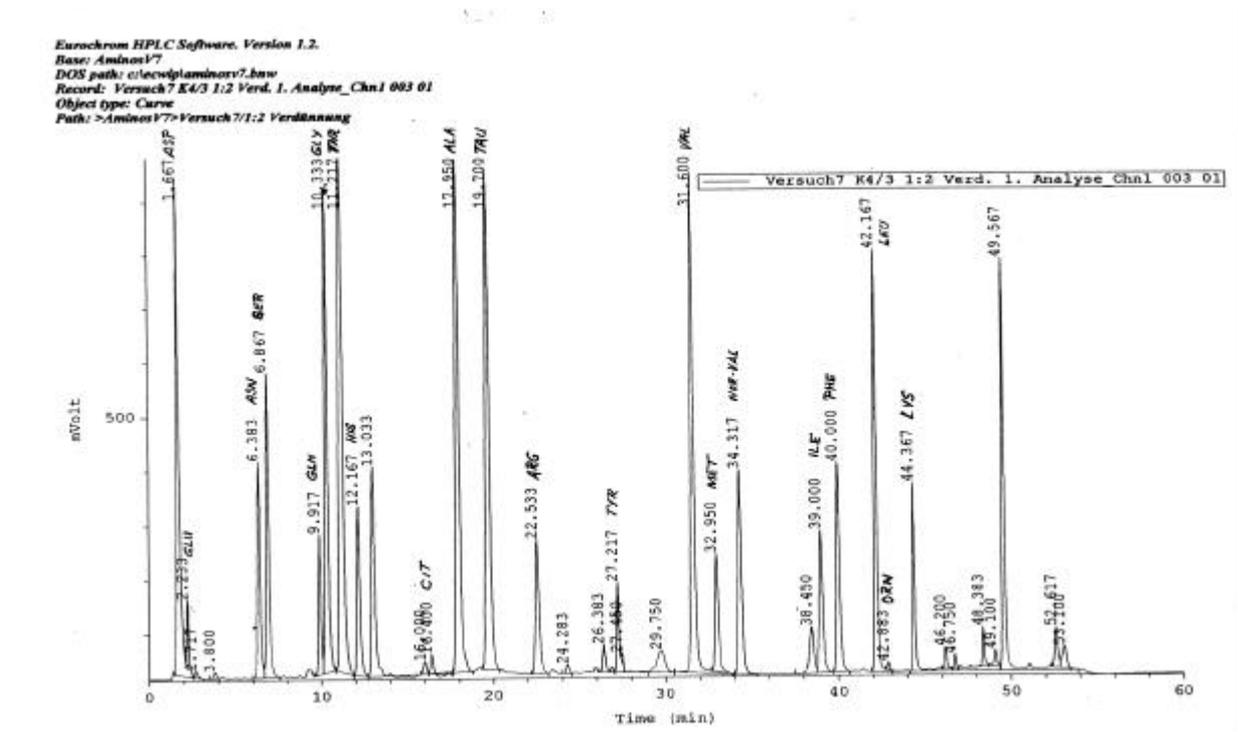


Abb. 10b: Chromatogramm der Aminosäuren aus dem Plasma eines unbehandelten Tieres (Kontrolltier 4) in Versuch 2.

Da jedes enteweißte Plasma zweimal analysiert wurde, steht die Konzentrationsangabe einer Aminosäure immer für den Mittelwert aus zwei Analysen. Die Differenzen zwischen den beiden Analysen waren gering; z.B. lagen sie im Versuch 3 bei der Analyse der Plasmen unbehandelter Tiere zwischen 0,4 % (Arginin) und 6,0 % (Glycin), bei der Analyse der Plasmen behandelter Tiere desselben Versuchs lagen sie zwischen 0,9 % (Valin) und 4,5 % (Glycin, Anlage 4).

Folgt man der Vorgabe der Firma Alltech Grom in ihrem Applikations-Service 004 (Empfindliche Bestimmung von Aminosäuren durch Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd, 12. 04. 1995), so liegt eine Reproduzierbarkeit für Plasma mit dieser Methode bei Verwendung eines „on Line“ derivatisierenden Probengebers zwischen 3,2 und 6,1 %.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der OPA-Aminosäureanalytik wurde der Variationskoeffizient V_K aus Mehrfachbestimmungen von Proben aus einem Plasma ermittelt (Tab. 1). Der V_K stellt den Quotienten Standardabweichung / Mittelwert multipliziert mit 100 (Mittelwert der Peakhöhen, Standardabweichung des Mittelwertes der Peakhöhen) dar. Aus einem Plasma wurden sechs Proben entnommen und einzeln enteweiß. Die Variationskoeffizienten der Peakhöhen lagen zwischen 0,5 (Asparaginsäure) und 11,3 für Leucin (Ornithin mit einem V_K von 16,9 wurde nicht berücksichtigt, da bei den Analysen der Blutseren zu wenig Messwerte vorlagen).

Tab. 1: Berechnung der Variationskoeffizienten der Aminosäuren aus jeweils sechs Analysen. Das kursiv gedruckte Norvalin ist keine Aminosäure und dient als interner Standard.

Aminosäure	Mittelwert der Peakhöhen \bar{X}	Standardabweichung SD	Variationskoeffizient V_k
Asparaginsäure (ASP)	960612	4701	0,5
Glutamin (GLN)	244653	18340	7,5
Glycin (GLY)	917698	37257	4,1
Threonin (THR)	175643	11533	6,6
Histidin (HIS)	104092	8880	8,5
Citrullin (CIT)	18288	1127	6,2
Alanin (ALA)	516981	34161	6,6
Taurin (TAU)	326564	21381	6,5
Arginin (ARG)	112885	6338	5,6
Tyrosin (TYR)	50017	5493	11,0
Valin (VAL)	482465	30052	6,2
Methionin (MET)	129710	9478	7,3
<i>Norvalin</i> (N-VAL)	187406	3791	2,0
Isoleucin (ILE)	127242	8974	7,1
Phenylalanin (PHE)	112744	6440	5,7
Leucin (LEU)	232854	26351	11,3
Lysin (LYS)	185770	20225	10,9

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Bearbeitung der Werte in dieser Arbeit erfolgte grundsätzlich mit verteilungsfreien Verfahren (nicht-parametrischen Tests), dem U -Test von Wilcoxon, Mann und Whitney oder dem Wilcoxon -Test für Paardifferenzen. Das Ergebnis dieser Tests wurde in einigen Fällen mit den Ergebnissen des t-Tests (nach Student) verglichen. Als statistisch signifikant wird eine Überschreitungswahrscheinlichkeit $P < 0,05$ angesehen (Weber, 1986).

Im Einzelfall wurde auf folgende Weise statistisch bearbeitet:

1. Körpergewicht: Zunahme bzw. Abnahme, d.h. die Mittelwerte der Veränderung von unbehandelten und behandelten Tieren wurden statistisch verglichen (Paardifferenzen-Vergleich).
2. Körperlänge: der Vergleich erfolgte in gleicher Weise wie beim Körpergewicht.
3. Korpulenzfaktor: Vergleich der Differenzen der Korpulenzfaktoren von Start und Ende des Versuchs wie beim Körpergewicht.
- 4./ 5. Leber - und Herzgewicht: da hier nur die Endwerte von unbehandelten und behandelten Tieren erhoben werden konnten, wurden bei diesen Bestimmungen die Absolutwerte statistisch evaluiert (Mittelwert zwischen Kontrollen und behandelten Tieren, U – Test).

6. Blutzellen: hier wurde die relative Anzahl der Blutzellen bestimmt. Ein Vergleich zwischen Kontrollen und behandelten Tieren erfolgte nur am Ende der Behandlung, also mittels U – Test, bezogen auf den Mittelwert-Vergleich.
7. Aminosäuren-Konzentrationen: bei Versuch 1 wurden nur die Mittel der Endwerte statistisch verglichen (U – Test). Bei Versuch 2 und 3 konnten sowohl die Mittel der Endwerte zwischen Kontrollen und behandelten Tieren (U – Test) als auch die Differenzen (zwischen Kontrollen und behandelten Tieren) der Differenzen zwischen Anfangs- und Endwert (im Mittel) der Kontrolle und behandelten Tiere statistisch verglichen werden (Wilcoxon-Paardifferenz).

Definitionen:

Differenzen der Mittelwerte bedeutet Vergleich der Wertegruppen (Anfangs- oder Endwerte zwischen Kontrolle und behandelten Tieren).

Differenzen der Mittelwert-Differenzen bedeutet Vergleich der Veränderungen zwischen Kontrolle und behandelten Tieren, jeweils durch Vergleich der Mittelwert-Differenzen vor und nach dem Versuch von Kontrolle und behandelten Tieren.

Der Begriff Mittelwert-Differenz bezieht sich also auf unterschiedliche Vergleiche. Unter Standardabweichung ist hier diejenige angegeben, die von der Grundgesamtheit ausgehend berechnet wird.

Sämtliche Tests wurden mit Prozeduren von SAS 8.1 durchgeführt.

In den Abbildungen sind die Werte mit einem Stern★ gekennzeichnet, die sich signifikant unterscheiden. In den Tabellen sind jeweils die Mittelwerte mit der Standardabweichung (SD) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Chloranilin auf das Körpergewicht

Die drei verschiedenen Schadstoffkonzentrationen – 1, 2 und 4 mg CA/l – konnten aufgrund des dazu nötigen technischen und apparativen Aufwandes nicht gleichzeitig geprüft werden.

3.1.1 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 1 mg/l auf das Körpergewicht (Versuch 1)

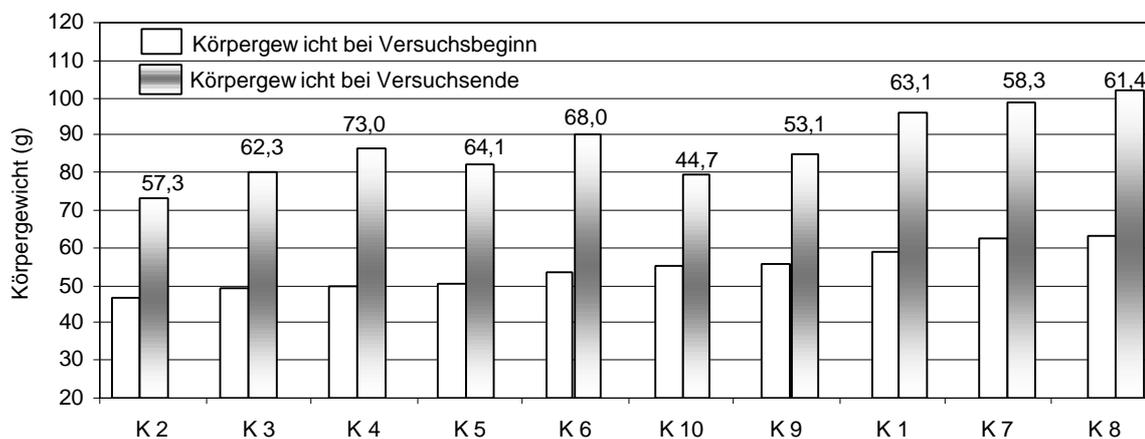
Die Exposition der Fische in 1 mg CA/l fand im Herbst (Oktober) statt. Die Tiere waren Anfang September von der Fischzuchtanstalt bezogen worden und hatten sich vier Wochen an die Karlsruher Wasserqualität anpassen können. Sie waren etwa 10 Monate alt. Während der Versuchszeit betrug die durchschnittliche Wassertemperatur 14,5°C, die Sauerstoffsättigung lag bei 80 mg/l (s. Anlage 3). Die der Schadstoffkonzentration ausgesetzten Fische veränderten sich äußerlich erkennbar nicht deutlich anders als die Kontrolltiere, auch die Futteraufnahme war gleich. Die Gewichte der unbehandelten Tiere nahmen nicht deutlich mehr zu (Tab. 2) als die der behandelten Tiere. Die Kontrolltiere nahmen im Mittel um 61 % - bezogen auf das Startgewicht – zu. Die Gewichte der Tiere streuten vor Versuchsbeginn zwischen 46,4 und 63,0 g, im Mittel lagen sie bei 54,5 g; die Streubreite betrug 16,6 g. Die Gewichte nach Versuchsende lagen im Mittel bei 87,3 g und wiesen eine Streubreite von 28,7 g auf.

Die für die Schadstoffexposition bestimmten Tiere waren zwischen 45 und 85 g schwer, die Streubreite betrug 40,0 g, der Mittelwert 57,9 g. Nach Versuchsende wiesen die behandelten Tiere einen Mittelwert des Körpergewichts von 85,7 g auf, die Streubreite lag bei 49,1 g und die Gewichtszunahme betrug 27,9 g, was einer Zunahme von 50 % entspricht (Tab. 2, Abb. 11a und 11b).

Die nach den Zahlenwerten etwas geringere Gewichtszunahme der behandelten Tiere ließ sich bei der statistischen Überprüfung mit dem nichtparametrischen Wilcoxon - Test (Paardifferenzen-Vergleich, $P < 0,05$) allerdings nicht absichern.

Tab. 2: Gewichte und Gewichtszunahme der Tiere während des Versuchs 1 (1 mg CA/l)

Versuch 1 1 mg CA/l	Oktober	Startgewicht (g)	Endgewicht (g)	Gewichtszunahme (g)	Gewichtszunahme (%)
Kontrolltiere	Mittelwert ± SD	54,5 ± 5,4	87,3 ± 8,8	32,9 ± 4,6	60,6 ± 7,5
	Minimum - Maximum	46,4 - 63,0	73,0 - 101,7	24,6 - 38,7	44,7 - 73,0
	Streubreite	16,6	28,7	14,1	28,3
Behandelte Tiere	Mittelwert ± SD	57,9 ± 12,3	85,7 ± 13,9	27,9 ± 7,4	50,2 ± 15,1
	Minimum - Maximum	45,0 - 85,0	63,6 - 112,7	15,9 - 40,7	23,0 - 64,6
	Streubreite	40,0	49,1	24,8	41,6

**Abb. 11a:** Anordnung der Gewichte unbehandelter Tiere (K = Kontrolltiere) nach steigendem Startgewicht. Die linke Säule gibt das absolute Körpergewicht (g) vor Versuchsbeginn, die rechte Säule das absolute Körpergewicht nach Versuchsende wieder. Die Zahl über der rechten Säule steht für die prozentuale Gewichtszunahme des Einzeltieres (Versuch 1, 1 mg CA/l).

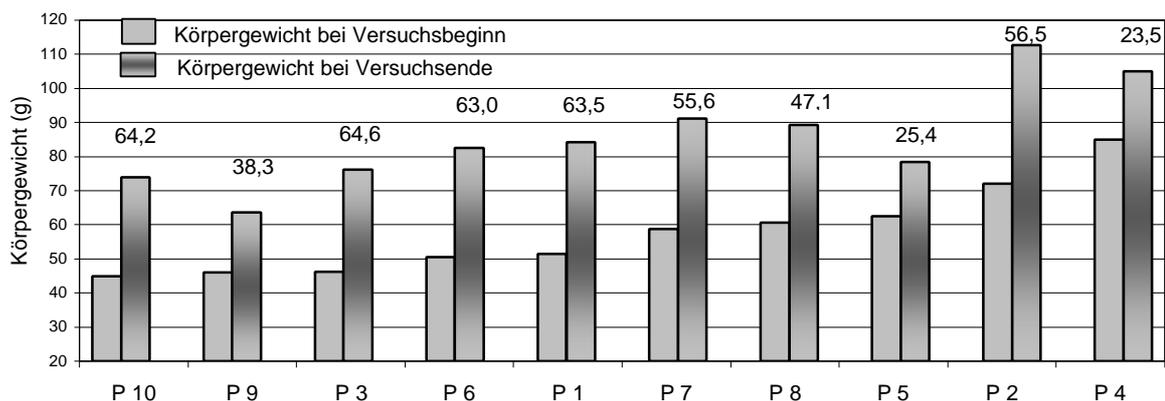


Abb. 11b: Anordnung der behandelten Tiere (P = Probestiere) nach steigendem Startgewicht (Versuch 1, Anordnung wie in Abb. 11a).

Aus Abbildung 11a ist zu erkennen, dass die Kontrolltiere K 3, K 4 und K 5 ein annähernd gleiches Ausgangsgewicht hatten wie die zur Exposition eingesetzten Tiere P 6 und P 1. Nach Versuchsende hatten diese Kontroll- und Probestiere annähernd gleiche Gewichtszunahmen: Kontrolltiere um 67%, behandelte Tiere um 63%. Die Kontrolltiere K 6, K 10 und K 9 mit etwa gleichem, aber höherem Startgewicht als die erstgenannte Kontrollgruppe hatten eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 55%; die behandelten Tiere P 7, P 8 und P 5, mit im Mittel leicht erhöhtem Startgewicht im Vergleich zu den Kontrolltieren, hatten nur eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 43%. Die Tiere mit den höheren Startgewichten (P 4, K 7 und K 8) nahmen im Mittel weniger zu als die mit geringeren Startgewichten.

3.1.2 Einfluss der Chloranilinkonzentration von 2 mg/l auf das Körpergewicht (Versuch 2)

Dieser Versuch wurde im Frühjahr (März) mit ca. 15 Monate alten Fischen durchgeführt, die Ende Januar aus der Fischzuchtanstalt bezogen worden waren und sich bis zum Versuchsbeginn an die hiesige Wasserqualität anpassen konnten. Während der Versuchszeit betrug die mittlere Wassertemperatur 11,2°C, die Sauerstoffkonzentrationen in den Einzelbecken lagen im Mittel bei 75,2 mg/l.

In der Nahrungsaufnahme konnten bei dieser Konzentration Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden. Alle unbehandelten Fische nahmen in kurzer Zeit ihre Nahrung auf; bei den Schadstoff exponierten Fischen fraßen drei Tiere zwischen dem 8. und 12. Tag etwa nur die Hälfte des Futters. Eines dieser drei Tiere nahm vom 12. bis zum 23. Tag wenig bis keine Nahrung auf und verendete am 23. Tag.

Die Kontrolltiere hatten vor Versuchsbeginn ein Gewicht zwischen 57,9 und 94,3 g; im Mittel wogen sie 71,9 g, die Streubreite betrug 36,4 g. Nach Versuchsende ergab sich eine Gewichts Differenz zwischen 73,3 und 109,2 g, d.h. die Streubreite blieb mit 35,9 g fast gleich. Der Mittelwert der absoluten Gewichtszunahme betrug 30,3 g entsprechend einer Zunahme von 42 % (Tab. 3, Abb. 12).

Die Körpergewichte der für die Schadstoffexposition bestimmten Tiere lagen zwischen 55,8 und 119,2 g, der Mittelwert bei 82,6 g, die Streubreite bei 63,4 g. Nach der Exposition hatten die Tiere ein Körpergewicht zwischen 78,6 g und 140,5 g, die Streubreite der Gewichte lag bei 61,9 g. Der Mittelwert der absoluten Gewichtszunahme war mit 29,9 g entsprechend 36 %, geringer als der der unbehandelten Fische (Tab. 3, Abb. 13). Eine unterschiedliche Gewichtsentwicklung konnte statistisch aber nicht bestätigt werden. Der Paardifferenzen-Vergleichstest nach Wilcoxon zeigte mit $P = 0,16$ einen Wert, der weit entfernt von dem für eine Signifikanz festgelegten Wert von $P < 0,05$ lag.

Wie im Versuch 1 lässt sich auch hier die Tendenz erkennen, dass Fische mit geringem Startgewicht mehr an Gewicht zunahmten als Fische mit höherem Startgewicht (kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren).

Tab. 3: Gewichte und Gewichtszunahme der Tiere von Versuch 2 (2 mg CA/l)

Versuch 2 2 mg CA/l	März	Startgewicht (g)	Endgewicht (g)	Gewichtszunahme (g)	Gewichtszunahme (%)
Kontrolltiere	Mittelwert \pm SD	71,9 \pm 11,7	102,2 \pm 14,5	30,3 \pm 7,9	42,1 \pm 12,0
	Minimum - Maximum	57,9 - 94,3	73,3 - 109,2	16,9 - 38,3	18,5 - 59,2
	Streubreite	36,4	35,9	21,5	40,6
Behandelte Tiere	Mittelwert \pm SD	82,6 \pm 19,0	112,5 \pm 17,0	29,9 \pm 12,0	36,2 \pm 19,5
	Minimum - Maximum	55,8 - 119,2	78,6 - 140,5	22,8 - 59,8	40,8 - 84,2
	Streubreite	63,4	61,9	38,5	66,3

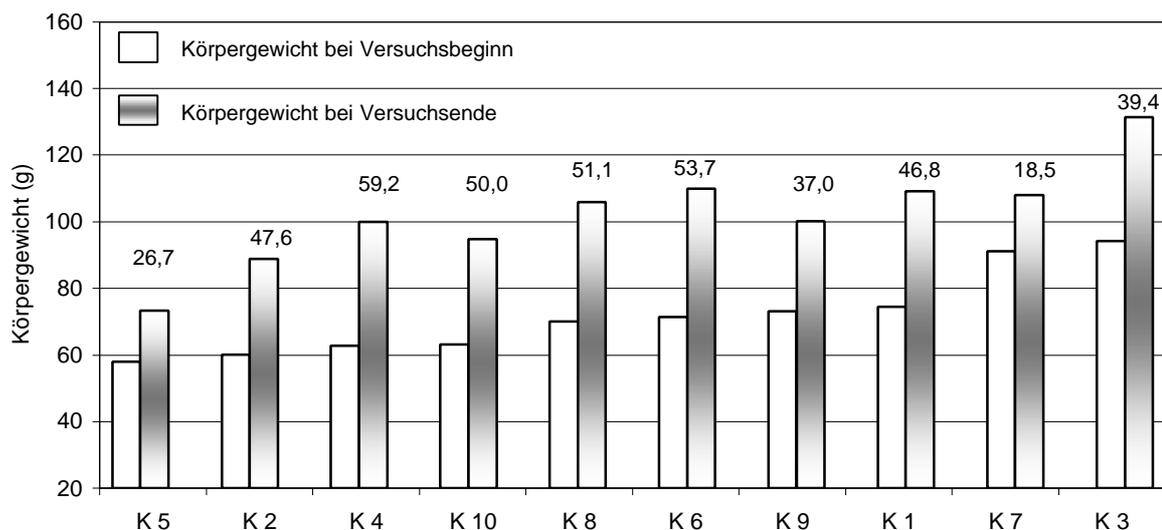


Abb. 12: Anordnung der unbehandelten Tiere nach steigendem Startgewicht (Versuch 2, 2 mg CA/l)

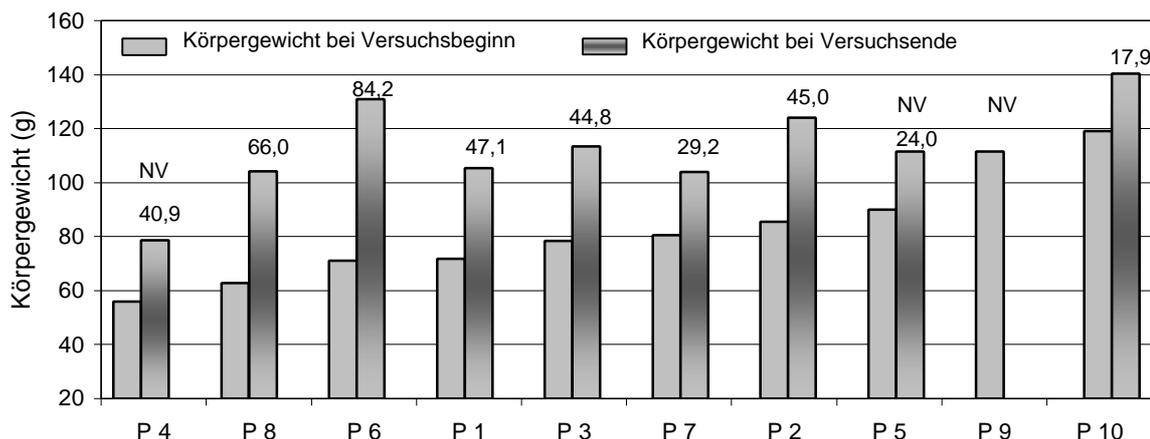


Abb. 13: Anordnung der behandelten Tiere nach steigendem Startgewicht (Versuch 2, 2 mg CA/l, Anordnung wie Abb. 10). Tier 9 starb am 23. Tag nach der Schadstoffexposition. NV steht für Nahrungsverweigerer.

Vier (K 5, K 2, K 4 und K 10) der zehn Kontrolltiere (Abb. 12) hatten im Mittel ein Ausgangsgewicht von 60,1 g; deren prozentuale Gewichtszunahme lag im Durchschnitt bei 46 %, sie streute zwischen 27 % und 59 %. Das zeigt, dass Tiere mit etwa gleichem Startgewicht unterschiedliche Gewichtszunahmen aufweisen können. Individuelle Nahrungsaufnahme bzw. –verwertung können hier als Ursache der unterschiedlichen Gewichtszunahmen genannt werden. Bei den behandelten Tieren (Abb. 13) P 6 und P 1 lag auch ein annähernd gleiches Startgewicht vor, deren Gewichtszunahme differierte jedoch im Mittel um 37 %. Die geringere Gewichtszunahme der behandelten Fische könnte sowohl als Wirkung des Schadstoffs wie auch als individuelle Variante in der Nahrungsaufnahme gedeutet werden.

Es war nun interessant zu erfahren, welche Auswirkungen die verminderte Futteraufnahme auf die verschiedenen Merkmale hatte. Da in dieser Konzentration nur zwei Nahrungsverweigerer das Versuchsende erlebten, wurde keine statistische Überprüfung der Daten vorgenommen. Die Begriffe Normalfresser und Nahrungsverweigerer beziehen sich in der Folge immer auf Tiere, die dem Schadstoff ausgesetzt waren. Die Werte der Tabelle 4 stellen Mittelwerte dar von sieben Normalfressern bzw. von zwei Nahrungsverweigerern. Als Kontrolle dienen die zehn unbehandelten Tiere.

Tab. 4: Veränderungen des Startgewichts bei Kontrolle, Normalfressern und Nahrungsverweigerern (Versuch 2, 2 mg CA/l)

	Startgewicht (g)	Endgewicht (g)	Gewichtszunahme (%)
Normalfresser	75,1	113,7	51,6
Nahrungsverweigerer	88,3	110,2	25,0
Kontrolltiere	71,9	102,2	42,1

Der Mittelwert der prozentualen Gewichtszunahme der Nahrungsverweigerer lag um mehr als 50% unter dem der Normalfresser; der Mittelwert der prozentualen Gewichtszunahme der Normalfresser war aber um annähernd 10% höher als der der Kontrolltiere. Dieser Effekt könnte als stoffwechselsteigernde Wirkung des Chloranilins gedeutet werden. Zusammen mit den Gewichtszunahmen der Nah-

rungsverweigerer war die Differenz zu den Kontrolltieren vermutlich infolge Kompensation jedoch nicht signifikant (Abb. 16). Hervorzuheben ist die Tatsache, dass das Startgewicht der Normalfresser im Vergleich zu den Kontrolltieren schon geringfügig höher war und sie eine fast 10 % höhere Gewichtszunahme aufwiesen. Diese Zunahme kann als Stoffwechsel steigernde Wirkung des Schadstoffs gedeutet werden.

3.1.3 Einfluss der Chloranilinkonzentration von 4 mg/l auf das Körpergewicht (Versuch 3)

Dieser Konzentration waren Fische ein Jahr später als im Versuch 1, wieder im Spätherbst (November), ausgesetzt; sie waren etwa 11 Monate alt und Anfang Oktober vom Züchter bezogen worden. Die mittlere Wassertemperatur lag bei 13,7°C, die Sauerstoffkonzentration im Mittel bei 77,5 mg/l.

Bei den Kontrolltieren waren keine Unregelmäßigkeiten bei der Nahrungsaufnahme festzustellen; die Futterpellets wurden innerhalb kurzer Zeit vollständig aufgenommen. Bei den behandelten Tieren nahm ein Fisch schon ab dem 7. Tag der Schadstoffexposition weniger Nahrung auf; die Zahl der Nahrungsverweigerer erhöhte sich bis zum 17. Tag auf fünf (Nr. 4, 5, 7, 8 und 10), am vorletzten Tag verweigerten acht (Nr. 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 und 10) von zehn Fischen die Nahrung. Nur zwei Fische hatten bis zum nächsten Tag fast alle Pellets gefressen.

Als Nahrungsverweigerer (NV) werden die Tiere bezeichnet, bei denen die Mehrzahl der gegebenen Pellets noch am nächsten Tag in mehr oder weniger aufgeweichtem Zustand auf dem Beckenboden lag. Eine absolute Nahrungsverweigerung konnte nicht nachgewiesen werden. Trotz verminderter Nahrungsaufnahme verstarb keines der Tiere.

Die unbehandelten Tiere waren vor Versuchsbeginn zwischen 42,6 und 87,8 g schwer, im Mittel 68,1 g; die Streubreite betrug 45,2 g. Nach Versuchsende konnte eine Gewichtszunahme zwischen 15,7 g und 35,7 g festgestellt werden; der Mittelwert der absoluten Gewichtszunahme betrug 25,1 g bzw. 37 %. Das Gewicht der zu behandelnden Tiere lag vor Versuchsbeginn zwischen 43,5 und 102,4 g, der Mittelwert mit 68,9 g knapp über dem der Kontrolltiere (68,1 g), die Streubreite betrug 58,9 g. Die Gewichte nach Versuchsende waren im Mittel bei 84,7 g mit einer Streubreite von 74,9 g. Der Wert für die absolute bzw. prozentuale Gewichtszunahme mit 15,8 g bzw. 23 % unterscheidet sich deutlich von dem der unbehandelten Fische (Tab. 5a, Abb. 14 und 15).

Tab. 5a: Gewichte und Gewichtszunahme der Tiere von Versuch 3 (4 mg CA/I)

Versuch 3 4 mg CA/I	November	Startgewicht (g)	Endgewicht (g)	Gewichtszunahme (g)	Gewichtszunahme (%)
Kontrolltiere	Mittelwert ± SD	68,1 ± 13,1	93,2 ± 17,9	25,1 ± 6,2	36,9 ± 6,3
	Minimum - Maximum	42,6 - 87,8	59,1 - 116,1	15,7 - 35,7	21,2 - 45,8
	Streubreite	45,2	56,9	20,1	24,6
Behandelte Tiere	Mittelwert ± SD	68,9 ± 17,7	84,7 ± 21,4	15,8 ± 7,2	22,9 ± 11,1
	Minimum - Maximum	43,5 - 102,4	48,7 - 123,5	3,03 - 25,7	6,6 - 38,5
	Streubreite	58,9	74,9	22,7	31,8

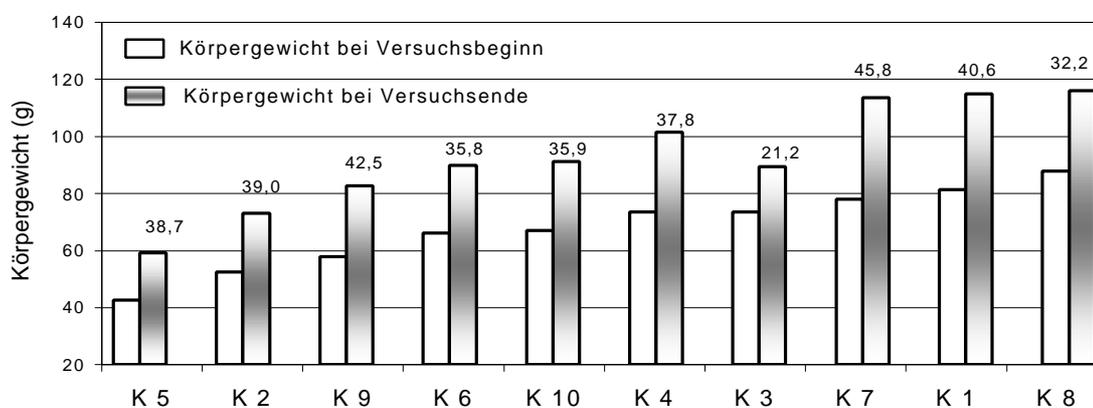


Abb. 14: Anordnung der unbehandelten Tiere nach steigendem Startgewicht (Versuch 3, 4 mg CA/I, Anordnung wie Abb. 10)

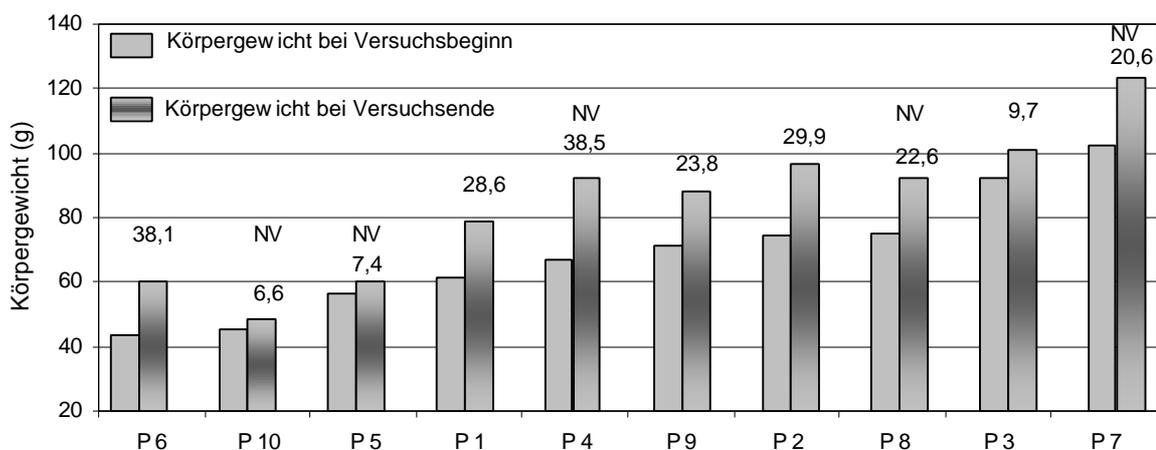


Abb. 15: Anordnung der behandelten Tiere nach steigendem Startgewicht (Versuch 3, 4 mg CA/I, Anordnung wie Abb. 10, NV steht für Nahrungsverweigerer)

Die verringerte Nahrungsaufnahme bei den Verweigerern – es sind die Tiere P4, P5, P7, P8 und P10, diese waren bis zum 17. Expositionstag sicher zu erkennen - hatte trotz gleichen Mittelwertes des Startgewichts eine um 10 % geringere Gewichtszunahme zur Folge. In der Zusammenfassung (Tab. 5b) sind jeweils die Mittelwerte von fünf Fischen angegeben.

Tab. 5b: Veränderungen des Startgewichts bei Normalfressern, Nahrungsverweigerern und Kontrolltieren (Versuch 3, 4 mg CA/l)

	Startgewicht (g)	Endgewicht (g)	Gewichtszunahme (%)
Normalfresser	68,6	85,0	38
Nahrungsverweigerer	69,3	83,5	28
Kontrolltiere	68,1	93,2	40

Der Mittelwert der Körpergewichte exponierter Tiere war bei Versuchsende signifikant geringer als der der unbehandelt gebliebenen Fische. Die fünf Nahrungsverweigerer trugen sicher zu der verminderten Gewichtszunahme bei. Im Vergleich zur Kontrolle bewirkte die um 12% geringere Gewichtszunahme der Nahrungsverweigerer die signifikante Differenz.

3.1.4 Abhängigkeit der Gewichtszunahme vom Startgewicht bei den Kontrolltieren und behandelten Tieren in den drei Konzentrationen.

Unabhängig von der Wirkung des Chloranilins auf die Gewichtsentwicklung der Fische war es interessant, als „Nebeneffekt“ zu untersuchen, in welchem Maße die Gewichtszunahme vom Startgewicht der Tiere abhing. In den Abbildungen 16 a-c wird die Abhängigkeit der Gewichtszunahme vom Startgewicht bei unbehandelten und behandelten Tiergruppen in den verschiedenen Konzentrationen miteinander verglichen. In den Diagrammen wurde bei den exponierten Tieren nicht zwischen Normalfressern und Nahrungsverweigerern unterschieden.

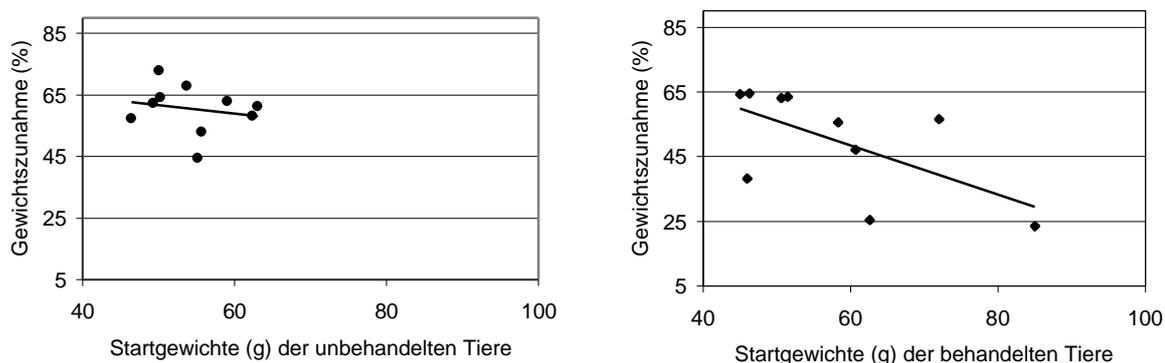


Abb. 16a: Abhängigkeit der Gewichtszunahmen vom Startgewicht bei unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 1, 1 mg CA/l)

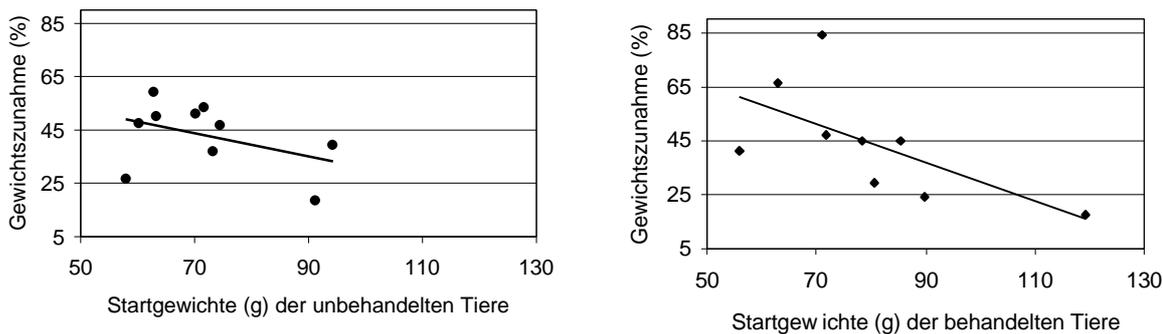


Abb. 16b: Abhängigkeit der Gewichtszunahmen vom Startgewicht bei unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 2, 2 mg CA/l)

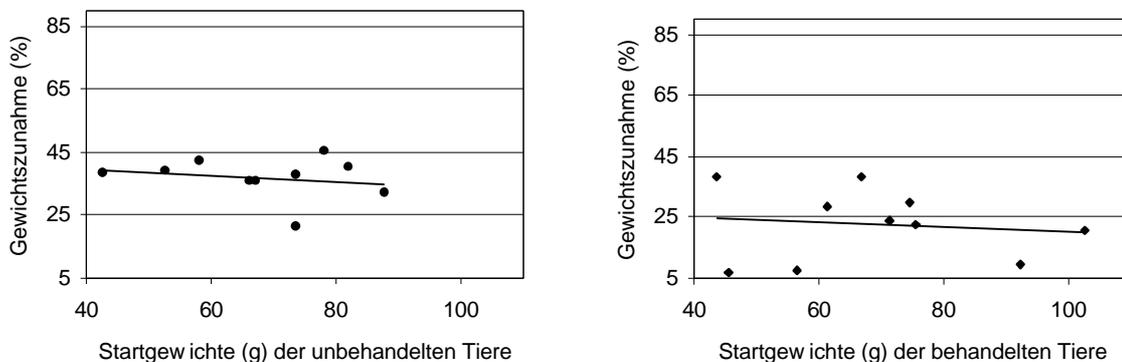


Abb. 16c: Abhängigkeit der Gewichtszunahmen vom Startgewicht bei unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 3, 4 mg CA/l)

Die Gewichtszunahme war bei unbehandelten Tieren nahezu unabhängig vom Startgewicht, während diese bei behandelten Tieren stärker abhängig war. Aus den Diagrammen der Versuche 1 und 2 ist bei den behandelten Tieren zwar eine solche Tendenz erkennbar, doch darf nicht übersehen werden, dass in diesen Gruppen Tiere sind, deren Startgewichte größer waren als bei den unbehandelten Tieren, wodurch die Gerade steiler verläuft. In den Versuchen 2 und 3 traten auch drei bzw. fünf Nahrungsverweigerer auf, die den Verlauf der Geraden beeinflussten.

Für Versuch 3 (4 mg CA/l) trifft diese Aussage nicht zu: Fische mit kleinem oder großem Startgewicht nahmen nicht so stark an Gewicht zu, da bei dieser Konzentration (Abb. 17) ein signifikanter Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen Kontrolle (37 %) und behandelten Tieren (23 %) auftritt.

Innerhalb der Kontrolltiere und der zu behandelnden Tiere ließen sich jeweils drei bis vier Tiere mit annähernd gleichem Startgewicht ($\pm 10\%$) zusammenfassen. In der Tabelle 6 sind die Mittelwerte dieser Kleingruppen in Bezug auf ihre Gewichtsentwicklung angegeben. Die Startgewichte bei Versuch 1 (1 mg CA/l) ermöglichten die Bildung zweier Gruppen: eine Gruppe mit relativ leichtem und eine mit höherem Startgewicht. Bei Versuch 2 und 3 konnte jeweils nur eine Gruppe gebildet werden.

Die zuvor erwähnte Aussage, Tiere mit kleinem Startgewicht nähmen stärker zu als solche mit höherem, findet ihre Bestätigung beim Vergleich der beiden Kontrollgruppen in Versuch 1. Einer Zunahme von 67 % bei der leichten Startgruppe steht eine von 58 % bei der schweren Startgruppe der Kontrolle gegenüber. Die leichte Gruppe exponierter Tiere nahm um 57 %, die schwere nur um 43 % zu.

Tab. 6: Vergleich der Gewichtsentwicklung zwischen Kontrolle und behandelten Tieren bei Gruppen gleichen Startgewichts

Versuch 1 (1mg CAI) Oktober	Startgewicht (g)	Endgewicht (g)	Gewichtszunahme (g)	Gewichtszunahme (%)
Kontrolltiere	51	85	34	67
behandelte Tiere	49	77	28	57
Kontrolltiere	60	95	35	58
behandelte Tiere	61	86	26	43
Versuch 2 (2 mg CAI) März				
Kontrolltiere	72	106	34	47
behandelte Tiere	74	117	43	58
Versuch 3 (4 mg CAI) November				
Kontrolltiere	75	102	26	35
behandelte Tiere	74	92	18	24

Eine Bestätigung des signifikant verschiedenen Wachstums von Kontroll- und Probestieren in der 4 mg CAI – Konzentration erhält man auch durch die große Differenz bei der Berechnung der Wachstumsrate (r) nach der OECD-Richtlinie.

Die Wachstumsrate r wurde auch nach dieser Richtlinie (Bestimmung der Ökotoxizität) C.14 berechnet (V zur RL 67/548/EWG, Stand RL 2001):

$$r = \frac{\log e * w2 - \log e * w1}{t2 - t1} * 100$$

Die Berechnung erfolgt als Quotient aus der Differenz der Logarithmen Endgewicht minus Startgewicht durch die Versuchsdauer, multipliziert mit 100. Tabelle 7a gibt diese Wachstumsraten wieder. In Tab. 7b werden die Wachstumsraten der Kontrolle mit denen der exponierten Normalfresser und Nahrungsverweigerer verglichen.

Tab. 7a: Vergleich der Mittelwerte der Wachstumsraten laut OECD-Richtlinie 67/548 von 2001

	Wachstumsrate Kontrolltiere	Wachstumsrate behandelte Tiere	Differenz der Wachstumsraten
Versuch 1 (1 mg CA/l) Oktober	2,15	1,82	0,33
Versuch 2 (2 mg CA/l) März	1,61	1,63	0,02
Versuch 3 (4 mg CA/l) November	1,42	0,91	0,51

Die Differenz der Wachstumsrate war beim Versuch mit der höchsten Konzentration am größten und – wider Erwarten – am kleinsten bei Versuch 2 mit 2 mg CA/l. Gründe für dieses Ergebnis sind die verschiedene Jahreszeit sowie der unterschiedliche Entwicklungsstand der Tiere, in denen die Versuche stattfanden.

Tab. 7b: Vergleich der Mittelwerte der Wachstumsraten von Kontrolle mit exponierten Normalfressern und Nahrungsverweigerern

	Wachstumsrate Kontrolltiere	Wachstumsrate Normalfresser	Wachstumsrate Nahrungsverweigerer
Versuch 2	1,61	1,89	1,27
Versuch 3	1,42	1,04	0,77

Wie zu erwarten war, wiesen die Nahrungsverweigerer die kleinste Wachstumsrate auf. Bei Versuch 2 muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Werte in Tab. 7b nur Mittelwerte von zwei Tieren vertreten, da der dritte Fisch vorzeitig verstarb.

Abbildung 17 zeigt die absoluten Gewichtszunahmen unbehandelter und behandelter Tiere in den verschiedenen CA-Konzentrationen. Bei den behandelten Tieren der Versuche 1 (1 mg CA/l) und 3 (4 mg CA/l), im Oktober bzw. November durchgeführt, lagen eindeutig geringere Gewichtszunahmen vor als bei den Kontrolltieren; signifikant geringer verliefen die Gewichtszunahmen allerdings erst in einer Konzentration von 4 mg CA/l.

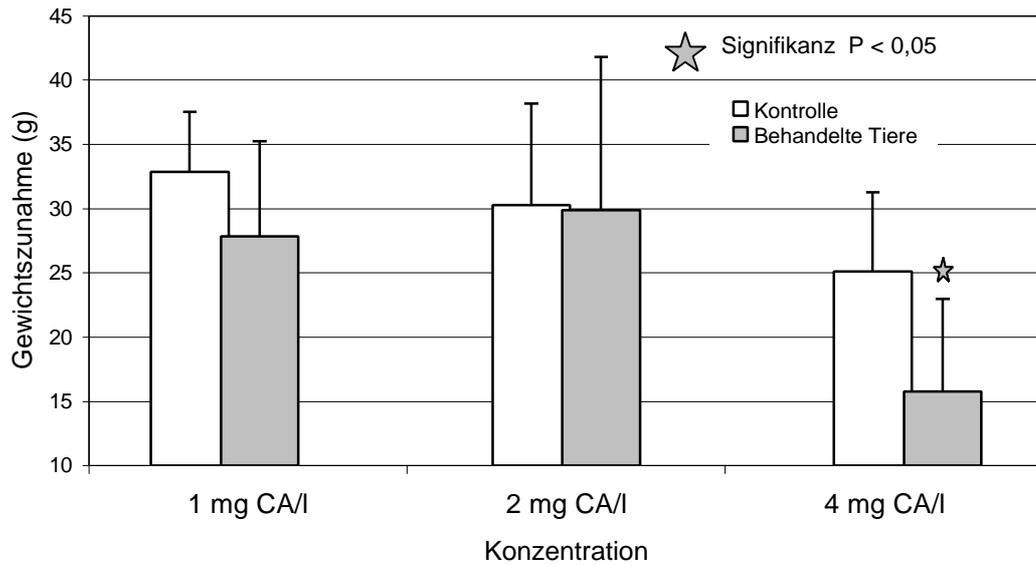


Abb. 17: Vergleich der Mittelwerte der Gewichtszunahmen zwischen behandelten und unbehandelten Tieren in den verschiedenen Konzentrationen

3.2 Einfluss von Chloranilin auf die Körperlänge

Gemessen wurde die Körperlänge von der Kopfspitze bis zum längeren Ende der Schwanzflosse.

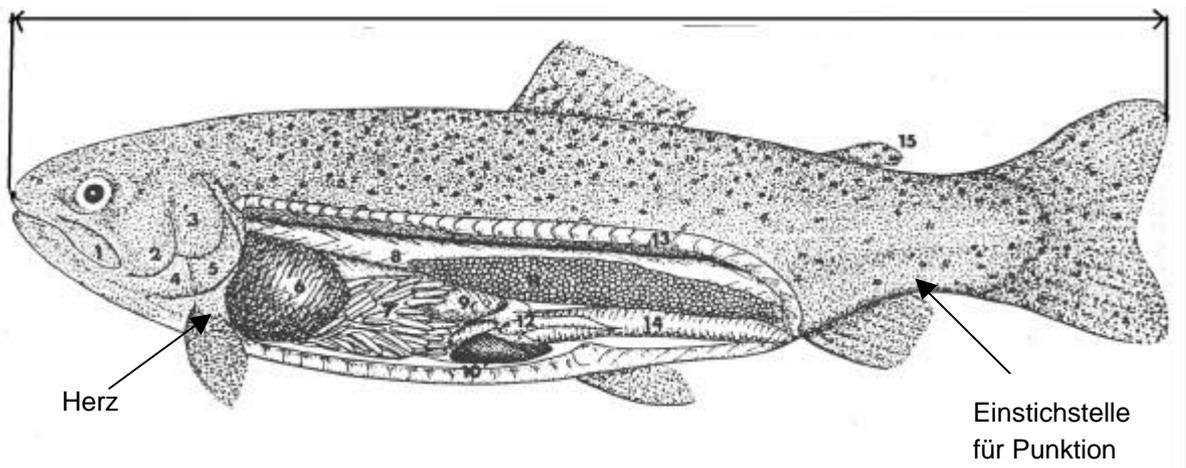


Abb. 18: Messen der Körperlänge (Abb. nach Meyer)

1 Maxillare, 2 Praeoperculum, 3 Operculum, 4 Interoperculum, 5 Suboperculum, 6 Leber, 7 Pylorusanhänge, 8 Schwimmblase, 9 Magen, 10 Milz, 11 Ovar, 12 Fettgewebe, 13 Niere, 14 Darm, 15 Fettflosse

3.2.1 Einfluss der Chloranilinkonzentration von 1 mg/l (Versuch 1 – im Herbst)

Vor Versuchsbeginn unterschieden sich die Mittelwerte von Kontrolle und zu behandelnden Tieren um 0,15 cm, nach Versuchsende war die Differenz 1,55 cm. In Prozenten ausgedrückt nahmen die unbehandelten Tiere um 21 %, die dem Schadstoff ausgesetzten nur um 18 % an Körperlänge zu. Im Paardifferenztest nach Wilcoxon ergab sich (für $P < / = 0,05$) ein signifikanter Unterschied (Tab. 8a, Abb. 19).

3.2.2 Einfluss der Chloranilinkonzentration von 2 mg/l (Versuch 2 – im Frühjahr)

Der Mittelwert für die Körperlänge lag bei den Kontrolltieren bei 18,82 cm, bei den Tieren, die dem Chloranilin ausgesetzt werden sollten, bei 19,26 cm; d.h. zu Versuchsbeginn unterschieden sich die Mittelwerte um 0,44 cm. Bis zum Versuchsende nahm die Differenz der Mittelwerte zwischen Kontrolle und behandelten Tieren geringfügig um 0,02 cm, entsprechen 1,4 %, zu (Tab. 8a, Abb. 19); diese Differenz erwies sich als nicht signifikant.

3.2.3 Einfluss der Chloranilinkonzentration von 4 mg/l (Versuch 3 – im Spätherbst)

Hier waren die Mittelwerte für Kontrolle und der für die Schadstoffexposition vorgesehenen Tiere zu Versuchsbeginn fast gleich; sie unterschieden sich lediglich um 0,01 cm. Zu Versuchsende zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und behandelten Tieren: die exponierten Fische wiesen eine Längenzunahme von 10 %, die unbehandelten eine von 13 % auf (Tab. 8a, Abb. 19).

Tab. 8a: Vergleich der Mittelwerte der Längenzunahme von unbehandelten und behandelten Tieren in den drei CA - Konzentrationen

Versuch 1 1 mg CA/l	Herbst Oktober	Länge (Start) (cm)	Längenzunahme (cm)	Längenzunahme (%)
Kontrolltiere	Mittelwert ± SD	16,1 ± 0,6	3,4 ± 0,4	21,0 ± 2,7
behandelte Tiere	Mittelwert ± SD	16,2 ± 0,8	2,8 ± 0,4	17,4 ± 3,2
Versuch 2 2 mg CA/l	Frühjahr März			
Kontrolltiere	Mittelwert ± SD	18,8 ± 1,0	1,7 ± 0,6	9,0 ± 3,4
behandelte Tiere	Mittelwert ± SD	19,3 ± 1,4	1,7 ± 1,0	8,9 ± 5,4
Versuch 3 4 mg CA/l	Spätherbst November			
Kontrolltiere	Mittelwert ± SD	17,4 ± 1,0	2,3 ± 0,5	13,3 ± 2,4
behandelte Tiere	Mittelwert ± SD	17,5 ± 1,4	1,7 ± 0,5	9,8 ± 2,6

Vergleicht man die prozentualen Längenzunahmen von Normalfressern und Nahrungsverweigerern in beiden Konzentrationen (Tab. 8b), so blieben die Nahrungsverweigerer um 2 % in der 4 mg CA/l-Konzentration und um 1 % in der 2 mg CA/l-Konzentration unter der Körperlänge der Normalfresser. In beiden Konzentrationen war das Längenwachstum der Nahrungsverweigerer geringer als das der Normalfresser.

Tab. 8b: Vergleich der Mittelwerte der Längenzunahme von Kontrolltieren mit Normalfressern und Nahrungsverweigerern (Versuch 2 und 3)

Körperlängenzunahme (%)	Kontrolltiere (%)	Normalfresser (%)	Nahrungsverweigerer (%)
Versuch 2 (2 mg CA/l)	9	11,6	10,5
Versuch 3 (4 mg CA/l)	13	10,7	9,0

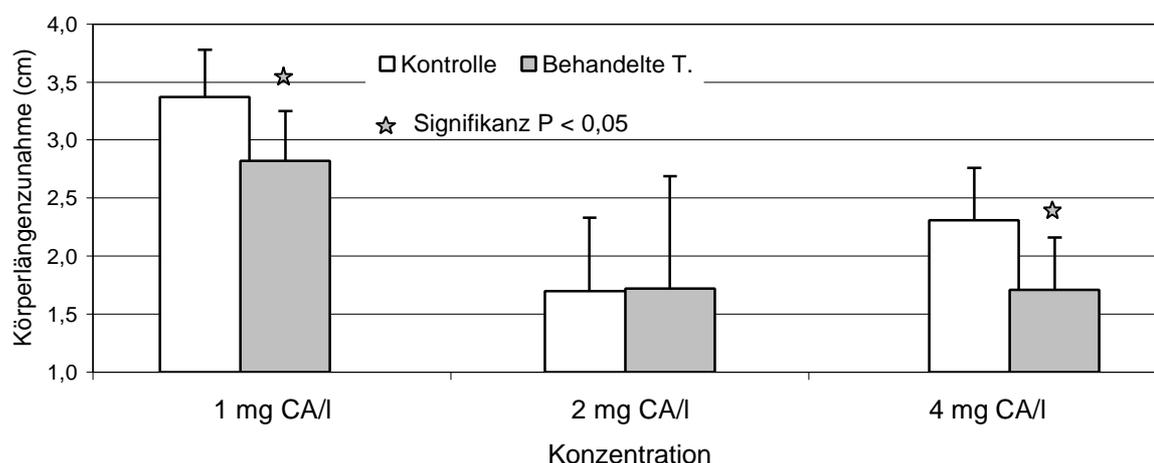


Abb. 19: Vergleich der Mittelwerte der Körperlängenzunahme in den drei Konzentrationen. Der Parameter Körperlänge ist in den Konzentrationen von 1 mg und 4 mg CA/l signifikant unterschieden zwischen den Kontroll- und behandelten Tieren.

Die geringere Längenzunahme im März (2 mg CA/l) wurde durch Chloranilin nicht beeinflusst, während im Herbst Längenwachstum und Gewichtszunahme durch den Schadstoff gehemmt wurden.

3.3 Einfluss von Chloranilin auf den Korpulenzfaktor

In die Berechnung des Korpulenzfaktors (K) gehen die beiden Parameter Gewicht und Länge ein. Nach Steffens (1985) ist der Korpulenzfaktor umso höher, je größer die auf die Längeneinheit entfallende Masse ist. Er ist definiert als der Quotient aus der Masse (p) des Fisches mal 100 durch die Gesamtlänge L in (cm) hoch drei:

$$K = \frac{100 \times p}{L^3}$$

3.3.1 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 1 mg/l auf den Korpulenzfaktor (Versuch 1)

Die Mittelwerte der Korpulenzfaktoren unterschieden sich vor Versuchsbeginn bei unbehandelten und behandelten Tieren um 0,04; nach Versuchsende war der Mittelwert der behandelten Tiere um 0,05 höher als der der unbehandelten Tiere. In beiden Gruppen war nach Versuchsende der Korpulenzfaktor geringer als zu Versuchsbeginn (Tab. 9a, Abb. 20a und 20b).

Tab. 9a: Vergleich der Mittelwerte der Korpulenzfaktoren vor und nach dem Versuch und deren Differenz in den verschiedenen 4-CA-Konzentrationen (Versuch 1, 1 mg CA/l)

Versuch 1 1 mg CA/l	Herbst Oktober	Korpulenzfaktor K_A vor Versuchsbeginn	Korpulenzfaktor K_E nach Versuchsende	Differenz der Mittelwerte K_A – K_E
Kontrolle	Mittelwerte ± SD	1,32 ± 0,09	1,19 ± 0,05	0,13 ± 0,04
behandelte Tiere	Mittelwerte ± SD	1,36 ± 0,23	1,24 ± 0,09	0,12 ± 0,09
Versuch 2 2 mg CA/l	Frühjahr März			
Kontrolle	Mittelwerte ± SD	1,07 ± 0,07	1,18 ± 0,07	- 0,11 ± 0,00
behandelte Tiere	Mittelwerte ± SD	1,14 ± 0,08	1,21 ± 0,09	- 0,07 ± 0,01
Versuch 3 4 mg CA/l	Spätherbst November			
Kontrolle	Mittelwerte ± SD	1,27 ± 0,10	1,19 ± 0,07	0,08 ± 0,02
behandelte Tiere	Mittelwerte ± SD	1,27 ± 0,12	1,17 ± 0,09	0,10 ± 0,03

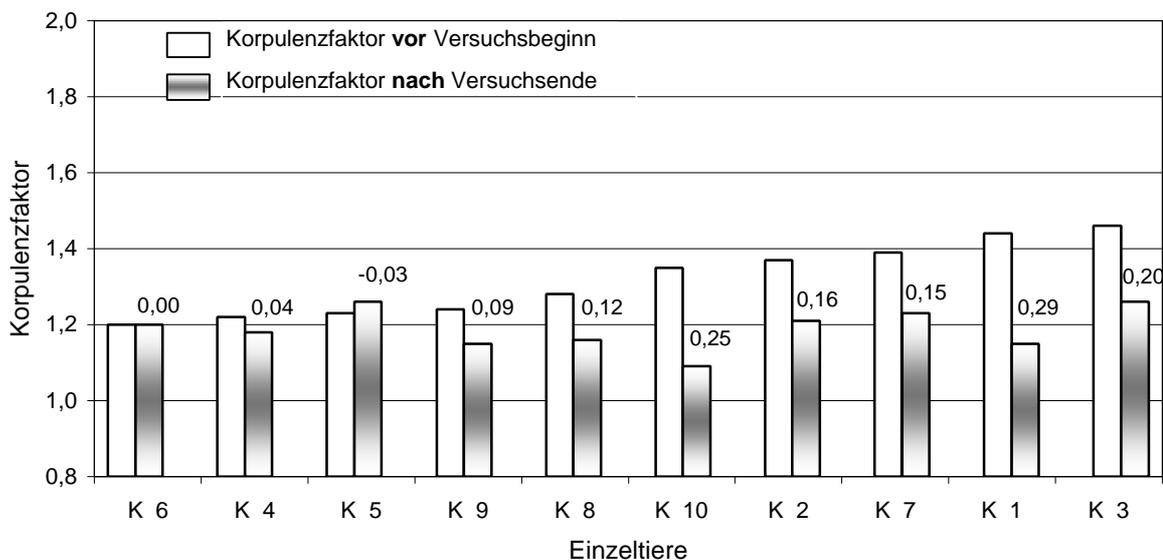


Abb. 20a: Werte der Korpulenzfaktoren der Kontrolltiere vor (weiße Säulen) und nach vier Wochen. Die Zahlen über den Säulen geben die Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Anfang und Ende des Versuchs wieder. Die Anordnung der Tiere erfolgt nach steigendem Wert des Korpulenzfaktors vor Versuchsbeginn (Versuch 1). Negativer Wert bedeutet, der Korpulenzfaktor war am Versuchsende größer als zu Versuchsbeginn.

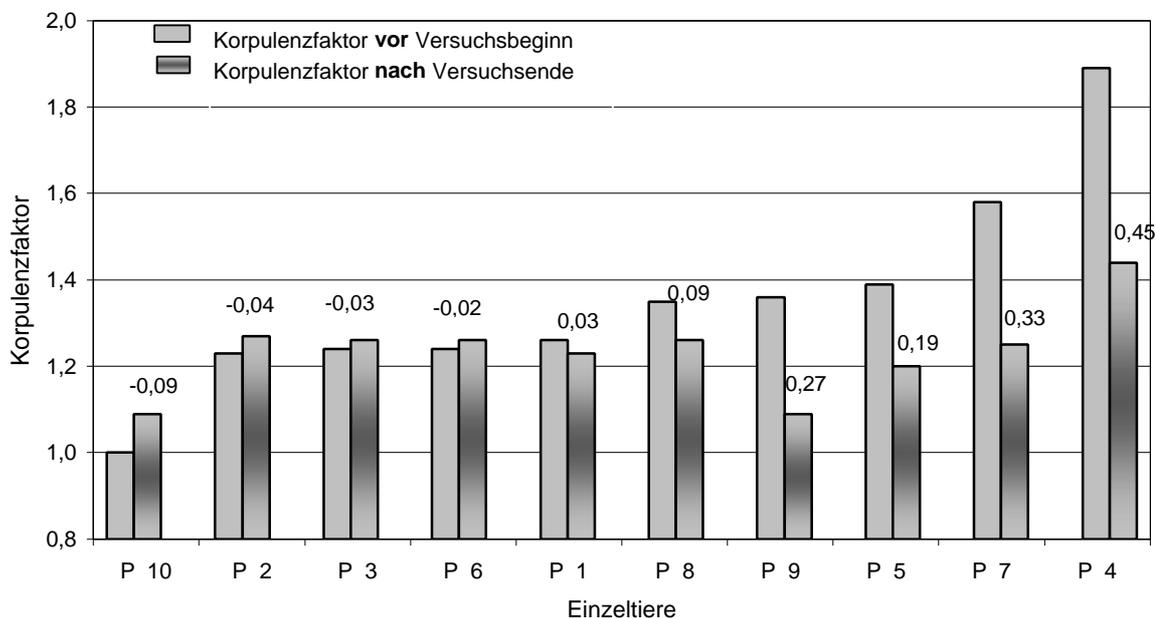


Abb. 20b: Werte der Korpulenzfaktoren der behandelten Tiere vor (gleichmäßig graue Säulen) und nach vier Wochen Schadstoffexposition (Versuch 1, Text wie in Abb. 20a)

Die Differenzen der Mittelwerte der Korpulenzfaktoren – Korpulenzfaktor vor Versuchsbeginn minus Korpulenzfaktor am Versuchsende – werden in der Abb. 21 wiedergegeben. Von den unbehandelten

Tieren hatte eines am Versuchsende einen größeren Korpulenzfaktor, bei den behandelten Tieren waren es vier (Abb. 20a, 20b und 21).

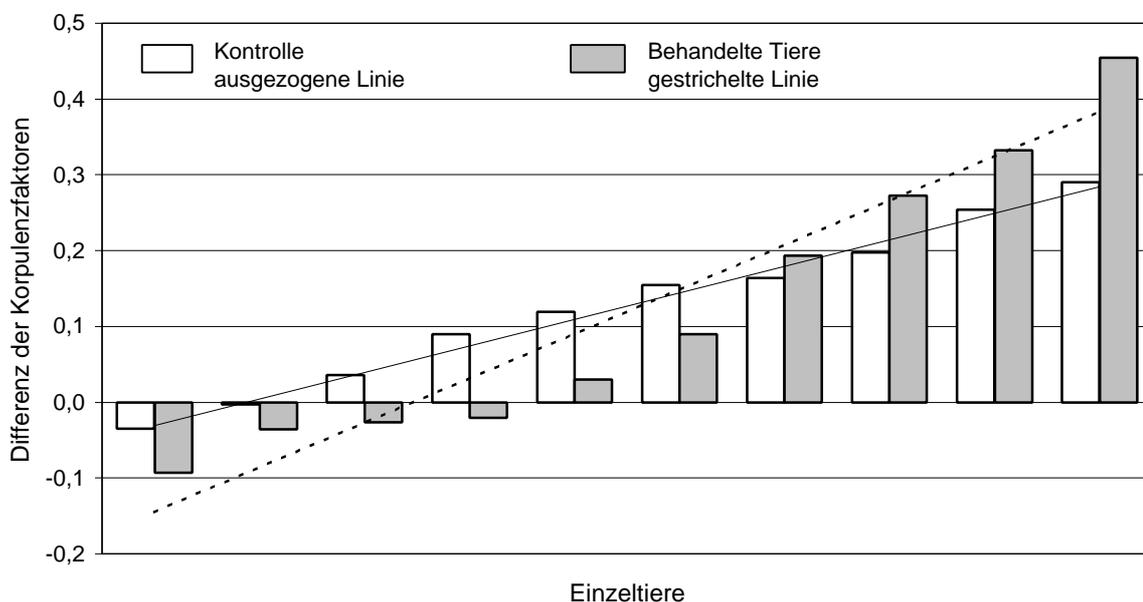


Abb. 21: Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Start und Ende der Schadstoffexposition in 1 mg CA/l (Versuch 1). Anordnung nach steigendem Wert der Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Versuchsbeginn und -ende. Positiver Wert bedeutet Abnahme, negativer Zunahme des Korpulenzfaktors.

3.3.2 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 2 mg/l auf den Korpulenzfaktor (Versuch 2)

Im Versuch 2 waren die Werte der Korpulenzfaktoren (Tab. 9a) nach 4 Wochen sowohl bei den Kontroll- als auch bei den behandelten Tieren eindeutig höher als am Anfang des Versuchs. Neun von zehn bzw. acht von neun Tieren hatten in beiden Gruppen nach Versuchsende einen größeren Korpulenzfaktor. Unbehandelte und behandelte Fische wiesen geringe Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Versuchsbeginn und -ende (Abb. 22a und 22b, Abb. 23) auf, die im Wilcoxon - Test nicht signifikant waren.

In dieser Konzentration waren folglich auch die Differenzen der Mittelwerte der Korpulenzfaktoren bei behandelten und unbehandelten Tieren nach Versuchsende annähernd gleich. Tiere mit niedrigem Korpulenzfaktor legten zu, Tiere mit höherem Korpulenzfaktor nahmen ab.

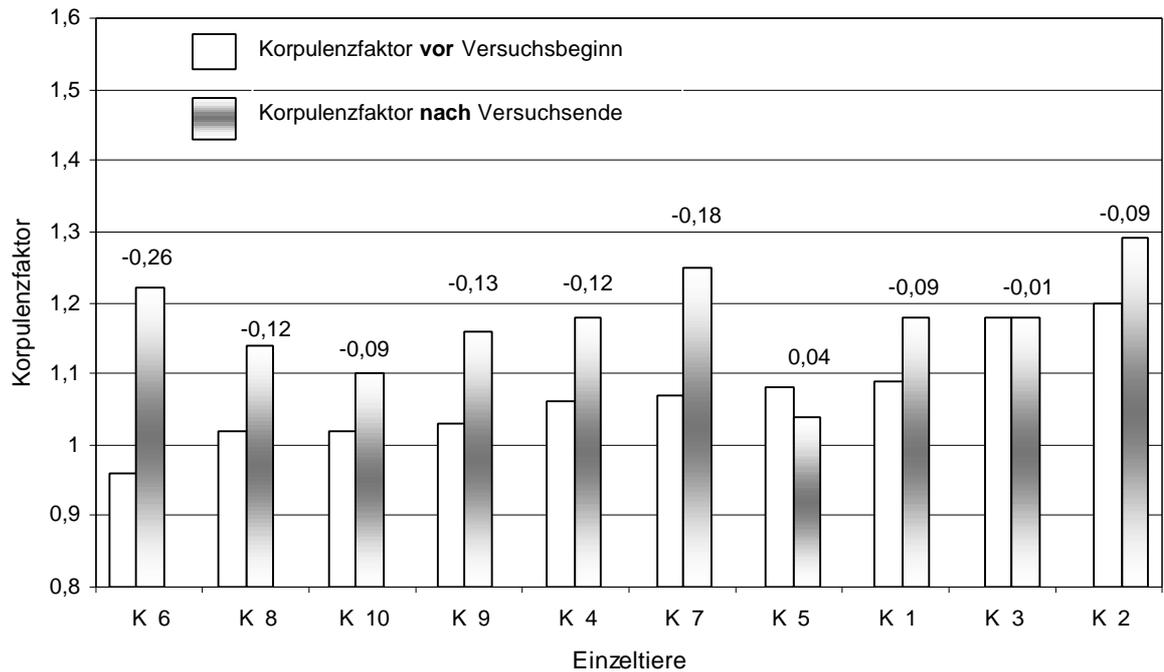


Abb. 22a: Korpulenzfaktoren der Kontrolltiere vor Versuchsbeginn (weiße Säulen) und am Versuchsende (Versuch 2, Anordnung wie Abb. 20a)

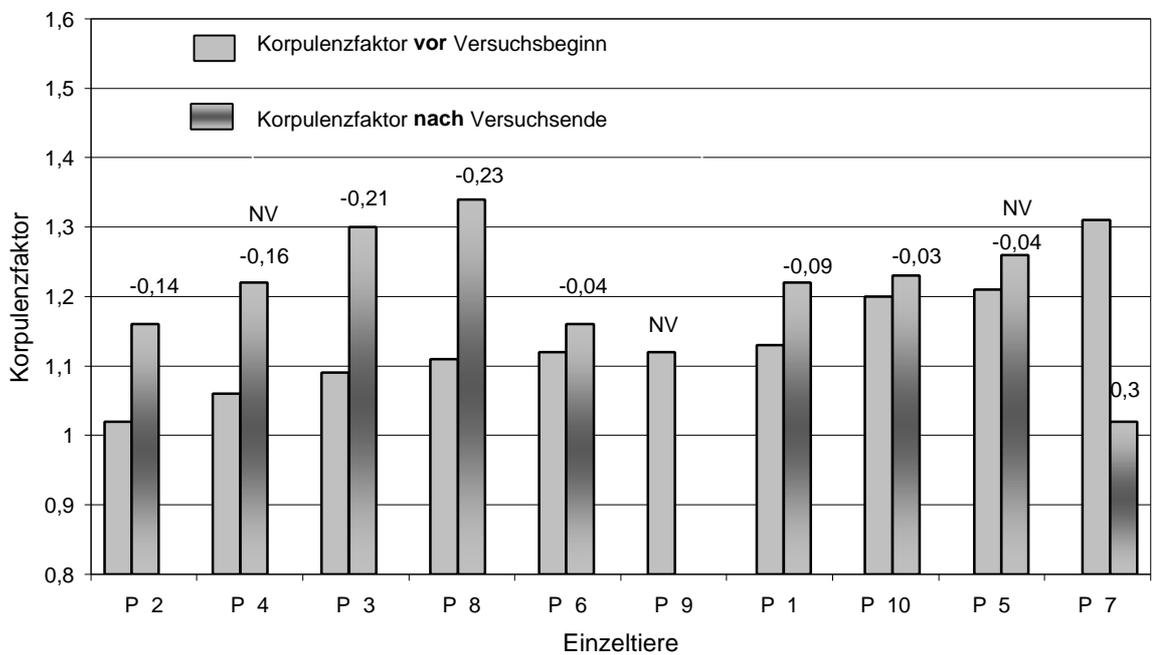


Abb. 22b: Korpulenzfaktoren der behandelten Tiere vor Versuchsbeginn (gleichmäßig graue Säulen) und am Versuchsende (Versuch 2, Anordnung wie Abb. 20a). Tier 9 starb nach 23 Tagen Schadstoffexposition, es war eines der drei Nahrungsverweigerer. Die Tiere P4 und P5 waren die anderen Nahrungsverweigerer (= NV).

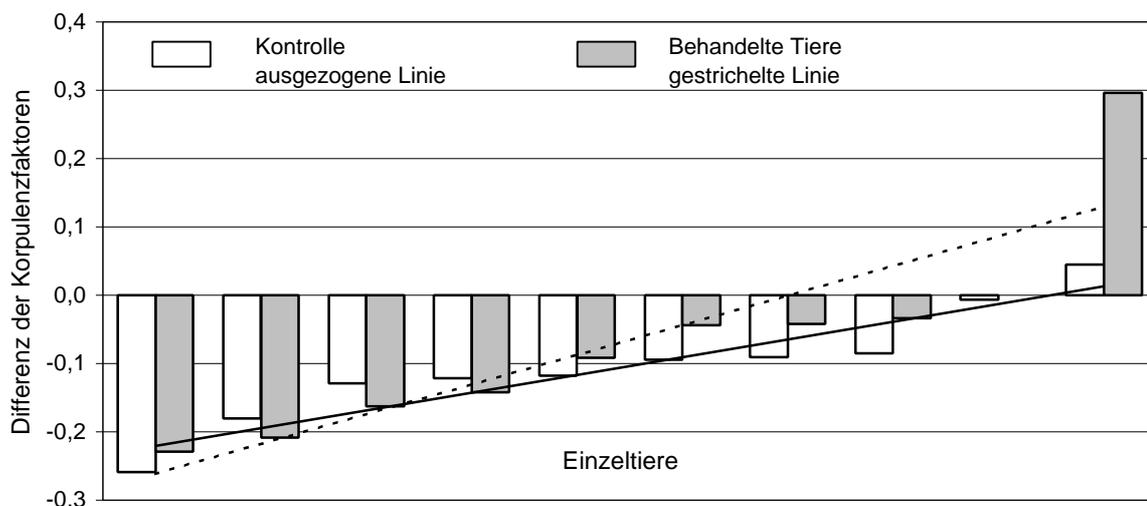


Abb. 23: Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Start und Ende der Schadstoffexposition in 2 mg CA/l (Versuch 2, Anordnung wie in Abb. 21)

Wie stark beeinflussten die zwei Nahrungsverweigerer den Mittelwert des Korpulenzfaktors zu Versuchsende? Bei gleichem Korpulenzfaktor vor Versuchsbeginn wiesen die Nahrungsverweigerer einen geringfügig höheren (um 0,03) Korpulenzfaktor am Versuchsende auf als die Normalfresser (Tab. 9b). Kontrollfische und Nahrungsverweigerer (2) hatten zu Versuchsende annähernd die gleichen Differenzen der Mittelwerte.

Tab. 9b: Vergleich der Mittelwerte der Korpulenzfaktorendifferenzen von Kontrolltieren mit Normalfressern und Nahrungsverweigerern (2 mg CA/l)

Versuch 2 2 mg CA/l	Frühjahr März	Korpulenzfaktor K_A vor Versuchsbeginn	Korpulenzfaktor K_E nach Versuchsende	Differenz der Mittelwerte $K_A - K_E$
Kontrolltiere	Mittelwerte \pm SD	1,07 \pm 0,07	1,18 \pm 0,07	- 0,11 \pm 0,00
Normalfresser	Mittelwerte \pm SD	1,14 \pm 0,09	1,21 \pm 0,10	- 0,07 \pm 0,16
Nahrungsverweigerer	Mittelwerte \pm SD	1,14 \pm 0,08	1,24 \pm 0,02	- 0,10 \pm 0,06

3.3.3 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 4 mg/l auf den Korpulenzfaktor (Versuch 3)

In dem Versuch mit der höchsten Schadstoffkonzentration von 4 mg CA/l ist das Ergebnis ähnlich (s. Tabelle 9a) wie in Versuch 1: bei den Kontroll- wie bei den behandelten Tieren waren die Werte für den Korpulenzfaktor vor Versuchsbeginn (für die Kontrolltiere: $K_A = 1,27$, für die Schadstoffexposition

vorgesehenen Tiere: $K_A = 1,27$) deutlich höher als am Ende (Kontrolle: $K_E = 1,19$, behandelte T.: $K_E = 1,17$, Abb. 24a). Von den Kontrolltieren hatte nur ein Tier – Tier 6 – nach Versuchsende einen größeren Korpulenzfaktor als vor Versuchsbeginn. Für die relativ große Differenz der Korpulenzfaktoren bei Fisch 3 ist als Grund erkennbar, dass es vorher den größten Korpulenzfaktor hatte. Bei den behandelten Tieren wiesen drei Tiere – Nr. 4, 6 und 9 – am Versuchsende einen größeren Korpulenzfaktor auf (Abb. 24b).

Die Differenz der Mittelwerte der Korpulenzfaktoren zwischen Kontrolle und behandelten Tieren beträgt 0,02, was im statistischen Test zu keiner Signifikanz ausreicht (Tab. 9a).

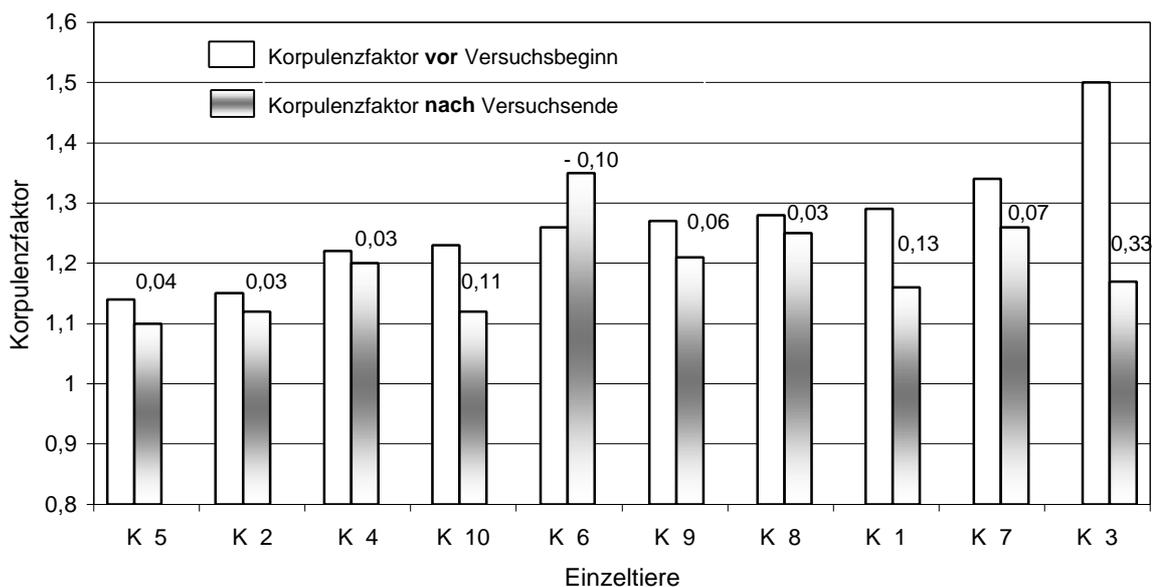


Abb. 24a: Korpulenzfaktoren der unbehandelten Tiere vor Versuchsbeginn und am Versuchsende (Versuch 3, Anordnung wie in Abb. 21)

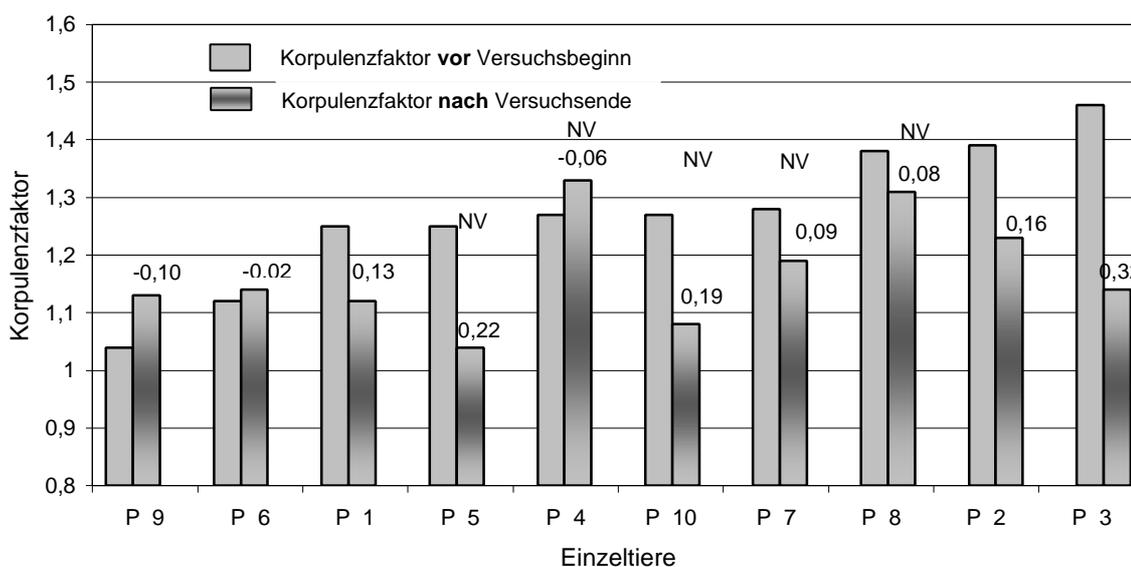


Abb. 24b: Korpulenzfaktoren der behandelten Tiere vor und nach der Schadstoffexposition in 4 mg CA/I (NV = Nahrungsverweigerer, Versuch 3, Anordnung wie in Abb. 21)

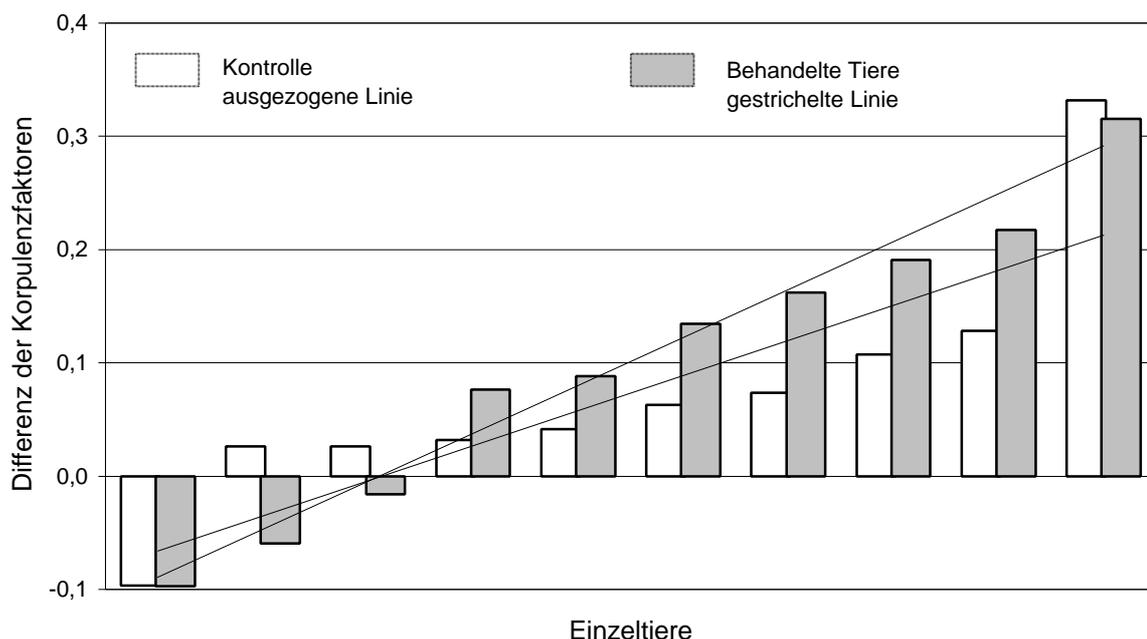


Abb. 25: Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Start und Ende der Schadstoffexposition in 4 mg CA/l (Versuch 3). Die Anordnung der Tiere erfolgt nach steigendem Wert der Differenz der Korpulenzfaktoren zwischen Versuchsbeginn und -ende.

In dieser 4-CA - Konzentration gab es je fünf Normalfresser und Nahrungsverweigerer (Tab. 9c). Die Differenzen der Mittelwerte der exponierten Tiere sind gleich; d.h. in dieser Jahreszeit bewirkte die Nahrungsverweigerung noch keine Veränderung des Korpulenzfaktors. Wahrscheinlich war auch die Versuchsdauer zu kurz, um eine deutliche Veränderung des Korpulenzfaktors hervorzurufen.

Tab. 9c: Vergleich der Mittelwerte der Korpulenzfaktorendifferenzen von Kontrolltieren mit Normalfressern und Nahrungsverweigerern (4 mg CA/l)

Versuch 3 4 mg CA/l	Spätherbst November	Korpulenzfaktor K_A vor Versuchsanfang	Korpulenzfaktor K_E nach Versuchsende	Differenz der Mittelwerte K_A – K_E
Kontrolltiere	Mittelwerte ± SD	1,27 ± 0,10	1,19 ± 0,07	0,08 ± 0,02
Normalfresser	Mittelwerte ± SD	1,25 ± 0,16	1,15 ± 0,04	0,10 ± 0,14
Nahrungsverweigerer	Mittelwerte ± SD	1,29 ± 0,05	1,19 ± 0,12	0,10 ± 0,10

In Abb. 26 werden die Mittelwerte der Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Start und Versuchsende miteinander verglichen. Das bedeutet für die 1 mg CA/l - und 4 mg CA/l - Konzentration (Herbstversuche), dass in diesen Konzentrationen die Korpulenzfaktoren zu Beginn größer waren als zu Versuchsende. Bei der 2 mg CA/l - Konzentration (Frühjahrsversuch) waren die Mittelwerte für den

Korpulenzfaktor am Versuchsende größer als zu Versuchsbeginn. Hier ergab sich auch die größte Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Tieren (Tab. 9a). Die Tiere des Versuchs 2, der im März durchgeführt wurde, sind in ihrem Verhalten und Metabolismus nicht mit denen der Versuche 1 und 3 zu vergleichen, die im Oktober bzw. November durchgeführt wurden.

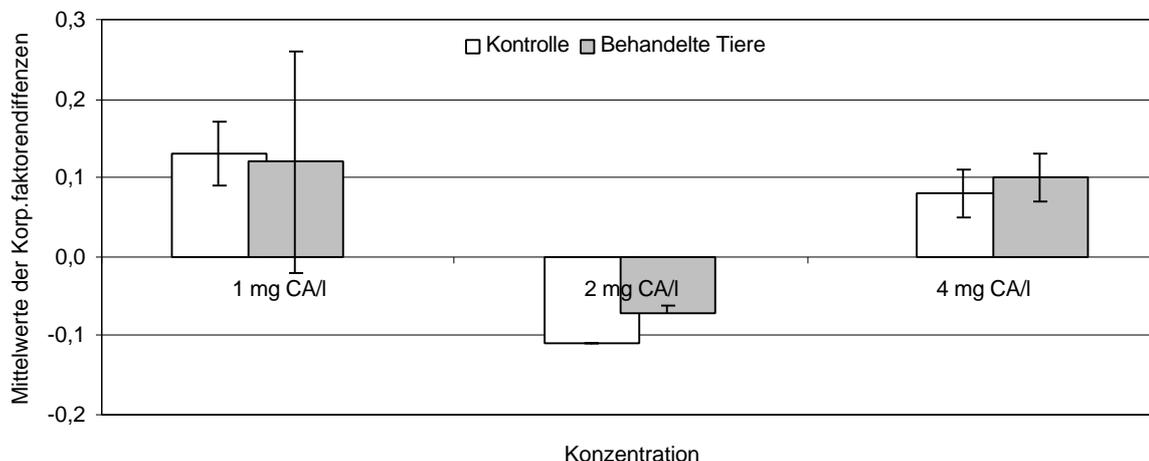


Abb. 26: Vergleich der Mittelwerte der Differenzen der Korpulenzfaktoren zwischen Start und Ende der Schadstoffexposition in den verschiedenen Konzentrationen. Die Berechnung für die Standardabweichung der unbehandelten Tiere im Versuch 2 (2 mg CA/l) ergab den Wert Null. Positive Werte bedeuten Abnahme, negative Werte Zunahme des Korpulenzfaktors.

Statistisch gesehen waren bei allen drei Versuchen die Unterschiede der Korpulenzfaktoren zwischen den Kontrolltieren und behandelten Tieren nicht signifikant. Der Korpulenzfaktor eignet sich nicht als Parameter, da er die Resultate der Gewichts- und Längenbestimmung nicht direkt widerspiegelt.

3.4 Einfluss von Chloranilin auf das Lebergewicht

Die Leber, zentrales Stoffwechselorgan des Organismus und auch maßgeblich an Entgiftungsreaktionen im Körper beteiligt, sollte durch den Abbau des Chloranilins und der benötigten Stoffwechsellösungen Veränderungen aufweisen. Nach Versuchsende wurde die Leber gewogen und „per Augenschein“ ihre Farbe festgestellt. Tatsächlich konnten Braunbeck et al. (1990, 1993), Braunbeck (1993), Effekte auf die Leber elektronenmikroskopisch an Fingerlingen der Regenbogenforelle und beim Zebraäbrbling nachweisen.

3.4.1 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 1 mg/l auf das Lebergewicht (Versuch 1)

Die Leber der Kontrolltiere wie die der behandelten Tiere zeigte keine Veränderungen; ihre Farbe war braunrot, eine Größenzunahme oder – abnahme konnte nicht erkannt werden.

Die Mittelwerte der Lebergewichte von unbehandelten und behandelten Fischen unterschieden sich nur um 0,02 g (1,9 %); die Mittelwerte der Quotienten Lebergewicht / Körpergewicht wiesen eine Differenz von $0,06 \cdot 10^{-3}$ auf. Der Mittelwert der Körpergewichte der unbehandelten Fische war mit 87,34 g um 1,6 g größer als der der behandelten Fische. Die Konzentration von 1 mg CA/I führte zu keinem signifikanten Unterschied (U – Test, Mann und Whitney) zwischen den beiden Fischgruppen (Tab.10a, Abb. 27).

3.4.2 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 2 mg/l auf das Lebergewicht (Versuch 2)

Die braunrote Farbe der Leber bei den unbehandelten Tieren ließ auf eine normale Durchblutung schließen. Die Lebergröße war normal im Vergleich zu den Kontrolltieren. Von den exponierten Tieren hatten sechs Tiere eine hellere, ins Braungelb gehende Verfärbung der Leber. Kiemen, Gallenblase und Fettkörper erschienen unverändert.

Der Mittelwert der Lebergewichte war bei den behandelten Tieren um 0,31 g (um 17 %) geringer als bei den Kontrollen, die Mittelwerte der Quotienten Leber-/ Körpergewicht lagen bei den behandelten Tieren um $3,73 \cdot 10^{-3}$ niedriger, das entspricht 22 %. Dieser Unterschied erwies sich als signifikant (Tab. 10a, Abb. 27).

3.4.3 Einfluss der Chloranilin-Konzentration von 4 mg CA/I auf das Lebergewicht (Versuch 3)

Farbe und Größe der Leber bei den Kontrolltieren erschienen normal; von den behandelten Tieren zeigten fünf von zehn auffällige Veränderungen: die Leber war braun bis gelb und erschien kleiner, der Fettkörper war grau bis weiß, die Kiemen erschienen blasser. Bei drei Tieren war die Gallenblase mit dunkelgrünem Sekret prall gefüllt.

Der Mittelwert für das Lebergewicht lag bei den behandelten Tieren um 0,49 g niedriger als bei den unbehandelten; das entspricht 33%. Der Mittelwert der Quotienten Leber- / Körpergewicht unterschied sich um $4,25 \cdot 10^{-3}$ zugunsten der Kontrolle (entsprechend 27 %); diese Differenz war signifikant ($P < 0,05$, U – Test, Tab. 10a, Abb. 27).

Ein Vergleich der drei verschiedenen Behandlungen macht folgendes deutlich:

Die Differenz der Mittelwerte der Lebergewichte zwischen unbehandelten und exponierten Tieren war bei der 1 mg CA/I – Konzentration sehr klein (0,02 g), bei der 2 und 4 mg CA/I-Konzentration erheblich größer (0,31 bzw. 0,49), ein signifikanter Unterschied lag aber nicht vor. Der Quotient Lebergewicht / Körpergewicht unterschied sich in der 1 mg CA/I-Konzentration nicht zwischen den unbehandelten und behandelten Tieren, in der 2 und 4 mg CA/I - Konzentration waren die Unterschiede signifikant ($P < 0,05$, U-Test, Abb. 27).

Tab. 10a: Vergleich der Mittelwerte der Leber – und Körpergewichte sowie der Mittelwerte der Quotienten Lebergewicht / Körpergewicht in den verschiedenen 4-CA-Konzentrationen.☆ Signifikanz $P < 0,05$

	Versuch 1 Oktober		Versuch 2 März		Versuch 3 November	
	1 mg CA/l		2 mg CA/l		4 mg CA/l	
	Lebergewicht Mittelwert \pm SD (g)	Körpergew. Mittelwert (g)	Lebergewicht Mittelwert \pm SD (g)	Körper- gew. Mittelwert (g)	Lebergewicht Mittelwert \pm SD (g)	Körper- gew. Mittelwert (g)
Kontrolltiere	1,07 \pm 0,12	87,34 g	1,78 \pm 0,43	102,15 g	1,47 \pm 0,32	93,15 g
behandelte Tiere	1,05 \pm 0,19	85,74 g	1,47 \pm 0,21	109,01 g	0,98 \pm 0,30	84,26 g
	Lebergewicht / Körpergewicht		Lebergewicht / Körpergewicht		Lebergewicht / Körpergewicht	
	Mittelwert \pm SD		Mittelwert \pm SD		Mittelwert \pm SD	
Kontrolltiere	12,31 \pm 1,22 ($\cdot 10^{-3}$)		17,27 \pm 2,73 ($\cdot 10^{-3}$)		15,77 \pm 1,60 ($\cdot 10^{-3}$)	
behandelte Tiere	12,37 \pm 2,01 ($\cdot 10^{-3}$)		13,54 \pm 1,30 ($\cdot 10^{-3}$) ☆		11,52 \pm 2,12 ($\cdot 10^{-3}$) ☆	

In Tabelle 10b werden die Mittelwerte der Lebergewichte und die Mittelwerte der Quotienten Leber- / Körpergewicht von den Kontrolltieren mit denen der Normalfresser und Nahrungsverweigerer verglichen.

Tab. 10b: Vergleich der Mittelwerte der Lebergewichte und Mittelwerte der Quotienten Leber- / Körpergewicht bei Kontrolle, Normalfressern und Nahrungsverweigerern

	Kontrolltiere		Normalfresser		Nahrungsverweigerer	
	Leber- gewicht (g)	Quotient Leber / Körpergew. ($\cdot 10^{-3}$)	Leber- gewicht (g)	Quotient Leber / Körpergew. ($\cdot 10^{-3}$)	Leber- gewicht (g)	Quotient Leber / Körpergew. ($\cdot 10^{-3}$)
Versuch 2 (2mg CA/l)	1,78	17,3 ($\cdot 10^{-3}$)	1,52	13,4 ($\cdot 10^{-3}$)	1,33	13,3 ($\cdot 10^{-3}$)
Versuch 3 (4mg CA/l)	1,47	15,8 ($\cdot 10^{-3}$)	1,04	12,4 ($\cdot 10^{-3}$)	0,91	10,7 ($\cdot 10^{-3}$)

Die beiden Parameter Lebergewicht und der Quotient aus Lebergewicht und Körpergewicht nahmen in beiden Konzentrationen von Kontrolle über die Normalfresser zu den Nahrungsverweigerern ab. In beiden Konzentrationen – stärker in der 4 mg als in der 2 mg Konzentration – nahmen die Nahrungsverweigerer Einfluss auf das Entstehen des signifikanten Unterschiedes des Quotienten Leber- / Körpergewicht zwischen den Kontrolltieren und exponierten Fischen.

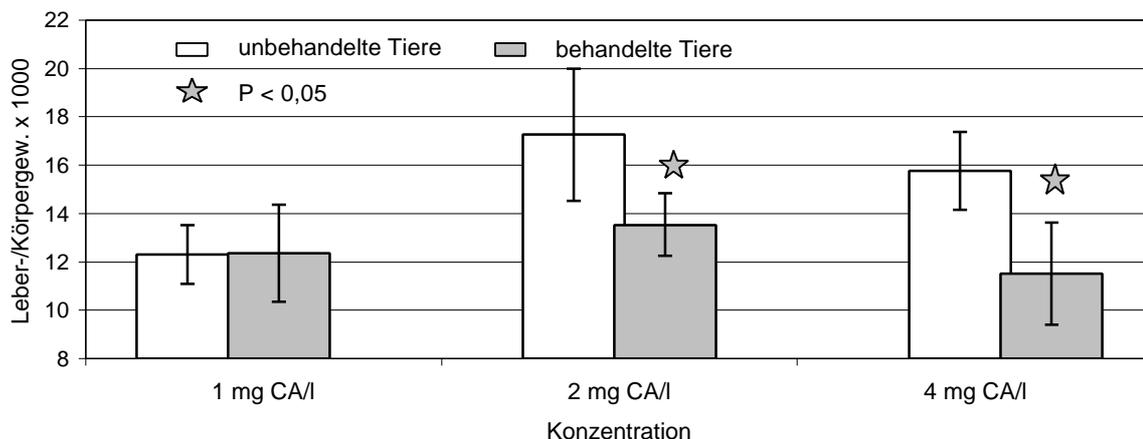


Abb. 27: Vergleich der Mittelwerte der Quotienten Lebergewicht / Körpergewicht in den verschiedenen Chloranilin - Konzentrationen

3.5 Einfluss von Chloranilin auf das Herzgewicht

Die erhöhte Stoffwechselleistung für die Überwindung eines Schadstoffeffekts könnte zu einer Belastung des Blutkreislaufs und somit zu einer Veränderung der Herzgröße führen. Eine geringe Wirkung des Schadstoffs könnte z.B. zu einer Kräftigung der Herzmuskulatur führen, eine stärkere Wirkung könnte den Abbau der Herzmuskulatur zur Folge haben, der zu einer Gewichtsreduktion des Herzens führt.

3.5.1 Wirkung einer Chloranilin-Konzentration von 1 mg/l auf das Herzgewicht (Versuch 1)

Die Mittelwerte der Herzgewichte unbehandelter und behandelter Fische differierten um 0,01 g, das entspricht 8 %. Die Werte der Standardabweichungen waren annähernd gleich. Der Rangsummentest ergab keine Signifikanz. Auch der Vergleich der Mittelwerte der Quotienten Herzgewicht / Körpergewicht (14 %) ergab in der statistischen Überprüfung keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen (Tab. 11a, Abb. 28).

3.5.2 Wirkung einer Chloranilin-Konzentration von 2 mg/l auf das Herzgewicht (Versuch 2)

In dieser Konzentration waren die Mittelwerte der Herzgewichte der behandelten Tiere um 0,05 g (18 %), die der Quotienten Herzgewicht / Körpergewicht um $0,4 \cdot 10^{-3}$ (28 %) größer als bei der Kontrolle. Diese Differenz erwies sich im Test (U – Test, $P < 0,05$) als signifikant (Tab. 11a, Abb. 28).

3.5.3 Wirkung einer Chloranilin-Konzentration von 4 mg/l auf das Herzgewicht (Versuch 3)

Durch die Behandlung vergrößerte sich der Quotient Herzgewicht / Körpergewicht signifikant (Tab. 11a, Abb. 28). Die Differenz der Mittelwerte der Herzgewichte zwischen Kontrolle und behandelten Fischen betrug zwar nur 0,01 g (7 %), doch die der Mittelwerte der Quotienten Herzgewicht / Körpergewicht lag bei $0,32 \cdot 10^{-3}$ (20 %). In Tab. 11b werden die Mittelwerte der Herzgewichte und der Quotienten Herzgewicht / Körpergewicht von Kontrolltieren, Normalfressern und Nahrungsverweigerern miteinander verglichen.

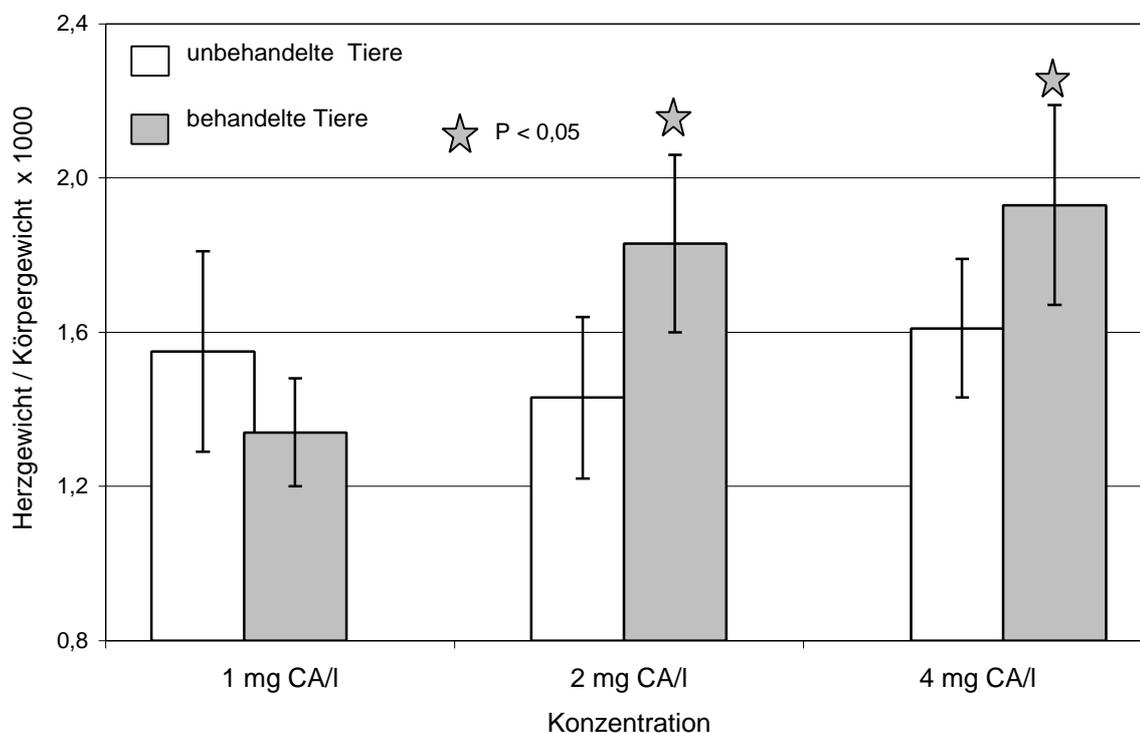
Tab. 11a: Vergleich der Mittelwerte der Herzgewichte und Quotienten Herzgewicht/Körpergewicht in den verschiedenen Konzentrationen. Bei 2 mg und 4 mg CAI sind die Unterschiede zwischen den unbehandelten und behandelten Tieren signifikant (Markierung ☆).

	Versuch 1 Oktober 1 mg CAI	Versuch 2 März 2 mg CAI	Versuch 3 November 4 mg CAI
	Herzgewicht Mittelwert ± Standardabweichung (g)	Herzgewicht Mittelwert ± Standardabweichung (g)	Herzgewicht Mittelwert ± Standardabweichung (g)
Kontrolltiere	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,04
behandelte Tiere	0,12 ± 0,02	0,20 ± 0,04	0,16 ± 0,05
	Herz- / Körpergewicht Mittelwert ± Standardabweichung	Herz- / Körpergewicht Mittelwert ± Standardabweichung	Herz- / Körpergewicht Mittelwert ± Standardabweichung
Kontrolltiere	1,55 ± 0,26(* 10 ⁻³)	1,43 ± 0,21(* 10 ⁻³)	1,61 ± 0,18(* 10 ⁻³)
behandelte Tiere	1,34 ± 0,14(* 10 ⁻³)	1,83 ± 0,23(* 10 ⁻³) ☆	1,93 ± 0,26(* 10 ⁻³) ☆

Tab. 11b: Vergleich der Mittelwerte von Herzgewicht und des Quotienten Herz-/ Körpergewicht bei Kontrolle, Normalfressern und Nahrungsverweigerern

	Kontrolltiere		Normalfresser		Nahrungsverweigerer	
	Herzgewicht (g)	Quotient Herz -/ Körpergew.	Herzgewicht (g)	Quotient Herz -/ Körpergew.	Herzgewicht (g)	Quotient Herz -/ Körpergew.
Versuch 2 (2mg CA/l)	0,15	1,43 (* 10 ⁻³)	0,21	1,88 (* 10 ⁻³)	0,16	1,68 (* 10 ⁻³)
Versuch 3 (4mg CA/l)	0,15	1,61 (* 10 ⁻³)	0,17	2,02 (* 10 ⁻³)	0,15	1,84 (* 10 ⁻³)

In beiden Konzentrationen waren die Differenzen der Quotienten Herz - / Körpergewicht zwischen Normalfressern und Nahrungsverweigerern mit 0,2 (2 mg CA/l) und 0,18 (4 mg CA/l) etwa gleich. Aus der Differenz der Herzgewichte zwischen Normalfressern und Nahrungsverweigerern kann auf eine größere Wirkung des Chloranilins bei den Frühjahrstieren geschlossen werden. Das Herzgewicht der Normalfresser in der 2 mg Konzentration nahm im Vergleich zur Kontrolle um 0,06 g (40 %) zu, das der Normalfresser in der 4 mg Konzentration nur um 0,02 g oder 13 %. Die Quotienten Herz-/ Körpergewicht unterschieden sich von denen der Kontrolltiere in der 2 mg CA/l-Konzentration um 31 %, in der 4 mg CA/l-Konzentration um 25 %; die der Nahrungsverweigerer waren mit 17 % in der 2 mg CA/l-Konzentration und mit 14 % in der 4 mg CA/l-Konzentration erwartungsgemäß geringer. Bei dieser geringen Differenz ist schwer zu entscheiden, ob sie durch die Jahreszeit oder durch die schädigende Wirkung des Chloranilins hervorgerufen wurde.

**Abb. 28:** Vergleich der Mittelwerte der Quotienten Herzgewicht / Körpergewicht bei unbehandelten und behandelten Tieren in den verschiedenen Konzentrationen

3.6 Einfluss von Chloranilin auf die relative Anzahl der Blutzellen im Plasma

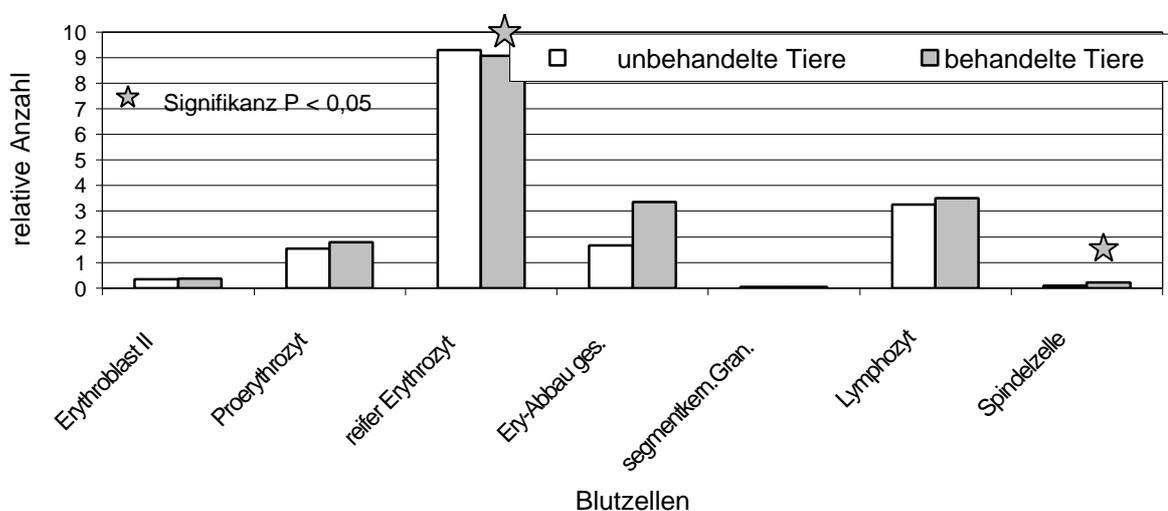
Intoxikationen bei Knochenfischen haben oft ebenso charakteristische Veränderungen im Blutbild zur Folge wie bei höheren Wirbeltieren. Die Beurteilung der Blutbilder bei Fischen ist wesentlich schwieriger als bei Säugetieren, da bei Fischen noch verschiedene Entwicklungsstadien der Erythrozyten im peripheren Blut zu unterscheiden sind. Aus der Kopfniere und aus der Milz werden noch unreife Erythrozyten entlassen. Von den verschiedenen Blutzelltypen wurden hier nur die sieben Formen erfasst, die quantitativ bedeutend waren. Bezugspunkt der im Folgenden ermittelten relativen Zellzahlen ist die Gesamtheit aller gezählten Zellen (gleich 100 gesetzt).

3.6.1 Einfluss einer Konzentration von 1 mg CA/l auf die relative Anzahl der Blutzellen (Versuch 1)

Die relative Anzahl der Erythroblast II – Stadien war bei den behandelten Fischen um den Faktor 1,12, die der Proerythrozyten um den Faktor 1,17 erhöht; reife Erythrozyten gab es deutlich weniger bei den Schadstoff exponierten Fischen (Abnahme um den Faktor 0,97). Die starke Zunahme der Erythrozyten-Abbauformen (Faktor 2,02), der Lymphozyten (Faktor 1,08) und der Spindelzellen (Faktor 2,75 !) bei den behandelten Tieren war Folge der Wirkung des Chloranilins. Die Konzentration der segmentkernigen Granulozyten war gleich in beiden Gruppen (Tab. 12). In Abb. 29 ist die relative Anzahl der Blutzellen von unbehandelten und behandelten Tieren vergleichend dargestellt. Im Diagramm wurden die Werte für die reifen Erythrozyten durch den Faktor 10 dividiert; d.h. der Wert im Diagramm ist mit 10 zu multiplizieren, um den reellen Wert zu erhalten (Abb. 29, 30 und 31). Im U – Test war nur für die reifen Erythrozyten und Spindelzellen ein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Tieren festzustellen.

Tab. 12: Relative Anzahl der Blutzellen bei Kontrollen und behandelten Tieren (Versuch 1, 1 mg CA/l)

Versuch 1	Unbehandelte Tiere in % der relativen Anzahl	Behandelte Tiere in % der relativen Anzahl	Verhältnis der relativen Anzahl der Blutzellen Behandelte / unbehandelte Tiere
Blutzellen			
Erythroblasten II - Stadium	0,33	0,37	1,12
Proerythrozyten	1,54	1,80	1,17
Reife Erythrozyten	93,1	90,7	0,97
Erythrozyten-Abbauformen	1,67	3,37	2,02
Segmentkernige Granulozyten	0,05	0,05	1,00
Lymphozyten	3,27	3,50	1,08
Spindelzellen	0,08	0,22	2,75

**Abb. 29:** Vergleich der relativen Anzahl der Blutzellen in unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 1, 1 mg CA/l). Die Summe aller bestimmten Zelltypen entspricht 100 % (Erythrozytenwert s. Text 3.6.1).

3.6.2 Einfluss einer Konzentration von 2 mg CA/l auf die Blutzellen (Versuch 2)

In dieser Konzentration waren sehr deutliche Unterschiede in der relativen Anzahl der Blutzellen zwischen unbehandelten und behandelten Tieren vorhanden. Die reifen Erythrozyten waren die einzigen Zelltypen, deren relative Anzahl bei den behandelten Tieren abnahm; die relative Anzahl der anderen

Zellen nahm zu (Tab. 13a, Abb. 30). Hervorzuheben ist hier die starke Zunahme der Entwicklungsstadien, die zu reifen Erythrozyten führten.

Die größte Zunahme – um das Fünffache – wies das Erythroblast II -Stadium auf, um mehr als das Doppelte stieg die relative Anzahl der Proerythrozyten und der Spindelzellen. Die Anzahl der Zellen des Erythroblast II – Stadiums, der Proerythrozyten und der Spindelzellen ist signifikant verschieden zwischen unbehandelten und behandelten Tieren (U – Test).

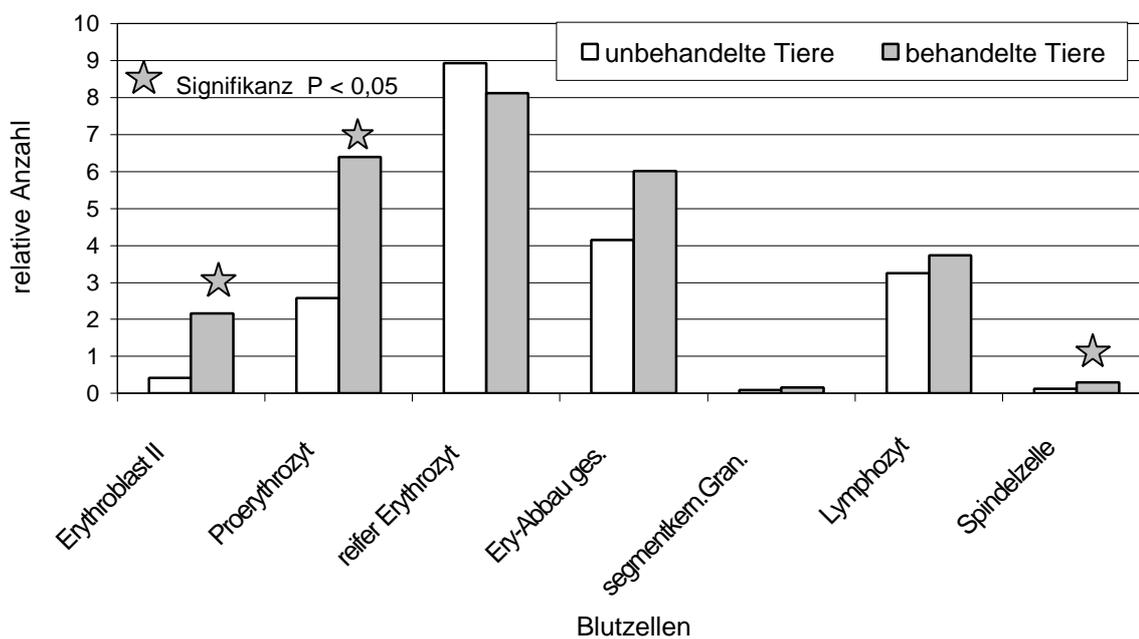
Tab. 13a: Relative Anzahl der Blutzellen in unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 2, 2 mg CA/l)

Versuch 2	Unbehandelte Tiere in % der relativen Anzahl	Behandelte Tiere in % der relativen Anzahl	Verhältnis der relativen Anzahl der Blutzellen Behandelte / unbehandelte Tiere
Blutzellen			
Erythroblasten II -Stadium	0,43	2,17	5,05
Proerythrozyten	2,58	6,39	2,48
Reife Erythrozyten	89,40	81,20	0,91
Erythrozyten-Abbauformen	4,14	6,03	1,45
Segmentkernige Granulozyten	0,09	0,16	1,78
Lymphozyten	3,24	3,74	1,15
Spindelzellen	0,12	0,31	2,58

Welchen Einfluss nahmen die zwei Nahrungsverweigerer auf die relative Anzahl der Blutzelltypen? In Tab. 13b wird die relative Anzahl der Blutzellen bei Kontrollfischen, Normalfressern und Nahrungsverweigerern wiedergegeben. Eine statistische Überprüfung fand auf Grund der geringen Zahl der Nahrungsverweigerer nicht statt. Hervorzuheben ist bei den Nahrungsverweigerern im Vergleich zu den Normalfressern die große Zunahme der Proerythrozyten, der Lymphozyten und der Spindelzellen. Die Erythrozyten – Abbauformen nahmen im Vergleich zu den Normalfressern um mehr als die Hälfte ab.

Tab. 13b: Relative Anzahl der Blutzelltypen bei Kontrolltieren, Normalfressern und Nahrungsverweigerern (2 mg CA/l)

Versuch 2	Unbehandelte Tiere in % der relativen Anzahl	Normalfresser in % der relativen Anzahl	Nahrungsverweigerer in % der relativen Anzahl	Verhältnis der relativen Anzahl der Blutzellen Normalfresser/ Kontrolle
Blutzellen				
Erythroblasten II -Stadium	0,43	1,51	3,65	3,51
Proerythrozyten	2,58	5,28	8,86	2,05
Reife Erythrozyten	89,40	82,80	77,76	1,06
Erythrozyten-Abbauformen	4,14	7,39	2,94	1,78
Segmentkernige Granulozyten	0,09	0,13	0,23	0,69
Lymphozyten	3,24	2,68	6,05	0,83
Spindelzellen	0,12	0,21	0,51	1,75

**Abb. 30:** Vergleich der relativen Anteile der Blutzellen in unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 2, 2 mg CA/l). Die Summe aller bestimmten Zelltypen entspricht 100 %. (Erythrozytenwert s. Text 3.6.1)

3.6.3 Einfluss einer Konzentration von 4 mg CAI auf die Blutzellen (Versuch 3)

Die größten Differenzen der relativen Anzahl zwischen unbehandelten und behandelten Tieren gab es bei den Vorstufen und Abbauförmern der Erythrozyten. Bei den behandelten Fischen waren die relativen Anzahlen aller Blutzellen – mit Ausnahme der reifen Erythrozyten – erhöht (Tab. 14a, Abb. 31). Die Zellen des Erythroblasten II – Stadiums nahmen um den Faktor 3,51, die Proerythrozyten um 1,93, die Erythrozyten-Abbauförmern um 2,43 zu. Diese Blutzellen wiesen die größten Zuwachsraten auf. Die reifen Erythrozyten erfuhren zwar mit dem Faktor (0,92) eine Abnahme, diese ist jedoch nur geringfügig kleiner als die in der 2 mg CAI-Konzentration (Tab. 13, Faktor 0,91); im U – Test war diese Differenz signifikant. Die großen Zunahmen bei den Erythroblast II – Stadien, den Proerythrozyten und den verschiedenen Abbauförmern der Erythrozyten bei den behandelten Tieren waren nicht signifikant.

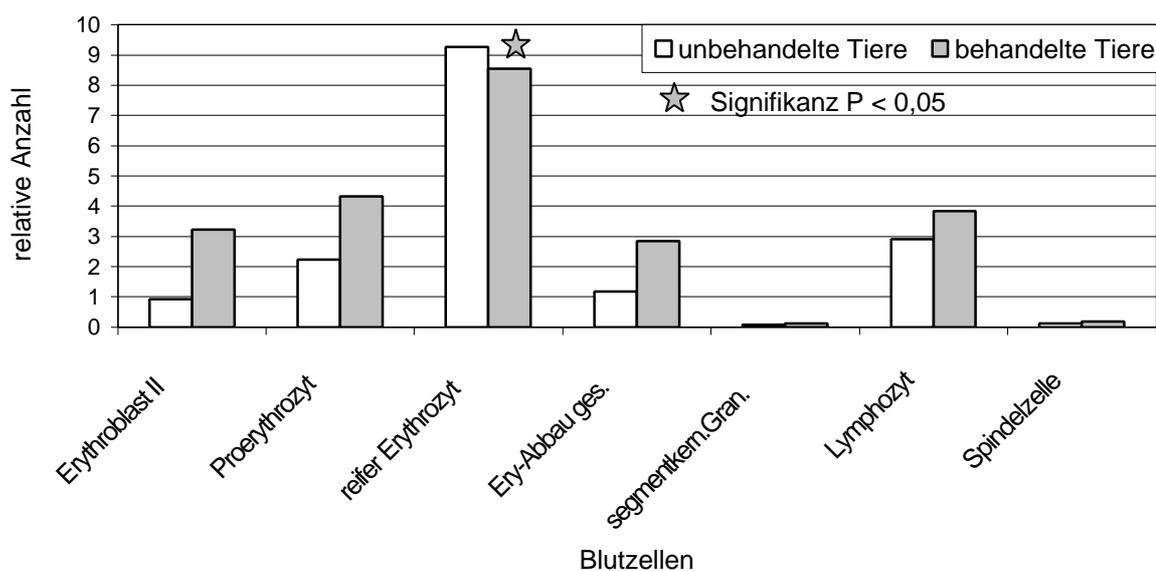
Tab. 14a: Relative Anteile der Blutzelltypen bei unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 3, 4 mg CAI)

Versuch 3	Unbehandelte Tiere in % der relativen Anzahl	Behandelte Tiere in % der relativen Anzahl	Verhältnis der relativen Anzahl der Blutzellen Behandelte / unbehandelte Tiere
Blutzellen			
Erythroblasten II - Stadium	0,92	3,23	3,51
Proerythrozyten	2,23	4,32	1,93
Reife Erythrozyten	92,60	85,50	0,92
Erythrozyten-Abbauförmern	1,17	2,85	2,43
Segmentkernige Granulozyten	0,07	0,11	1,57
Lymphozyten	2,91	3,84	1,32
Spindelzellen	0,11	0,18	1,64

In dieser Konzentration war die Wirkung der Nahrungsverweigerer ähnlich derjenigen der Normalfresser (Tab. 14b). Im Vergleich zu den Normalfressern zeigten die Nahrungsverweigerer leichte Zunahmen der reifen Erythrozyten, der Lymphozyten und der Spindelzellen. Die etwas geringeren Werte der Erythroblast II – Stadien wie der Proerythrozyten können sowohl als Folge des Energiemangels wie auch als Wirkung des Chloranilins gedeutet werden. Die leicht erhöhte Rate der Lymphozyten – und Spindelzellen kann als Abwehrreaktion interpretiert werden.

Tab. 14b: Relative Anteile der Blutzelltypen bei Kontrolltieren, Normalfressern und Nahrungsverweigerern (Versuch 3, 4 mg CA/I)

Versuch 3	Unbehandelte Tiere in % der relativen Anzahl	Normalfresser in % der relativen Anzahl	Nahrungsverweigerer in % der relativen Anzahl	Verhältnis der relativen Anzahl der Blutzellen Normalfresser/ Kontrolle
Blutzellen				
Erythroblasten II -Stadium	0,92	3,53	2,90	3,84
Proerythrozyten	2,23	5,29	3,28	2,37
Reife Erythrozyten	92,6	84,04	86,99	0,91
Erythrozyten-Abbauformen	1,17	3,15	2,52	2,69
Segmentkernige Granulozyten	0,07	0,18	0,05	2,57
Lymphozyten	2,91	3,66	4,04	1,26
Spindelzellen	0,11	0,15	0,22	1,36

**Abb. 31:** Vergleich der relativen Anteile der Blutzellen zwischen Kontrolle und behandelten Tieren (Versuch 3, 4 mg CA/I, Erythrozytenwert s. Text 3.6.1)

3.6.4 Vergleich der Veränderungen der Blutzellenzahl in den drei Chloranilin-Konzentrationen

Fasst man die prozentualen Anteile eines Blutzelltyps der unter verschiedenen Konzentrationen gehaltenen Fische jeweils in einem Diagramm zusammen, so erhält man einen besseren Überblick über die Veränderungen der Zelltypen (Abb. 32 - 35). Unter der Wirkung aller Konzentrationen ließen sich Veränderungen nachweisen. Die Konzentration von zwei Milligramm CA/I bewirkte bei allen Blutzellen

die größten Unterschiede – mit Ausnahme des Erythroblasten II – Stadiums und der Lymphozyten – zwischen unbehandelten und behandelten Tieren.

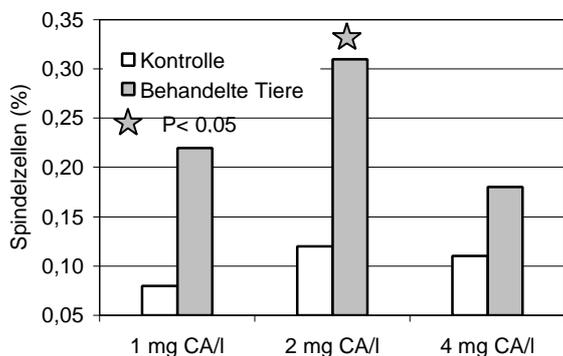


Abb. 32: Relative Anzahl der Spindelzellen (Thrombozyten) in den verschiedenen 4-CA – Konzentrationen.

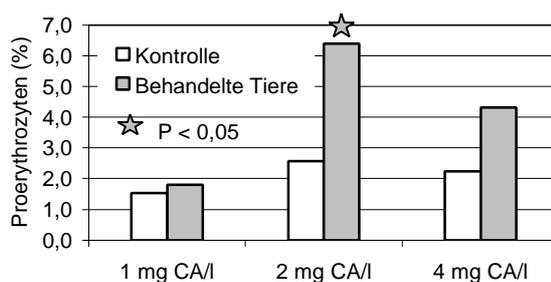
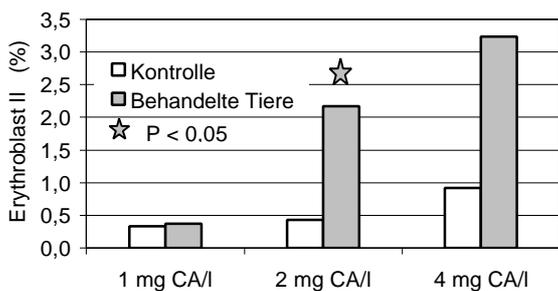


Abb. 33: Abhängigkeit der Erythroblasten II (links) und der Proerythrozyten (rechts) von den verschiedenen CA-Konzentrationen.

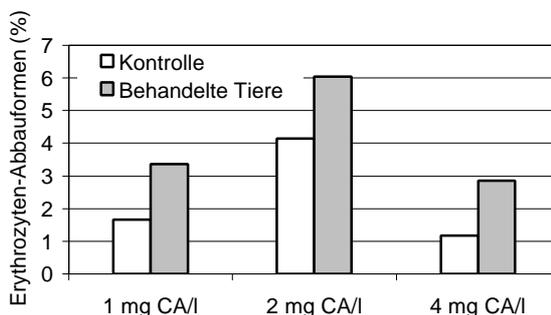
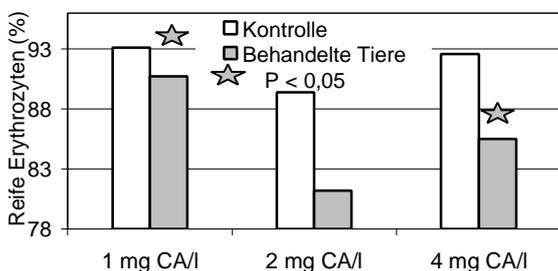


Abb. 34: Abhängigkeit der Reifen Erythrozyten (links) und Erythrozyten-Abbauformen (rechts) von den verschiedenen CA-Konzentrationen

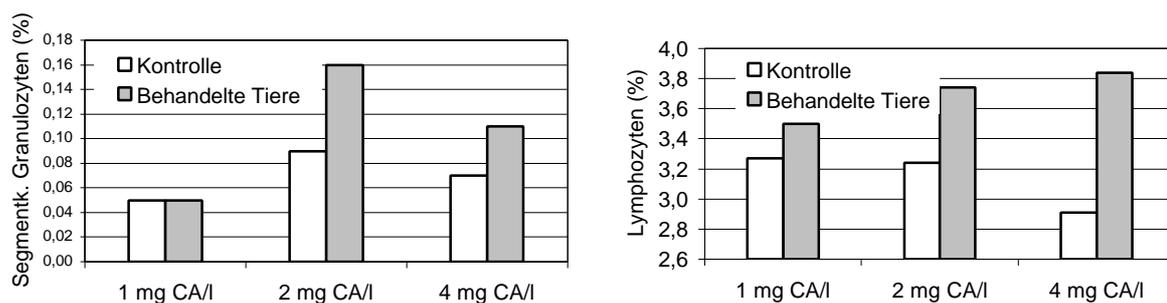


Abb. 35: Relative Anzahl segmentkerniger Granulozyten (links) und Lymphozyten (rechts) in den verschiedenen CA-Konzentrationen

3.7 Einfluss von 4 - Chloranilin auf die Konzentration der Aminosäuren im Plasma

Die Aminosäurenkonzentrationen (ASK) im Blutplasma sind, abgesehen von der Zusammensetzung aufgenommener Nahrung, von diversen biochemischen Prozessen abhängig. Es kann daher vermutet werden, dass Konzentrationen vieler Schadstoffe auch die Plasmakonzentrationen der Aminosäuren beeinflussen. Wie empfindlich reagiert das Plasma-Aminosäurenmuster auf die eingesetzten Chloranilin-Konzentrationen? Dies herauszufinden, war das Ziel nachstehender Untersuchung.

Die Aminosäurenkonzentrationen wurden mit Hilfe der OPA - Methode ermittelt. In den folgenden Tabellen sind auch die Werte der Aminosäuren Glutaminsäure und Citrullin enthalten, obwohl Glutaminsäure sich nicht bei allen Analysen sauber von Asparaginsäure trennen ließ. Fragliche Werte sind in den Tabellen mit (+) gekennzeichnet. Hinsichtlich Citrullin gab es keine Schwierigkeiten in der Analytik, jedoch konnte nicht in allen Fischen diese Aminosäure nachgewiesen werden. Die Konzentrationen waren sehr unregelmäßig. In den folgenden Diagrammen und Tabellen werden die Aminosäuren mit dem Drei-Buchstaben-Code wiedergegeben.

3.7.1 Wirkung von 1 mg CA/I auf die Konzentration der Aminosäuren im Plasma (Versuch 1)

Bei der ersten Untersuchung an im Herbst bezogenen Fischen wurden die Aminosäurenkonzentrationen lediglich nach Versuchsende bestimmt, da die Tiere durch die Blutentnahme nur einmal belastet werden sollten. Bei den höheren Konzentrationen, 2 und 4 mg CA/I, wurde auch vor Versuchsbeginn Blut entnommen.

Verhalten der Fische während der Versuchszeit:

Während der Zeit der Untersuchung verhielten sich die dem Schadstoff ausgesetzten Fische wie diejenigen der Kontrolle. Zu einer Nahrungsverweigerung kam es nicht. Farbveränderungen, oft ein Zei-

chen gestresster Fische, waren ebenfalls nicht zu erkennen. Auch das Schwimmverhalten war bei den belasteten Fischen nicht anders als bei den Kontrolltieren.

Nach Versuchsende gelang es bei den Kontrolltieren und exponierten Fischen nicht, jeweils aus zwei Tieren Blut zu entnehmen. Dadurch ergaben sich für jede Aminosäure nur acht Werte.

Die ASK der einzelnen Fische sind in Abb. 36a bis c wiedergegeben. Eine quantitative Auswertung der Daten erfolgte über die Differenz der Mittelwerte der Konzentrationen aus den Kontrolltieren und den belasteten Fischen. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 eingetragen. Ferner wurde eine statistische Auswertung der Einzelwerte mit Hilfe des U – Tests nach Mann-Whitney vorgenommen.

Zu einzelnen Aminosäuren: Ein Überblick über die Graphen lässt erkennen, dass die jeweiligen ASK der exponierten Tiere sich meist ungleichmäßiger voneinander unterschieden als diejenigen der Kontrollfische. Dies zeigen auch die meist höheren Standardabweichungen der Mittelwerte der ASK exponierter Tiere. Die Konzentrationen von ASP, GLN, GLY, ALA, VAL, MET, ILE und LEU unterschieden sich, jeweils insgesamt gesehen, nur wenig von denen der Kontrollfische. Die Mittelwertsdifferenzen sind weniger als 10% voneinander verschieden. Freilich ist mit solchen Abweichungen auch innerhalb der Kontrollgruppe zu rechnen, einerseits auf Grund der relativ geringen Reproduzierbarkeit der Aminosäureanalytik, die Varianzkoeffizienten zeigen dies an (Tab. 1), andererseits auch infolge biologischer Streuung. Größere Unterschiede lassen bereits die Graphen bei GLU, THR, HIS, ARG, TAU, TYR, PHE und LYS erkennen; meist zeigen diese auch die höheren prozentualen Unterschiede der Mittelwerte. Lediglich bei THR und PHE ergeben sich quantitativ kleinere Unterschiede zwischen den Gruppen, als man aus den Graphen schätzt. Der größte Unterschied ergab sich, wie auch im Graphen zu sehen, bei TYR. Hier ist eine Wirkung des Chloranilins zu vermuten. Die statistische Auswertung allerdings zeigte keine signifikanten Unterschiede der ASK zwischen den Gruppen, auch nicht bei Tyrosin.

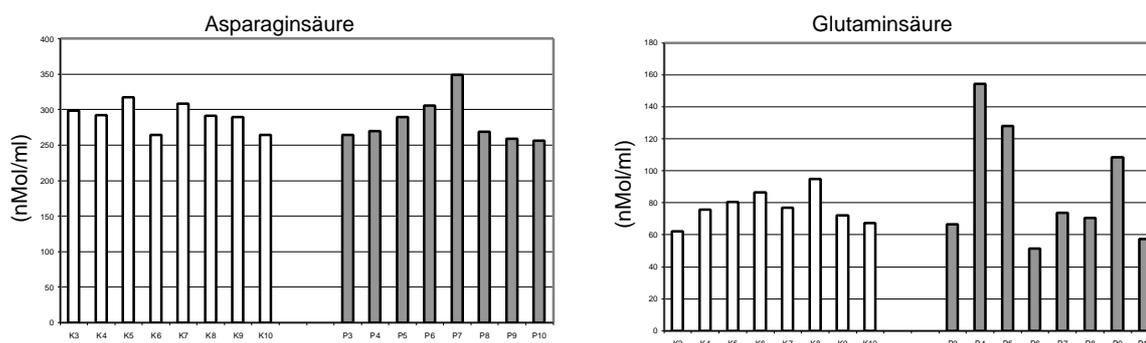


Abb. 36a: Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere nach Versuchsende (Versuch 1, 1 mg CA/l). Auf der Abszisse sind links die Konzentrationen der Kontrolltiere (K), rechts die der exponierten Tiere (P) aufgetragen. Die Konzentration ist in nMol/ml angegeben. Aus den Tieren K1, K2, P1 und P2 konnte kein Blut entnommen werden. Da für Citrullin zu wenig Messwerte vorlagen, wurde auf eine Darstellung verzichtet.

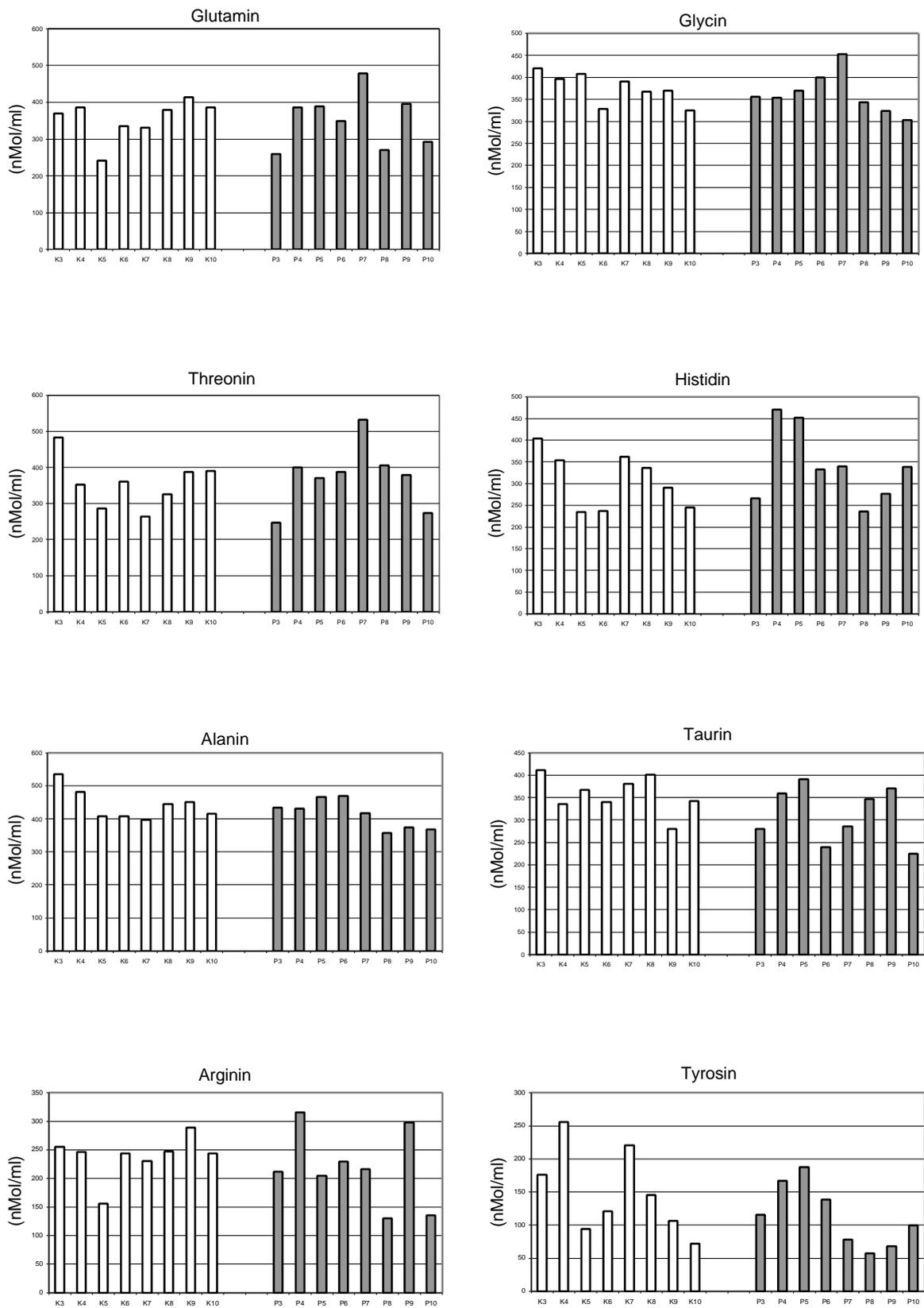


Abb. 36b: Text wie zu Abb. 36a

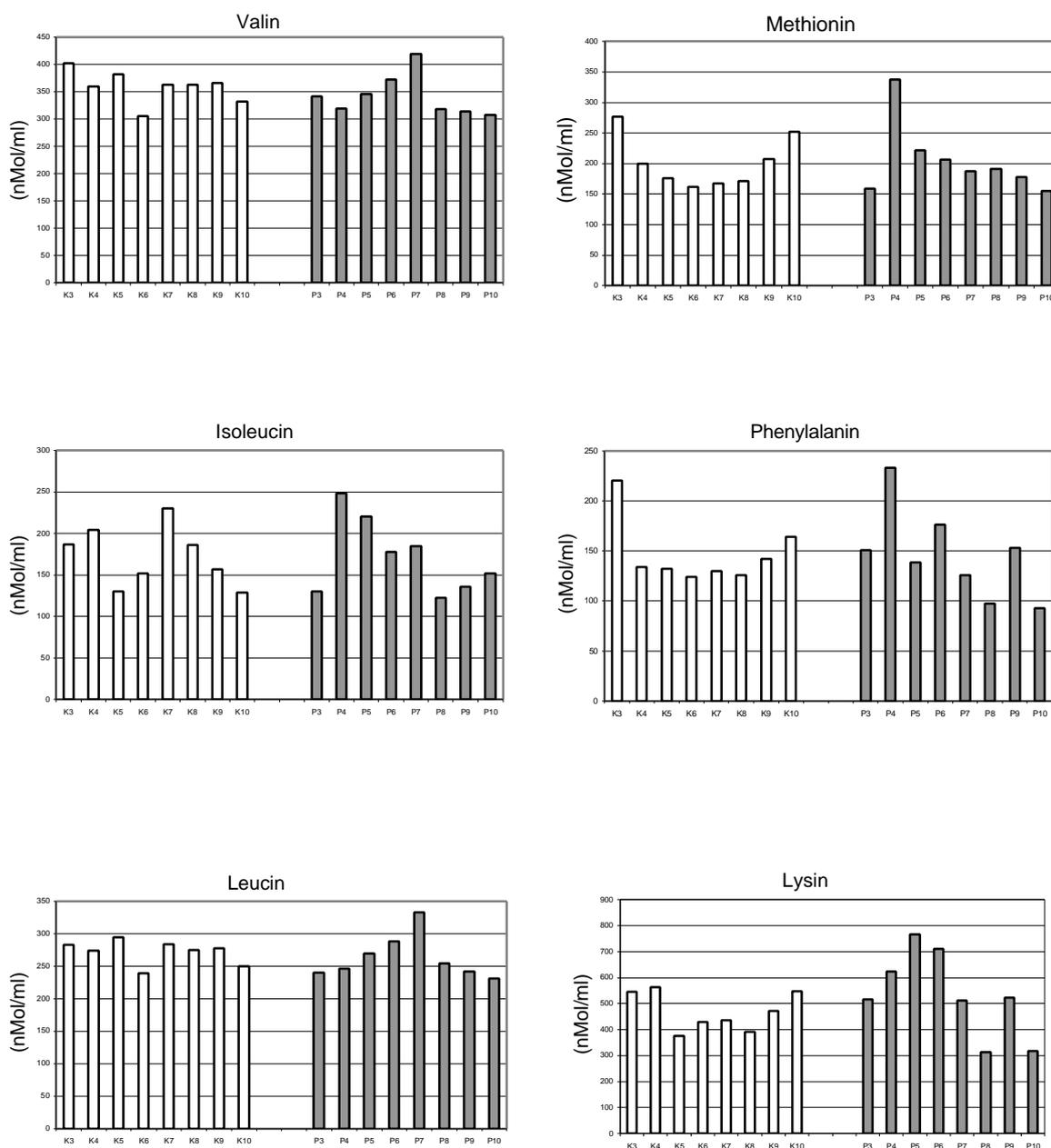


Abb. 36c: Text wie zu Abb. 36a (Versuch 1, 1 mg CA/l)

Abschließend sind in Abb. 37 die Mittelwerte der ASK von Kontrolltieren und exponierten Tieren dargestellt. Hieraus geht die Häufigkeitsverteilung der Aminosäuren im Plasma hervor. Die Konzentrationen waren in beiden Gruppen etwa gleich. Lysin wies mit 470 nMol/ml den höchsten Mittelwert auf, in abnehmender Konzentration bis zu einem Mittelwert von 300 nMol/ml folgten die Aminosäuren Alanin, Glycin, Valin, Taurin, Threonin, Glutamin und Histidin. Diese acht Aminosäuren repräsentieren 66 % der erfassten Aminosäuren.

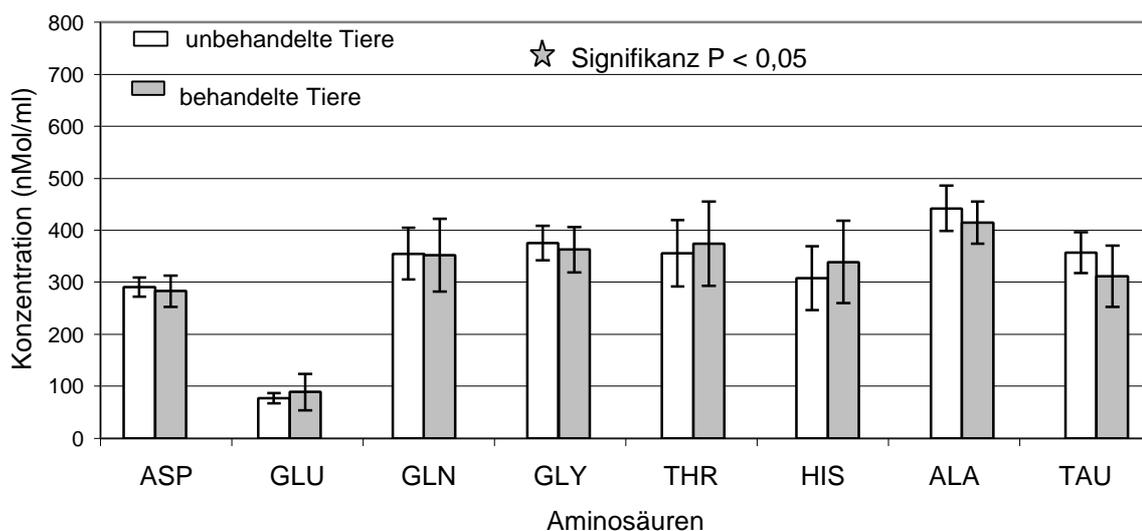


Abb. 37a: Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen von Kontrolle und exponierten Tieren nach Versuchsende (Versuch 1, 1 mg CAI). Für jeden Mittelwert ist die Standardabweichung eingezeichnet. Die Reihenfolge der Aminosäuren entspricht der Retentionszeit in der HPLC.

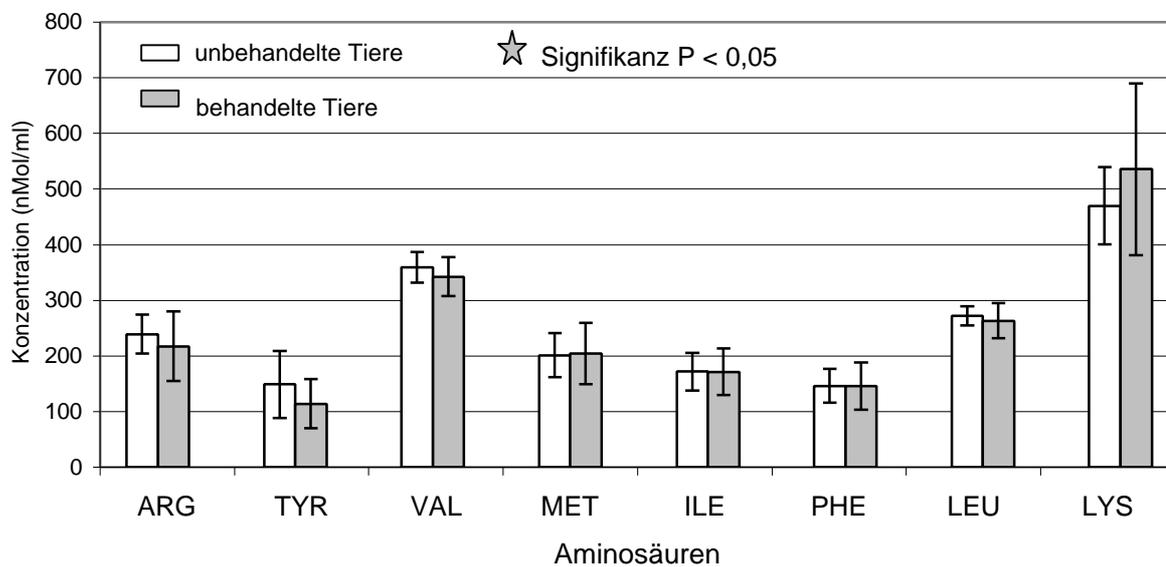


Abb. 37b: Text wie zu Abb. 37a.

Tab. 15: Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen bei unbehandelten nach der Kontrollzeit und behandelten Tieren nach der Schadstoffexposition (Versuch 1, 1 mg CAI, V_K ist der Variationskoeffizient des Mittelwertes. (-) bedeutet Abnahme, (+) Zunahme der Konzentration nach Versuchsende). Die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen der Kontrolltiere entsprechen 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure (Essential Amino Acid), V_K für Variationskoeffizient.

Aminosäure	Unbehandelte Tiere		Behandelte Tiere		Differenz zwischen den Mittelwerten		Signifikanz + $P < / = 0,05$ - $P > / = 0,05$
	Mittelwerte (nMol/ml)	V_K	Mittelwerte (nMol/ml)	V_K	(nMol/ml)	(%)	
ASP	291	6	283	10	8	- 3	-
GLU (+)	77	13	89	39	12	+ 13	-
GLN	355	14	352	20	3	- 1	-
GLY	375	9	363	12	13	- 3	-
THR EAA	356	18	375	22	19	+ 5	-
HIS EAA	308	20	339	23	31	+ 9	-
ALA	442	10	415	10	28	- 6	-
TAU	357	11	312	19	45	- 13	-
ARG EAA	239	15	218	28	23	- 9	-
TYR	149	40	114	39	35	- 24	-
VAL EAA	359	8	342	10	17	- 5	-
MET EAA	201	20	205	27	4	+ 2	-
ILE EAA	172	20	172	24	0	0	-
PHE EAA	147	20	146	29	1	- 1	-
LEU EAA	272	6	263	12	9	- 3	-
LYS EAA	470	15	536	29	66	+ 12	-
Summe der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen	4570		4524		46	- 1	

3.7.2 Wirkung von 2 mg CAI auf die Konzentration der Aminosäuren im Plasma (Versuch 2)

Die Mitte Januar vom Züchter bezogenen Fische waren ca. 15 Monate alt und hatten ein Durchschnittsgewicht von 77 g, sie waren 5 Monate älter als die Tiere des ersten Versuchs. Ihre Wachstumsphase war nicht mehr so stark wie die der jüngeren Tiere des ersten Versuchs, wie aus der geringeren Gewichtszunahme hervorgeht. Die als Kontrolltiere und zur Schadstoffbehandlung vorgesehenen Fische wiesen äußerlich keine Unterschiede auf. Die Farbe der Schleimhaut und das Schwimmverhalten waren gleich in beiden Gruppen.

3.7.2.1 Aminosäuren-Konzentrationen vor Versuchsbeginn

Vor Versuchsbeginn gelang es nicht, aus den zur Behandlung vorgesehenen Tieren P9 und P10 Blut zu entnehmen. Von der Aminosäure GLU konnten in dieser Gruppe mit der HPLC nur sechs Werte, bei den zur Kontrolle vorgesehenen Tieren nur neun Werte ermittelt werden, da zwischen Asparaginsäure und Glutaminsäure keine vollständige Trennung erfolgte. Keine CIT- Werte gab es für das Kontrolltier K5 und für die zu behandelnden Fische P3 und P4. Die Auswertung der Daten erfolgte wie in Versuch 1 beschrieben.

Die ASK der Forellen sind in den Abb. 38a-c wiedergegeben, die Mittelwerte und deren Differenzen in Tab. 16; in Abb. 39 und 40 sind die Mittelwerte graphisch dargestellt, woraus sich die Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäuren im Plasma erkennen lässt.

Die jeweiligen ASK der Forellen beider Gruppen sind, verglichen mit denjenigen aus Versuch 1, unregelmäßiger, besonders bei GLU, THR, HIS, ALA, TAU, ARG, ILE, LEU und LYS. Die größeren Abweichungen der Mittelwerte bei GLU sind, wie aus Abb. 38a deutlich hervorgeht, zurückzuführen auf die relativ geringen Konzentrationen der Aminosäure dreier Tiere in der zu exponierenden Gruppe, deren Werte den Mittelwert zu 50% beeinflussen. Citrullin kann in die Betrachtung nicht einbezogen werden, da diese Aminosäure auch hier nicht bei allen Tieren nachzuweisen war. Bezüglich Taurin zeichnete sich die Hälfte der Fische der für die spätere Exposition in Chloranilin bestimmten Gruppe durch niedere Werte aus und verursacht somit eine hohe Mittelwertdifferenz. Bei Isoleucin wies jeweils eine Hälfte der Kontrolltiere niedere, die andere hohe Werte auf, wie diese in etwa den Konzentrationen von fünf Fischen der zur Exposition in CA bestimmten Gruppe entsprachen. Hinsichtlich Phenylalanin enthielt das Plasma zweier Fische der zu exponierenden Gruppe höhere Konzentrationen, als sie im Mittel der Werte aller anderen Fische entsprachen. Bei Lysin waren es vier Tiere, ebenfalls aus der zu exponierenden Gruppe, die höhere Konzentrationen als die Plasmen der Fische der Kontrollgruppe aufwiesen. Insgesamt zeigt die Tabelle, dass meistens die Mittelwerte der ASK der für die Exposition bestimmten Gruppe höher lagen.

Die statistische Auswertung dieser Werte mit dem U – Test (Mann- Whitney, $P < 0,05$) ergab keine signifikanten Unterschiede der ASK zwischen beiden Gruppen.

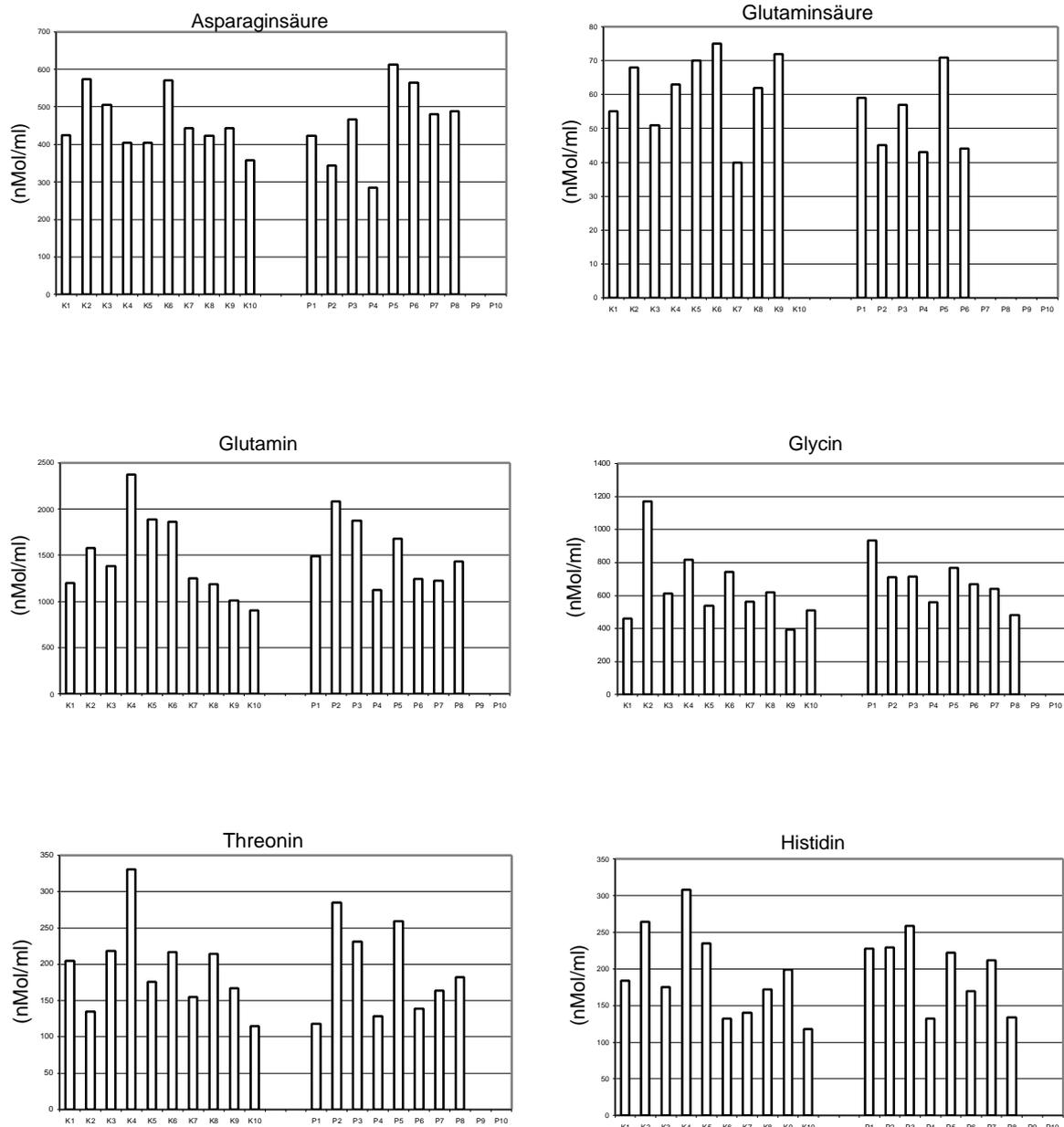


Abb. 38a: Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere vor Versuchsbeginn (Versuch 2, 2 mg CA/l). Links stehen die Werte der zur Kontrolle vorgesehenen Tiere (= K), rechts die Werte der zu behandelnden Tiere (Probestiere = P). Aus den Tieren P 9 und P10 konnte kein Blut entnommen werden. Bei den anderen Tieren, wie z.B. K10 und P7 / P8 bei der Glutaminsäure, wurde keine Konzentrationsangabe mit der HPLC für diese Aminosäure gemessen. In den Graphen sind die Säulen der Kontrolltiere und der zur Exposition vorgesehenen Tiere in gleicher Weise dargestellt, da die Fische beider Gruppen unbehandelt sind.

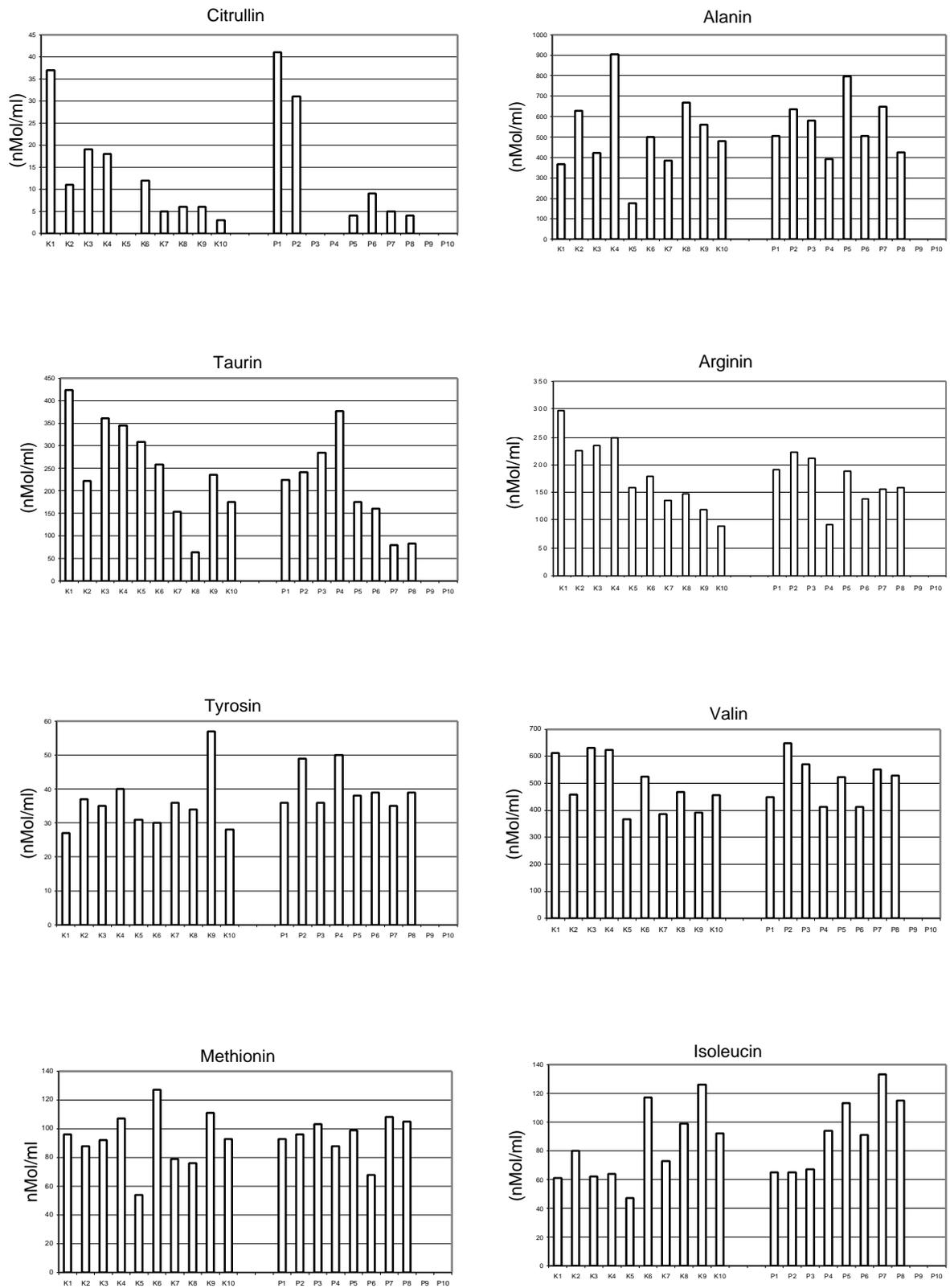


Abb. 38b: Text wie zu Abb. 38a

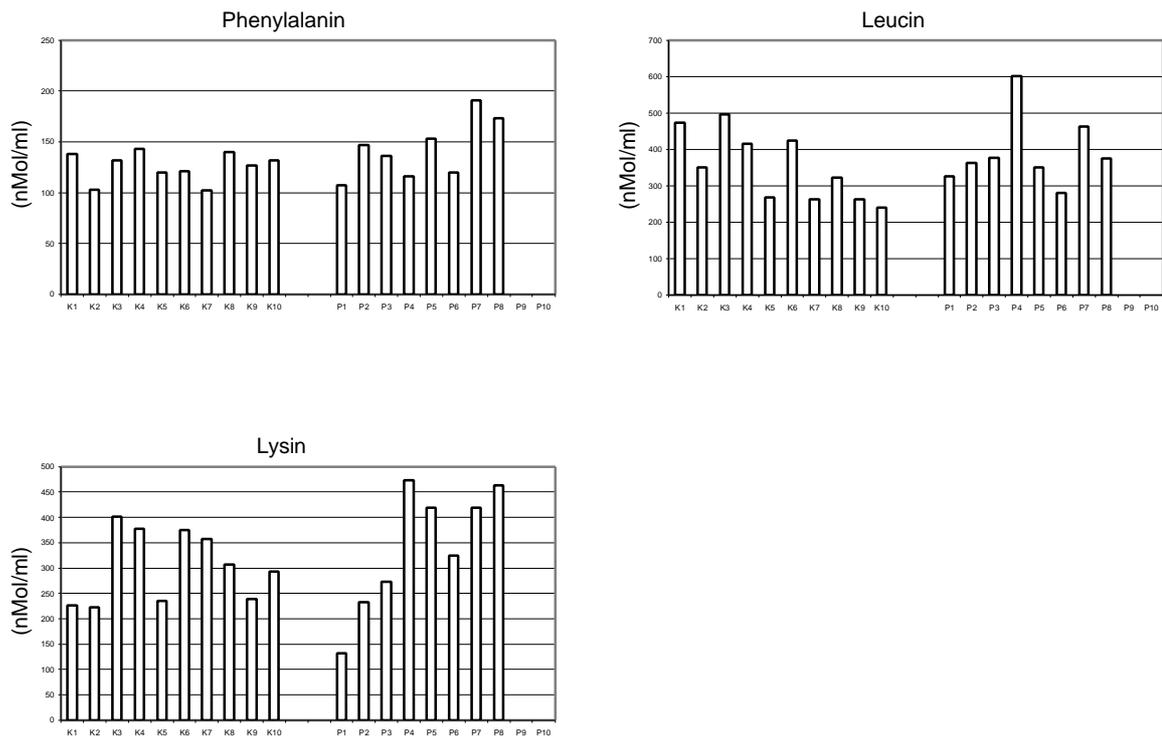


Abb. 38c: Text wie bei Abb. 38a (Versuch 2, 2 mg CA/l)

In den Abbildungen 39 und 40 werden die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen, getrennt in die beiden Versuchsgruppen Kontrolltiere und zu behandelnde Tiere, wiedergegeben, damit die schon vor der Exposition vorhandenen geringen Unterschiede sichtbar werden. Sechs Aminosäuren – Glutamin, Glycin, Alanin, Valin, Lysin und Leucin – repräsentieren mit rund 70 % den Hauptanteil der freien Aminosäuren im Plasma. Die genannte Reihenfolge entspricht ihrer prozentualen Verteilung.

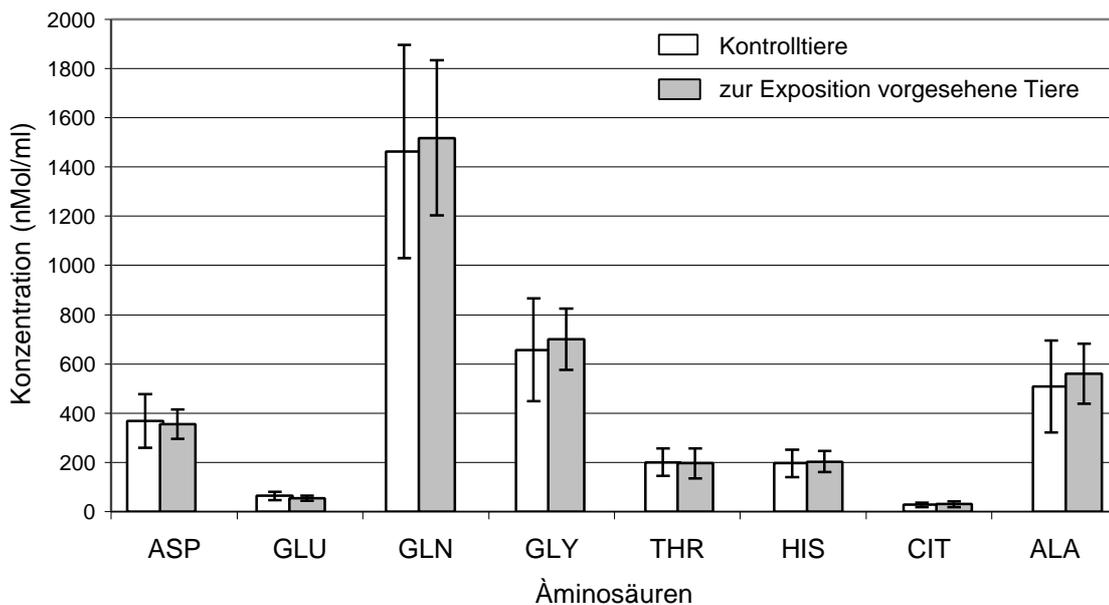


Abb. 39: Die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen (ASP-ALA) der für die Kontrolle und der für die Exposition vorgesehenen Tiere werden mit den Standardabweichungen wiedergegeben (Versuch 2, 2 mg CA/l).

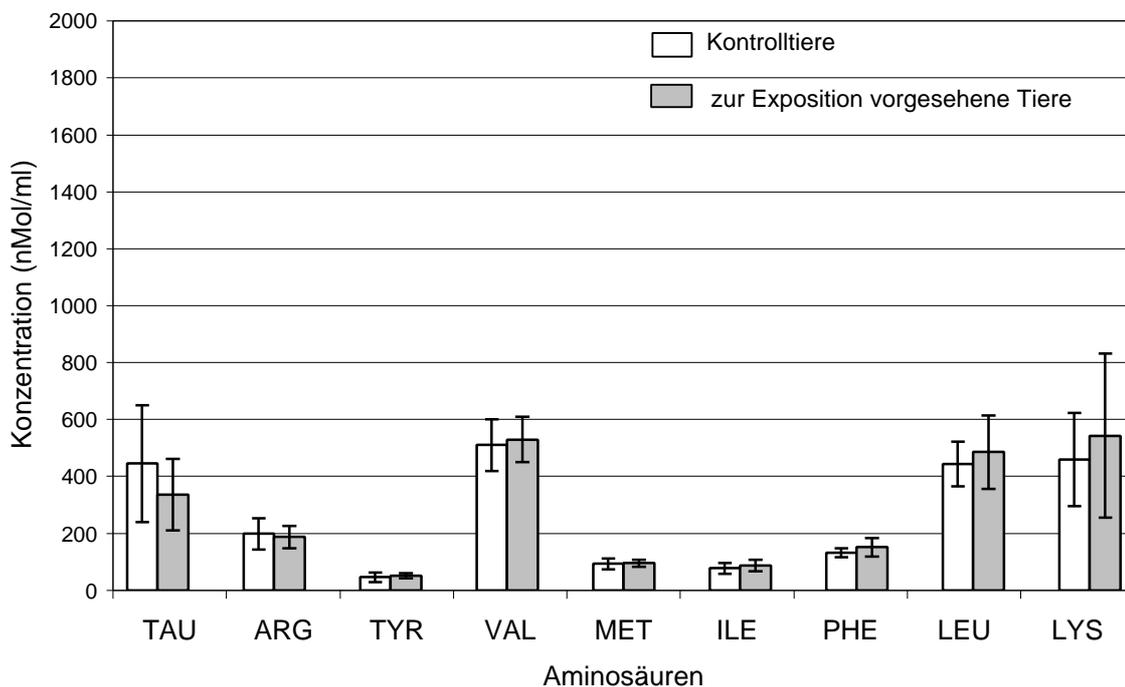


Abb. 40: Die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen (TAU-LYS) der für die Kontrolle und der für die Exposition vorgesehenen Tiere werden mit den Standardabweichungen wiedergegeben (Versuch 2, 2 mg CA/l).

Zur Ergänzung der Abb. 39 und 40 sind in Tabelle 16 die Mittelwerte der Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren von den zur Kontrolle und zur Exposition vorgesehenen Tieren gegenübergestellt.

Tab. 16: Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen bei den Kontrolltieren und zu behandelnden Tieren vor der Schadstoffexposition (Versuch 2, 2 mg CA/l, (-) bedeutet geringere, (+) größere Konzentration bei den zu behandelnden Tieren). Die Mittelwerte der ASK der Kontrolltiere entsprechen 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure (Essential Amino Acid), V_K für Variationskoeffizient.

Aminosäure	Kontrolltiere		Zu behandelnde Tiere		Differenz zwischen den Mittelwerten		Signifikanz + $P < / = 0,05$ - $P > / = 0,05$
	Mittelwerte (nMol/ml)	V_K	Mittelwerte (nMol/ml)	V_K	(nMol/ml)	(%)	
ASP	369	30	354	17	15	- 4	-
GLU (+)	63	26	54	19	9	- 14	-
GLN	1464	30	1519	21	55	+ 4	-
GLY	657	32	701	18	44	+ 6	-
THR EAA	200	28	196	31	4	- 2	-
HIS EAA	196	29	202	21	6	+ 3	-
CIT	27	33	30	41	3	+ 10	-
ALA	508	37	560	22	52	+ 9	-
TAU	445	46	336	37	109	- 25	-
ARG EAA	198	27	187	21	11	- 6	-
TYR	46	37	51	20	5	+ 10	-
VAL EAA	510	18	530	15	20	+ 4	-
MET EAA	93	20	95	13	2	+ 2	-
ILE EAA	77	26	87	23	10	+ 12	-
PHE EAA	132	11	151	22	19	+ 13	-
LEU EAA	444	18	486	27	42	+ 9	-
LYS EAA	459	36	543	53	84	+ 16	-

Größere Unterschiede der Mittelwerte der ASK zwischen den zur Kontrolle vorgesehenen und zu behandelnden Fischen traten auf bei den Aminosäuren GLU, TAU, ILE, PHE und LYS. Die größte Differenz zwischen den Mittelwerten der ASK lag bei der Aminosäure Taurin vor.

3.7.2.2 Nach der Exposition in 2 mg CA/l

Verhalten der Fische während der Versuchszeit:

Bis zum Versuchsende gab es zwischen den Kontrolltieren und den behandelten Tieren keine äußerlich bemerkbaren Veränderungen im Aussehen. Bei drei exponierten Tieren war eine Verhaltensänderung eingetreten: Tier P5 fraß ab dem 4. Expositionstag immer weniger, die Fische P4 und P9 verweigerten die Nahrungsaufnahme ab dem 12. Tag. Die Fische P4 und P5 widerstanden der CA - Belastung bis zum Versuchsende, Tier P9 verstarb vorzeitig am 23. Expositionstag. Aus dem exponierten Tier P10 gelang es am Versuchsende nicht, Blut zu entnehmen. Dadurch konnten für die quantitative

Auswertung der Daten nur acht Werte aus der behandelten Gruppe und zehn Werte aus der Kontrollgruppe eingesetzt werden.

Zu den einzelnen Aminosäuren: Die Einzelkonzentrationen bei den Kontrolltieren waren bei 13 Aminosäuren (ASP, GLN, GLY, THR, HIS, CIT, ALA, ARG, TYR, VAL, MET, PHE und LEU) sehr unterschiedlich. Relativ gleich große Einzelkonzentrationen gab es bei drei Aminosäuren (GLU, TAU und LYS). Bei den behandelten Tieren hatten die drei Nahrungsverweigerer meist geringere Werte der Einzelkonzentrationen als die Normalfresser (ASP, GLU, GLN, THR, HIS, ALA, TAU, ARG, TYR, VAL, MET, ILE, PHE, LEU und LYS). Bei einem Überblick über die Graphen erkennt man, dass die behandelten Tiere überwiegend eine Abnahme ihrer ASK aufwiesen, besonders bei folgenden Aminosäuren: ASP, THR, ALA, TAU, VAL, PHE, LEU und LYS.

Zur Wiedergabe dieser Unterschiede dienen die Abbildungen 41a-c.

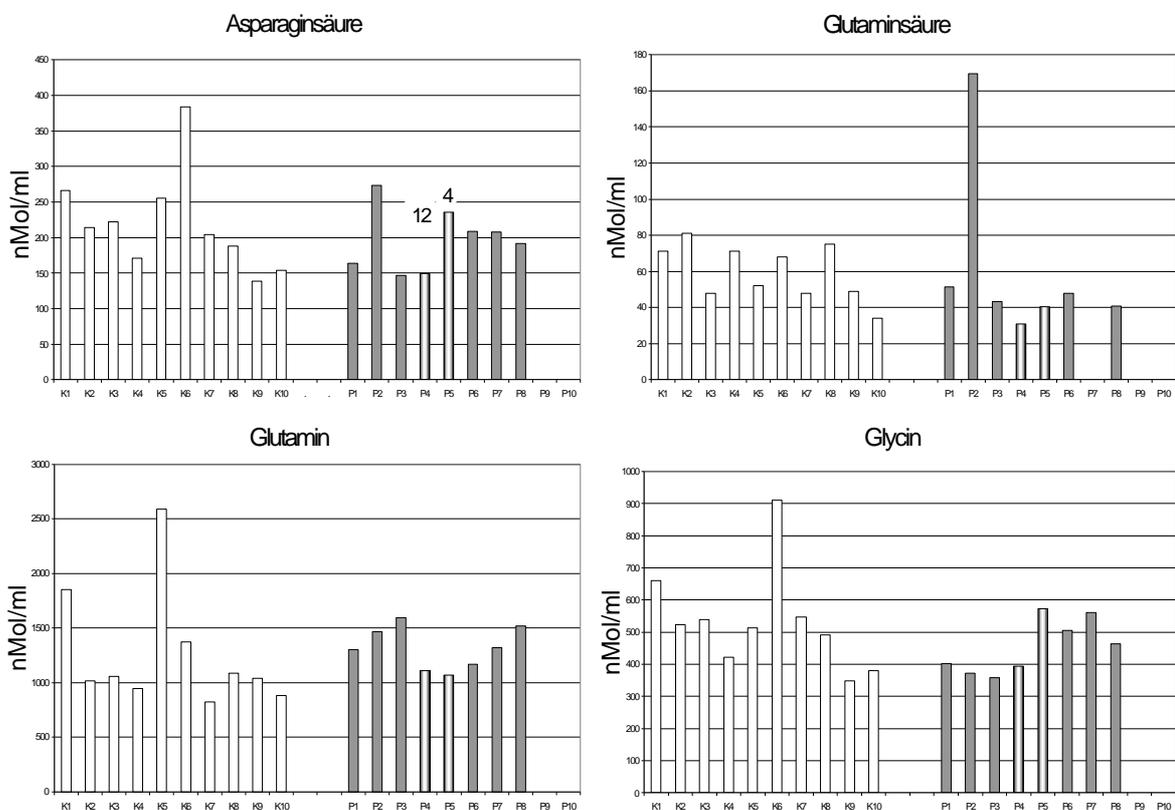


Abb. 41a: Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere nach vierwöchiger Versuchsdauer (Versuch 2, 2 mg CA/l). Links stehen die Konzentrationen der Kontrolle (K, weiße Säulen), rechts die der behandelten Tiere (P, graue Säulen). Die schattiert gekennzeichneten Säulen (rechts) geben die Konzentrationen der Tiere an, die nach den darüberstehenden Expositionstagen nur ein Drittel – oder noch weniger – des angebotenen Futters aufnehmen. Diese Zeitangabe ist nur bei der Aminosäure Asparaginsäure eingezeichnet, sie gilt jedoch auch für dieselben Tiere bei sämtlichen anderen Aminosäuren.

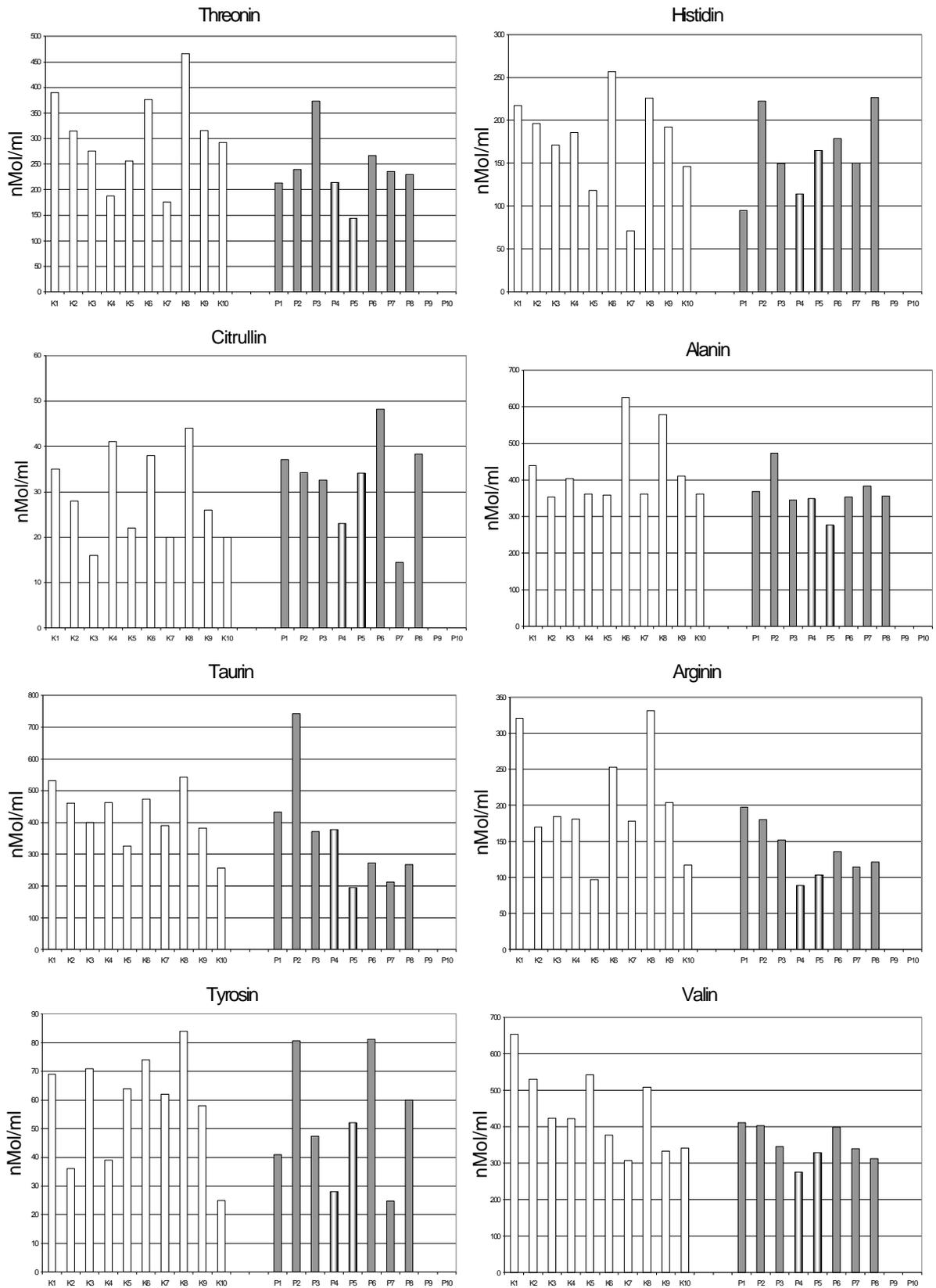


Abb. 41b: Text wie zu 41a

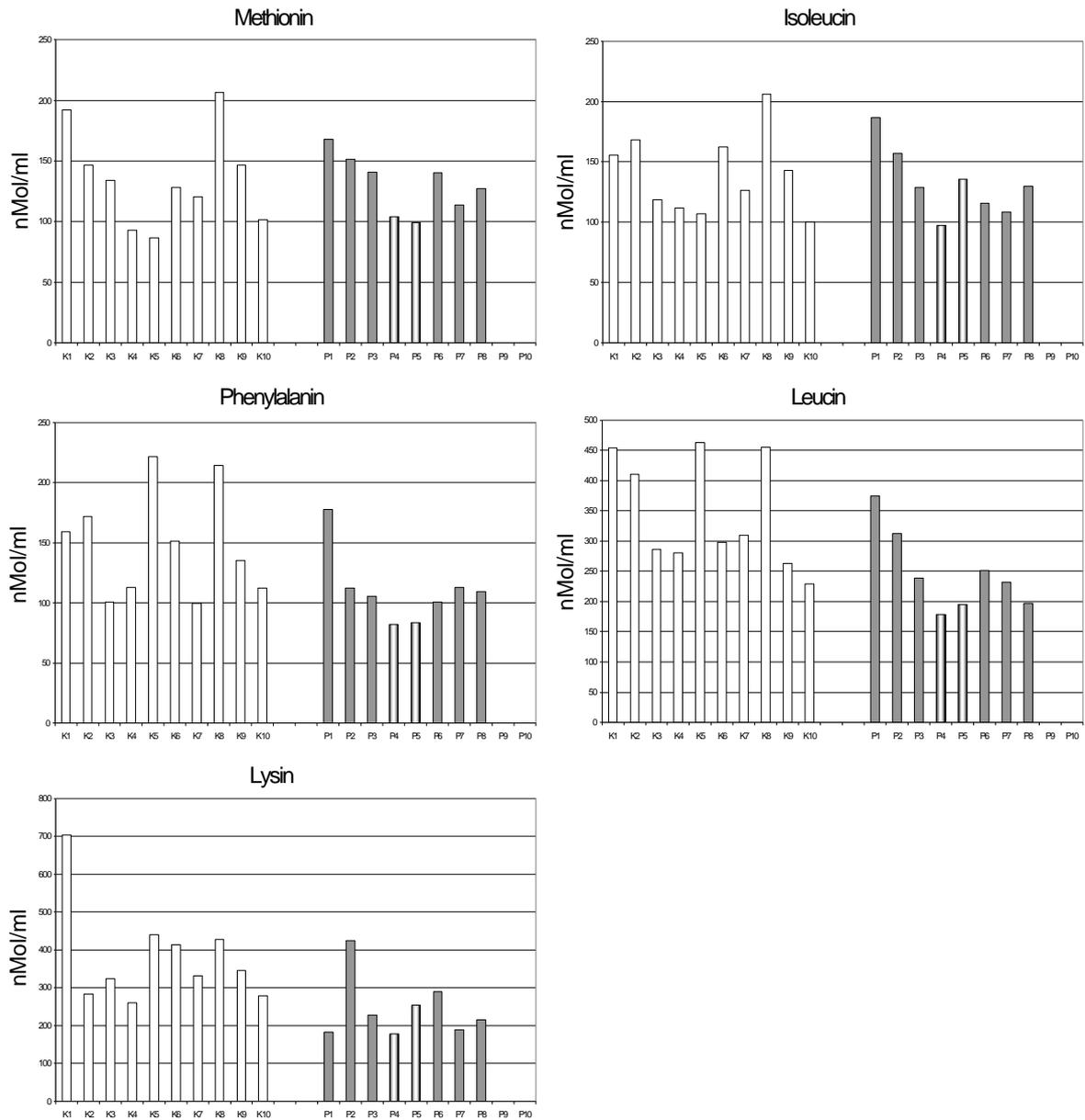


Abb. 41c: Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere nach vierwöchiger Versuchsdauer (Versuch 2, 2 mg CA/l, Text wie zu Abb. 41a)

Abb. 42a / b und Tabelle 17 geben die am Versuchsende erhaltenen Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen der Kontrolltiere und der behandelten Tiere wieder.

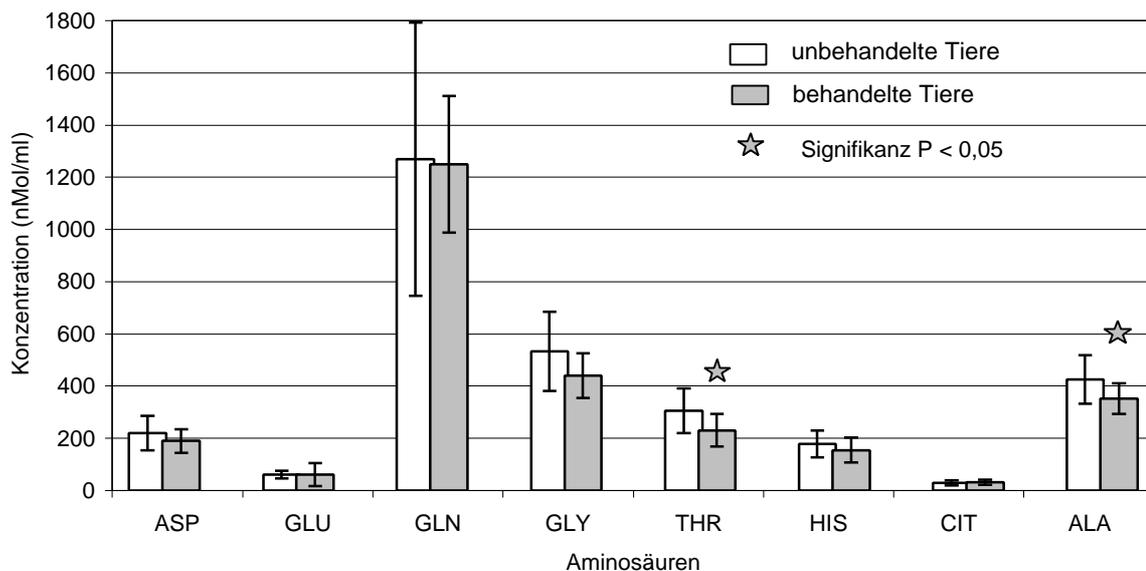


Abb. 42a: Vergleich der Mittelwerte der ASK von Kontrolle und behandelten Tieren nach einer vierwöchigen Schadstoffexposition in 2 mg CA/I (Versuch 2, 2 mg CA/I)

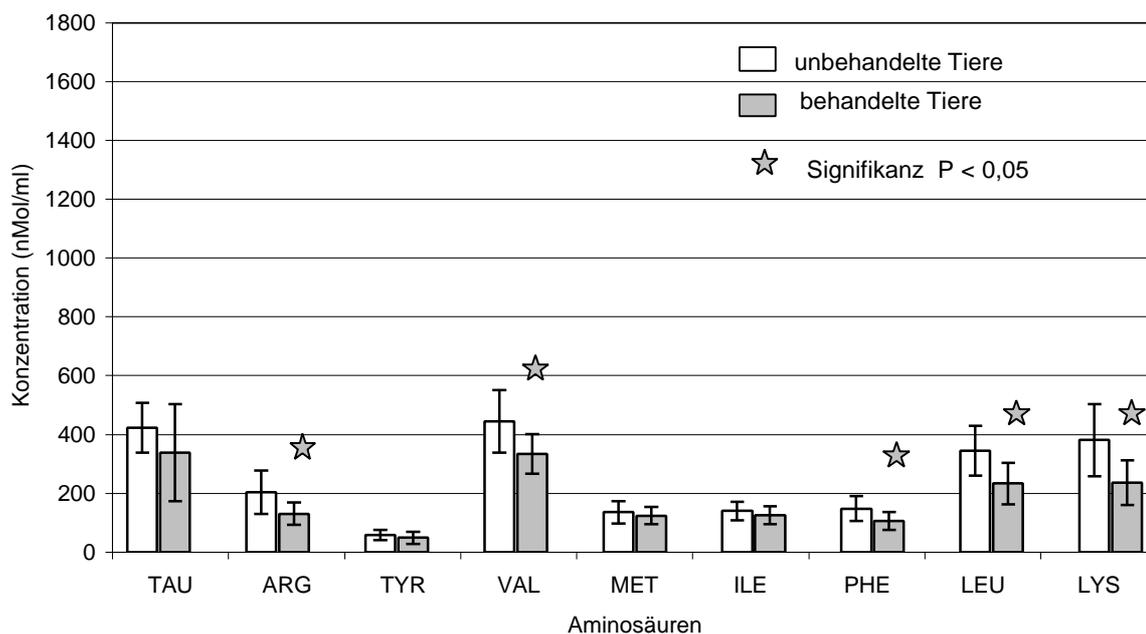


Abb. 42b: Vergleich der Mittelwerte der ASK von Kontrolle und behandelten Tieren nach einer vierwöchigen Schadstoffexposition in 2 mg CA/I (Versuch 2, 2 mg CA/I)

Bemerkenswert ist, dass die Verteilung der Häufigkeiten der Aminosäuren die gleiche war wie zu Versuchsbeginn (Abb. 39 u. 40). Die Aminosäuren, bei denen nach vier Wochen signifikante Unterschiede in den Mittelwerten der Endkonzentrationen zwischen unbehandelten und behandelten Tieren auftraten, sind in den Abb. 42a und b mit einem Stern gekennzeichnet.

Nach der Schadstoffexposition waren die Mittelwerte der Konzentrationen von Threonin, Alanin, Arginin, Valin, Phenylalanin, Leucin und Lysin signifikant unterschieden (Tab. 17). 15 der 17 erfassten Aminosäuren waren nach der Behandlung in geringerer Konzentration vorhanden als diejenigen in der Kontrollgruppe. Große Konzentrationsunterschiede von mehr als 15% zwischen den beiden Gruppen ergaben sich für Glycin, Taurin und Tyrosin; nach statistischer Überprüfung erwiesen sich diese Differenzen aber nicht als signifikant.

Tab. 17: Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen bei unbehandelten nach der Kontrollzeit und behandelten Tieren nach der Schadstoffexposition (Versuch 2, 2 mg CA/l, (-) bedeutet Abnahme, (+) Zunahme der Konzentration behandelter Tiere nach Versuchsende). Die Mittelwerte der ASK der Kontrolltiere entsprechen 100%. EAA steht für essentielle Aminosäure (Essential Amino Acid), V_K für Variationskoeffizient.

Aminosäure	Kontrolltiere		Behandelte Tiere		Differenz zwischen den Mittelwerten		Signifikanz + P < / = 0,05 - P > / = 0,05
	Mittelwerte (nMol/ml)	V_K	Mittelwerte (nMol/ml)	V_K	(nMol/ml)	(%)	
ASP	220	30	189	24	- 31	- 14	-
GLU (+)	60	100	61	74	+ 1	+ 2	-
GLN	1269	41	1250	21	- 19	- 2	-
GLY	533	29	439	19	- 94	- 18	-
THR EAA	305	28	230	27	- 75	- 25	+
HIS EAA	178	29	155	30	- 23	- 13	-
CIT	29	31	31	32	+ 2	+ 7	-
ALA	426	22	352	16	- 74	- 17	+
TAU	423	20	338	49	- 85	- 20	-
ARG EAA	204	36	131	28	- 73	- 36	+
TYR	58	31	49	43	- 9	- 16	-
VAL EAA	444	24	334	20	- 110	- 25	+
MET EAA	136	28	124	23	- 12	- 9	-
ILE EAA	140	23	126	24	- 14	- 10	-
PHE EAA	148	28	105	19	- 43	- 29	+
LEU EAA	345	25	233	30	- 112	- 33	+
LYS EAA	381	32	236	33	- 145	- 38	+
Summe der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen	5299		4383		916	- 17	

Alle neun essentiellen Aminosäuren wiesen bei den behandelten Fischen Abnahmen des Mittelwertes der Konzentrationen auf, bei sechs der neun Aminosäuren ergaben sich signifikante Unterschiede (U – Test, Mann-Whitney, P < 0,05) zu den unbehandelten Tieren.

Die Abnahmen der ASK-Mittelwerte bei den exponierten Fischen können auf mindestens drei verschiedene Ursachen zurückgeführt werden:

- Wirkung des Schadstoffs auf den Metabolismus,
- Wirkung der Jahreszeit,
- Auswirkung der drei Nahrungsverweigerer auf die Mittelwerte der untersuchten Parameter.

Von besonderem Interesse ist die Frage, in welchem Maße die ASK der Nahrungsverweigerer die Mittelwerte beeinflusste.

3.7.2.3 Vergleich der Aminosäuren-Konzentrationen von exponierten Normalfressern bzw. Nahrungsverweigerern

In Tabelle 18 werden die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen der beiden Nahrungsverweigerer mit denen der sechs restlichen Tieren verglichen. Die kleine Zahl der Nahrungsverweigerer (3) ließ allerdings keine Berechnung auf signifikante Unterschiede zu.

Tab. 18: Vergleich der Mittelwerte der ASK zwischen Normalfressern (sechs Tiere) und Nahrungsverweigerern (zwei Tiere, Versuch 2, 2 mg CA/l). Die Mittelwerte der Normalfresser entsprechen 100%. EAA steht für essentielle Aminosäuren.

Aminosäure <small>EAA = essentielle Aminosäuren</small>	Normalfresser Mittelwerte (nMol/ml)	Nahrungsverweigerer Mittelwerte (nMol/ml)	Differenz der Mittelwerte	
			(nMol/ml)	(%)
ASP	199	171	28	- 14
GLU (+)	59	36	23	- 39
GLN	649	328	321	- 49
GLY	444	430	14	- 3
THR EAA	259	172	87	- 34
HIS EAA	170	123	47	- 28
CIT	34	25	9	- 26
ALA	380	295	85	- 22
TAU	383	249	134	- 35
ARG EAA	150	92	58	- 39
TYR	56	35	21	- 38
VAL EAA	369	264	105	-28
MET EAA	140	90	50	- 36
ILE EAA	138	104	34	- 25
PHE EAA	120	77	43	- 36
LEU EAA	268	164	104	- 39
LYS EAA	255	199	56	- 22
Summe der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen	4820	3470	1350	- 28

Die Mittelwerte der Konzentrationen aller Aminosäuren sind bei den beiden Nahrungsverweigerern deutlich geringer als die Werte der sechs Normalfresser; die Gesamtkonzentration dieser Aminosäuren ist um 28 % geringer. Die größten Abnahmen wiesen die Aminosäuren Glutamin (49 %), Glutaminsäure, Arginin und Leucin mit je 39 % auf. Die Abnahme der Konzentrationen kann nicht in einem Zusammenhang gesehen werden mit ihrer Eigenschaft als essentiell oder nichtessentiell. Von Bedeutung ist hier, dass fast alle Aminosäuren-Konzentrationen bei den Nahrungsverweigerern abnahmen. Nur die Konzentration der Aminosäure Glycin erhöhte sich bei den Nahrungsverweigerern um 9 %. Da die Werte der Nahrungsverweigerer die Mittelwerte der exponierten Tiere wesentlich geringer erscheinen ließen, werden in Tab. 19 die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen und deren Differenzen von Kontrolltieren und Normalfressern miteinander verglichen.

Tab. 19: Vergleich der Mittelwerte der ASK von Kontrolle und Normalfressern. Der Mittelwert der Kontrolltiere entspricht 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure (Versuch 2, 2 mg CA/l).

Aminosäure <small>EAA = essentielle Aminosäuren</small>	Kontrolltiere Mittelwerte (nMol/ml)	Normalfresser Mittelwerte (nMol/ml)	Differenz der Mittelwerte	
			(nMol/ml)	(%)
ASP	220	199	21	- 10
GLU (+)	60	59	1	- 2
GLN	1269	649	620	- 49
GLY	533	444	89	- 17
THR EAA	305	259	46	- 15
HIS EAA	178	170	8	- 4
CIT	29	34	5	+ 7
ALA	426	380	46	- 11
TAU	423	383	40	- 9
ARG EAA	204	150	54	- 26
TYR	58	56	2	- 3
VAL EAA	444	369	75	- 17
MET EAA	136	140	4	+ 3
ILE EAA	140	138	2	- 1
PHE EAA	148	120	28	- 19
LEU EAA	345	268	77	- 22
LYS EAA	381	255	126	- 33
Summe der Mittel- werte der Aminosäu- ren-Konzentrationen	5299	4073	1226	- 23

Die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen von 15 der 17 Aminosäuren nahmen ab; die von Citrullin und Methionin nahmen geringfügig zu. Die Abnahme betraf sowohl die essentiellen wie auch die nichtessentiellen Aminosäuren. Hervorzuheben ist die große Abnahme der nichtessentiellen Aminosäure Glutamin. Auch unter Beachtung der analytisch bedingten größeren Variationskoeffizienten

für die einzelnen Aminosäuren kann hier ein Effekt des Schadstoffs auf den Metabolismus der Aminosäuren der Fische erkannt werden.

3.7.2.4 Vergleich der Differenzen der Mittelwert Differenzen der As-Konzentrationen zwischen Versuchsende und – beginn

In den Versuchen 2 (2 mg CA/I) und 3 (4 mg CA/I) wurden die Aminosäuren-Konzentrationen vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende gemessen. Die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen vor Versuchsbeginn wurden jeweils zwischen den zur Kontrolle und den zur Exposition vorgesehenen Tieren miteinander auf signifikante Unterschiede geprüft. Diese Überprüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte auch mit den Mittelwerten der einzelnen Aminosäuren-Konzentrationen am Versuchsende mit dem t-Test (Methode 1). Die Ergebnisse wurden bereits beschrieben. Nun kam der Gedanke auf – um eine Art doppelte Absicherung zu erhalten – die Mittelwerte der Differenzen von End- und Anfangskonzentration jeder Aminosäure zwischen den beiden Gruppen miteinander zu vergleichen (Methode 2), obwohl innerhalb der Versuchsdauer die Forellen verschiedenen individuellen Reizsituationen und Stoffwechselreaktionen ausgesetzt waren, die nicht beobachtbar waren. Im Sinne eines zusätzlichen Vergleichs wurden diese Daten ausgewertet. Die Signifikanz der Differenz der Mittelwert-Differenzen wurde mit dem Wilcoxon - Paardifferenzen - Test berechnet.

Untersucht man nun die Veränderungen der Mittelwerte der einzelnen Aminosäuren im Paardifferenzvergleich, so ändert sich das Bild (Tab. 20, Abb. 43). Hiermit ist nur für Phenylalanin eine signifikante Veränderung der Anfangs- und Endwerte des Versuches zwischen den Kontrollen und behandelten Tieren festzustellen.

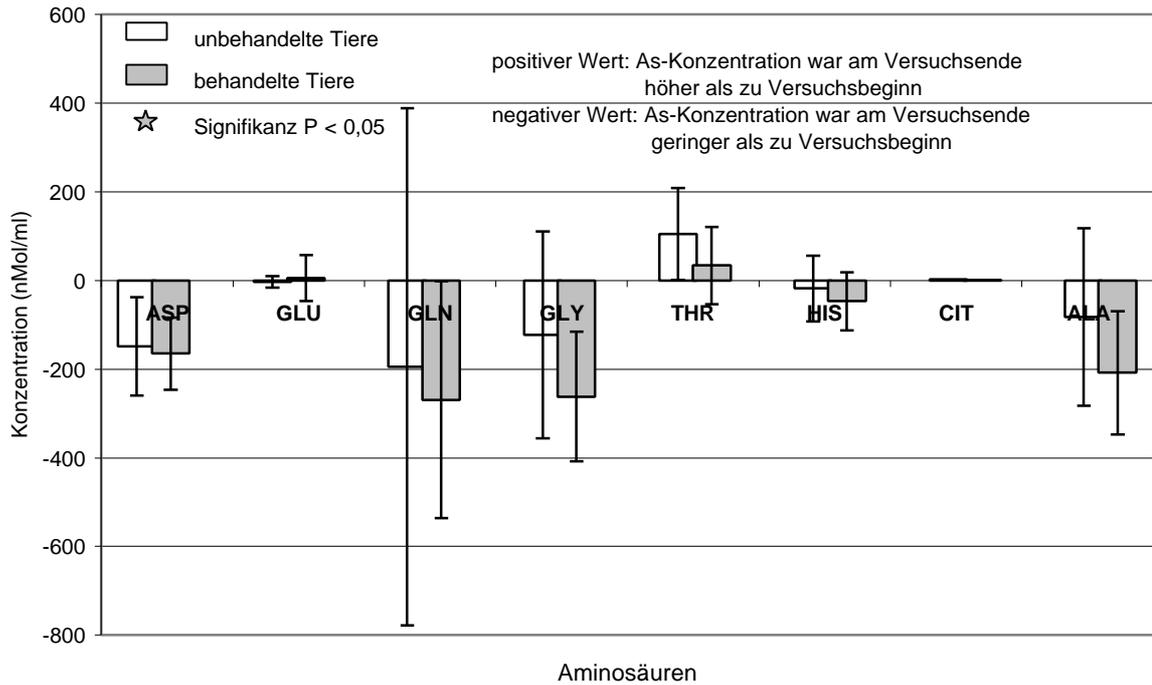


Abb. 43a: Die Differenzen der Mittelwert-Differenzen der Aminosäuren-Konzentrationen zwischen Versuchsende und -start von unbehandelten und behandelten Tieren werden miteinander verglichen. Die Werte von Citrullin waren zu gering (bei den Kontrolltieren 2, bei den behandelten Tieren 1 nMol/ml), um hier noch abgebildet werden zu können (Versuch 2, 2 mg CA/l, s. Tab. 20).

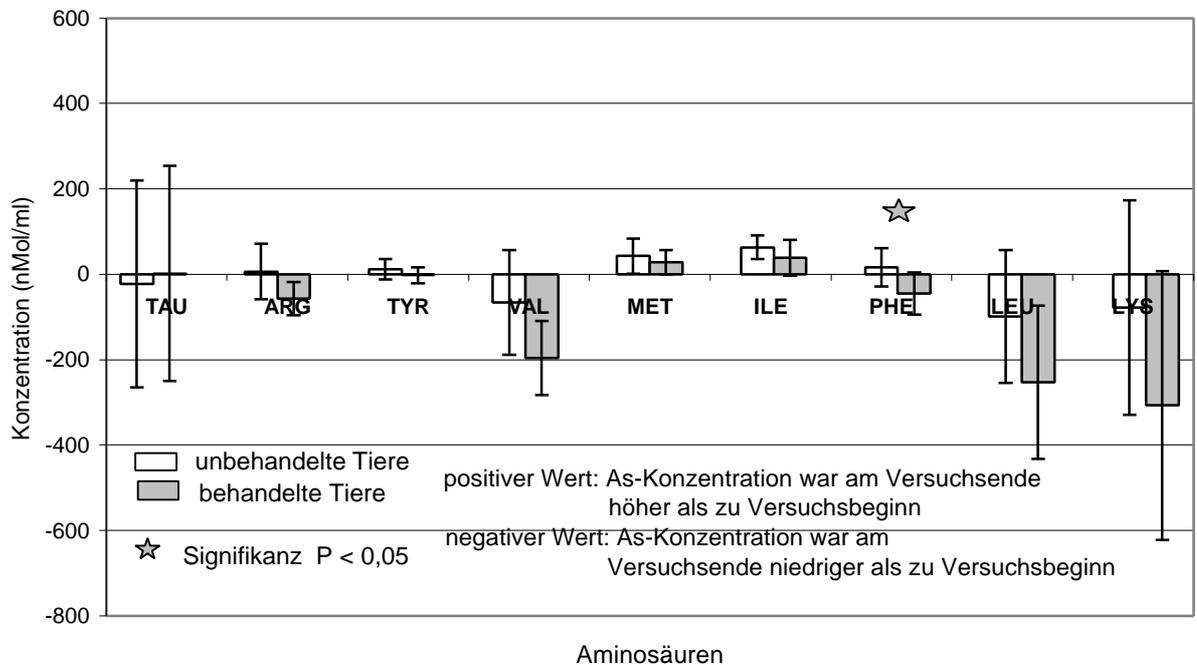


Abb. 43b: Text wie zu Abb. 43a

Vergleicht man allerdings die Resultate insoweit, dass nur über 60 % liegende Unterschiede berücksichtigt werden, so fallen zwölf Aminosäuren auf. Hiervon waren sieben auch mit dem ersten Test hervorgehoben worden, die Ergebnisse der Tabellen 17 und 20 stimmen dann fast überein (7 von 10, Tabellen 17 und 20).

Tab. 20: Vergleich der Differenzen der Mittelwerte - Differenzen der ASK zwischen Versuchsende und -beginn bei unbehandelten und behandelten Tieren (Versuch 2, 2 mg CA/l). Der Mittelwert der Differenzen der unbehandelten Tiere entspricht 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure.

Für Spalten 1 und 2: negativer Wert bedeutet Abnahme, positiver Wert Zunahme der Konzentration nach Versuchsende.

Für Spalten 3 und 4: negativer Wert: den kleineren Wert der Mittelwert - Differenzen weisen die behandelten Tiere auf
positiver Wert: den höheren Wert zeigen die behandelten Tiere.

Spalte	1	2	3	4	Signifikanz + P < / = 0,05 - P > / = 0,05
Aminosäure	Unbehandelte Tiere Mittelwerte der Differenzen (nMol/ml)	Behandelte Tiere Mittelwerte der Differenzen (nMol/ml)	Differenz der Mittelwert - Differenzen		
			(nMol/ml)	(%)	
ASP	-149	-165	16	11	-
GLU (+)	- 3	6	9	300	-
GLN	- 195	- 269	74	38	-
GLY	- 124	- 262	138	111	-
THR EAA	105	34	- 71	- 68	-
HIS EAA	- 18	- 47	- 29	161	-
CIT	2	1	- 1	- 50	-
ALA	- 82	- 208	126	154	-
TAU	- 22	2	- 24	- 109	-
ARG EAA	6	- 57	63	1050	-
TYR	12	- 2	- 14	- 117	-
VAL EAA	- 66	- 196	130	197	-
MET EAA	43	28	- 15	- 35	-
ILE EAA	63	39	- 24	- 38	-
PHE EAA	16	- 45	61	381	+
LEU EAA	- 99	- 253	154	156	-
LYS EAA	- 78	- 307	229	294	-

Im Wilcoxon -Test (Überprüfung der Differenz der Mittelwerte zweier verbundener Gruppen) war nur die Differenz der Mittelwerte für die Aminosäure Phenylalanin zwischen Kontrolle und behandelten Tieren signifikant verschieden (Wilcoxon – Paardifferenz -Test, P < 0,05, Abb. 43b).

Bei elf Aminosäuren war die Mittelwert-Differenz der Konzentrationen bei den **behandelten Tieren** negativ, d.h. die Konzentrationen waren am Versuchsende geringer als zu Versuchsbeginn (Tab. 20), bei sechs dieser elf Aminosäuren waren starke Abnahmen festzustellen (über 100 % bei: Glycin, Histidin, Alanin, Valin, Leucin und Lysin); bei sieben Aminosäuren waren die Mittelwert-Differenzen der

Konzentrationen erhöht (Asparaginsäure, Glutamin, Glycin, Alanin, Valin, Leucin und Lysin), bei drei davon sehr stark (Glutamin, Glycin und Lysin).

Bei den **unbehandelten Tieren** waren ähnliche Veränderungen der ASK aufgetreten. Zehn Aminosäuren hatten am Versuchsende eine geringere Konzentration als zu Versuchsbeginn (Abnahme der Mittelwert-Differenzen bei: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Histidin, Alanin, Taurin, Valin, Leucin und Lysin); bei der Aminosäure Glutamin war die höchste Abnahme aufgetreten.

Bei sieben Aminosäuren (Threonin, Citrullin, Arginin, Tyrosin, Methionin, Isoleucin und Phenylalanin) war die Konzentration am Versuchsende größer als zu Versuchsbeginn. Bei drei Aminosäuren, Taurin, Arginin und Phenylalanin, gab es im Vergleich zu den behandelten Tieren gegenteilige Reaktionen: die Konzentration von Taurin am Versuchsende war geringer, die Konzentrationen von Arginin und Phenylalanin nahmen zu.

3.7.3 Wirkung von 4 mg CAI auf die Konzentration der Aminosäuren im Plasma (Versuch 3)

Bei diesem Versuch im Spätherbst (November) wurden die Aminosäuren-Konzentrationen vor und nach der Kontrollhaltung bzw. Exposition bestimmt. Die Regenbogenforellen waren zu Versuchsbeginn ca. 11 Monate alt und hatten ein Durchschnittsgewicht von 67 g. Wie in den Versuchen zuvor waren keine besonderen Veränderungen – weder im Aussehen (Hautfarbe) noch im Verhalten – feststellbar.

3.7.3.1 Aminosäuren-Konzentrationen in beiden Versuchsgruppen vor Versuchsbeginn

Bei den zur Kontrolle vorgesehenen Fischen konnte aus den Tieren K1 und K4, bei den zu behandelnden Tieren aus dem Tier P10 kein Blut entnommen werden.

Die als Kontrolle vorgesehenen Fische wiesen relativ gleichmäßige Werte der Einzelkonzentrationen bei folgenden Aminosäuren auf: ASP, GLY, THR, ALA und TAU. Unterschiedlich hohe Einzelkonzentrationen hatten in dieser Gruppe die Aminosäuren GLU, GLN, HIS, ARG, TYR, VAL, MET, PHE, LEU und LYS.

Bei den zu behandelnden Tieren gab es relativ gleich große Einzelkonzentrationen bei den Aminosäuren GLU, GLY, THR und LYS. Bei den restlichen Aminosäuren lagen größere Differenzen zwischen den Einzelkonzentrationen vor. Die größte Standardabweichung gab es bei der Aminosäure Alanin. In der Abb. 44a – c werden die Einzelkonzentrationen der Tiere für jede Aminosäure graphisch dargestellt.

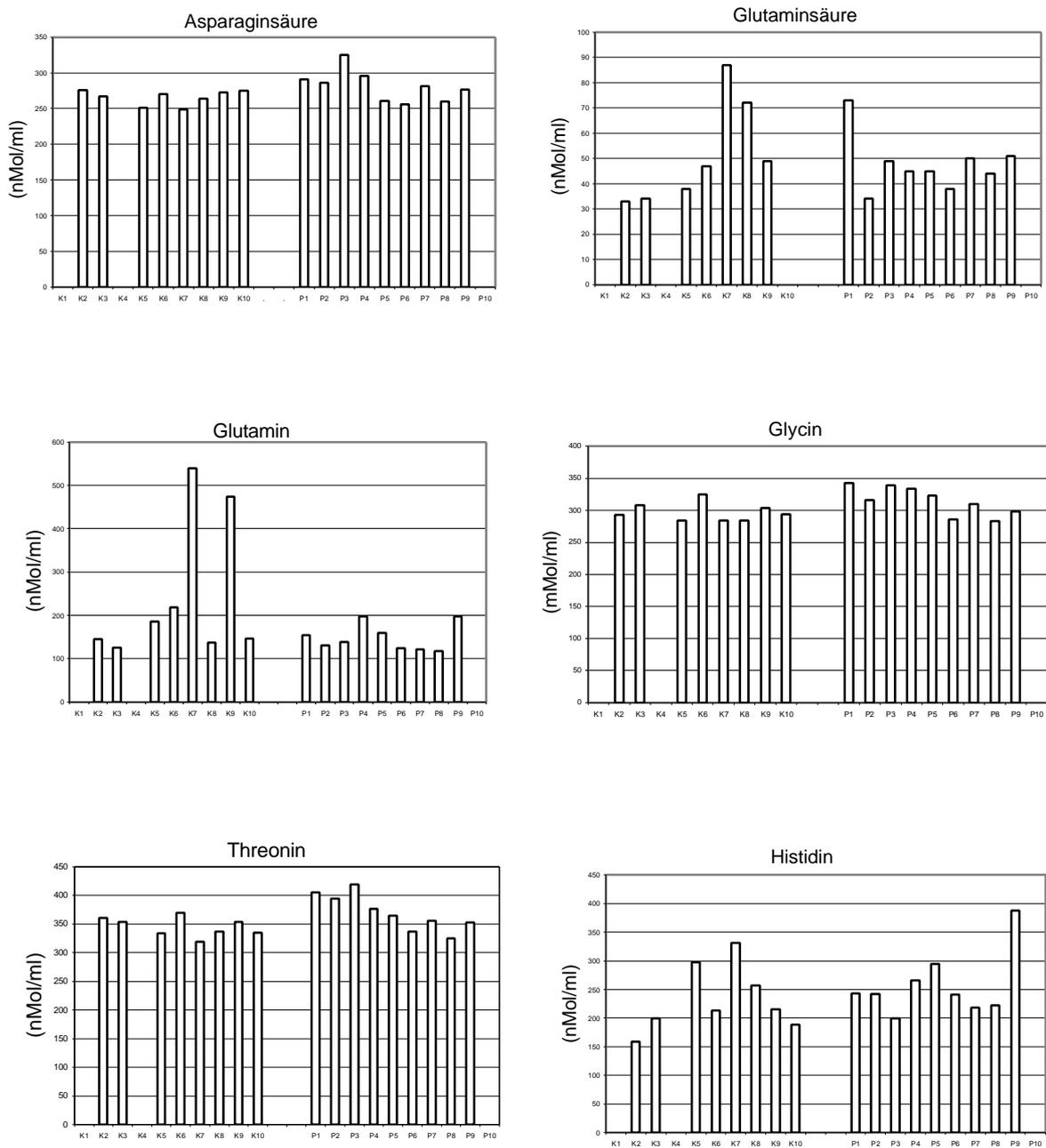


Abb. 44a: Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere vor Versuchsbeginn. Aus den Tieren K1, K 4 und P10 konnte kein Blut entnommen werden (Versuch 3, 4 mg CA/l). In den Graphen sind die Säulen der Kontrolltiere (linke Hälfte) und der zur Exposition vorgesehenen Tiere (rechte Hälfte des Diagramms) in gleicher Weise dargestellt, da die Fische beider Gruppen unbehandelt sind.

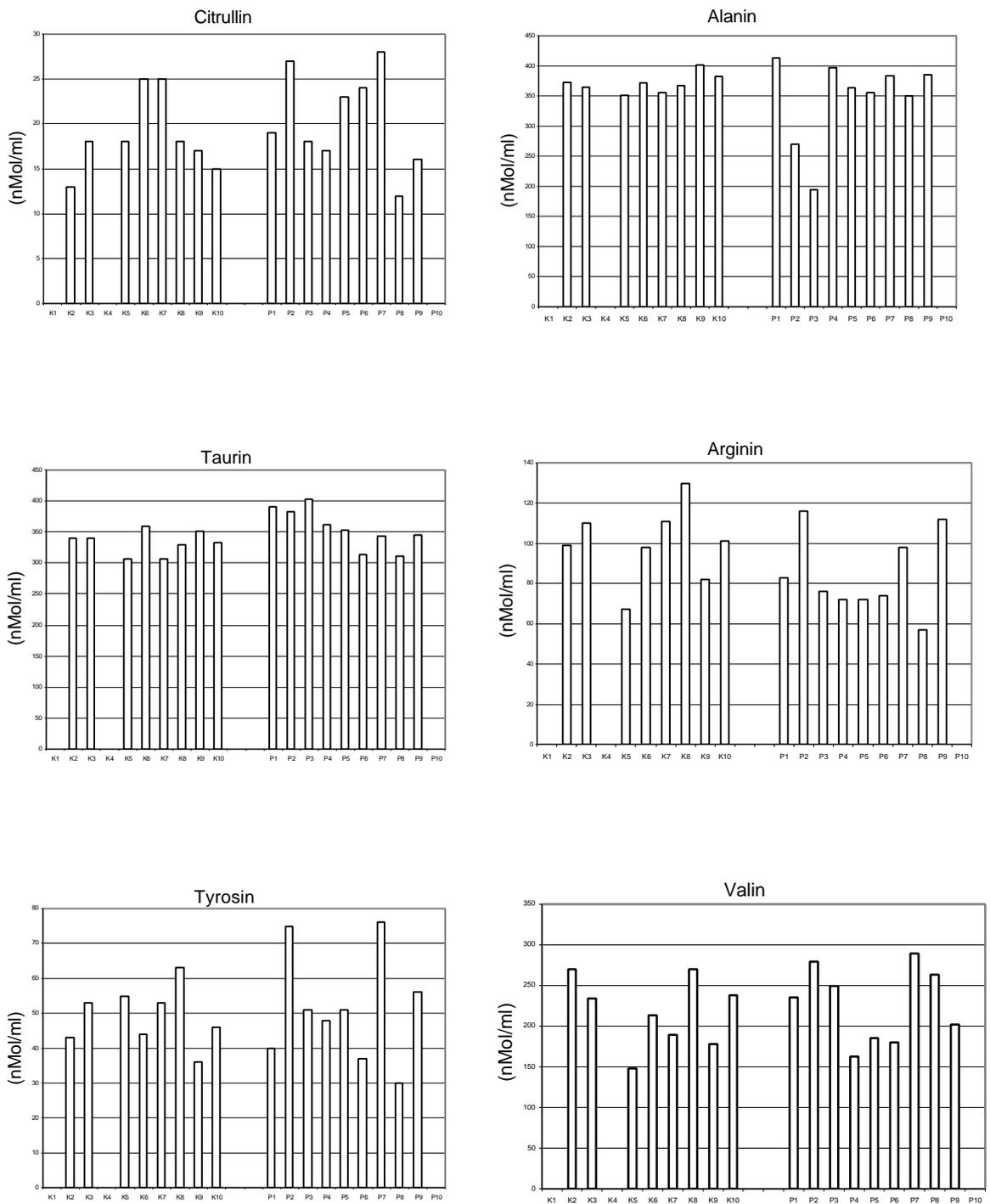


Abb. 44b: Text wie zu Abb. 44a (Versuch 3, 4 mg CAI)

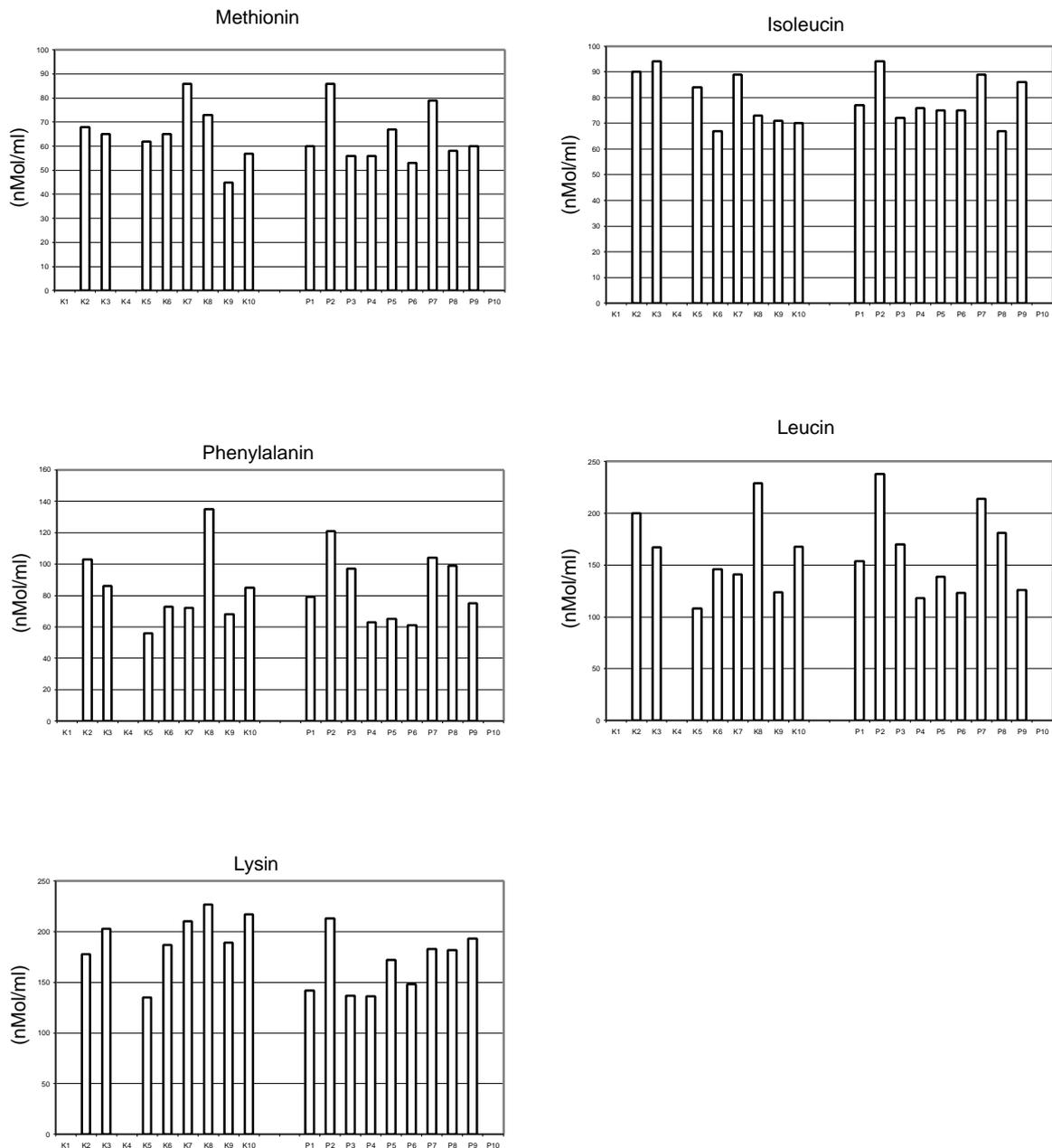


Abb. 44c: Text wie zu Abb. 44a (Versuch 3, 4 mg CA/I)

In den Abb. 45 und 46 sind die Mittelwerte der Aminosäuren-Plasmakonzentration mit Standardabweichungen der für die Kontrolle und der zu exponierenden Tiere wiedergegeben. Dadurch erhält man Aufschluss über die quantitative Verteilung der Aminosäuren im Plasma.

Wie die Abbildungen zeigen, repräsentieren hier die Aminosäuren Alanin, Taurin, Threonin und Glycin die Hauptkomponenten, sie umfassen 52 % der 17 Aminosäuren. Die Spektren der Aminosäuren sind sowohl in den für die Kontrolle bestimmten Fischen als auch in den für die Exposition vorgesehenen praktisch gleich.

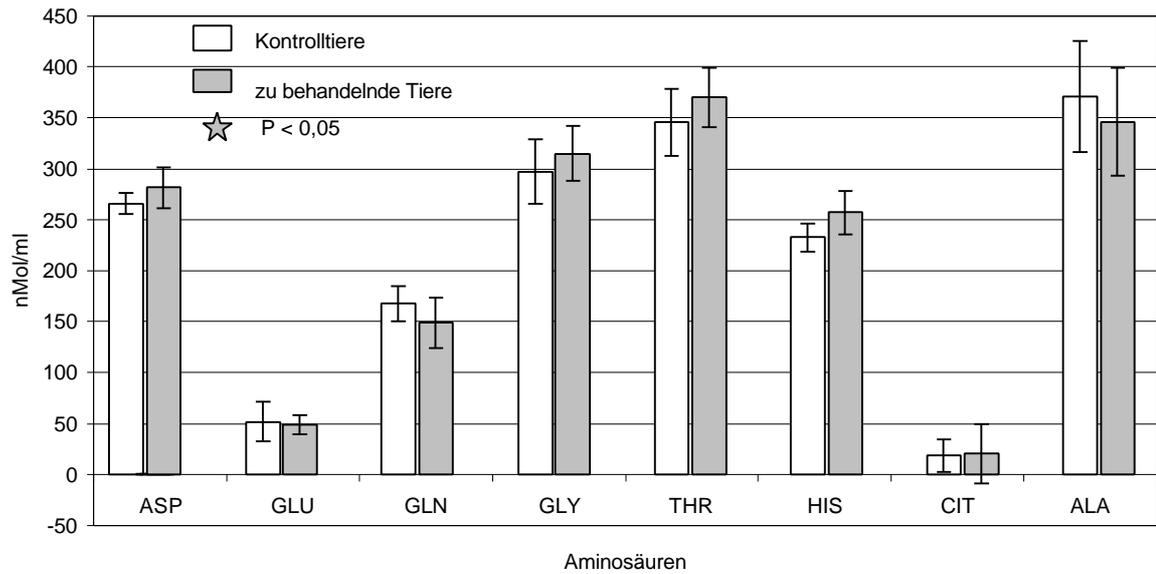


Abb. 45: Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen (ASP-ALA) der für die Kontrolle und für die Exposition vorgesehenen Tiere mit ihren Standardabweichungen (Versuch 3, 4 mg CA/l)

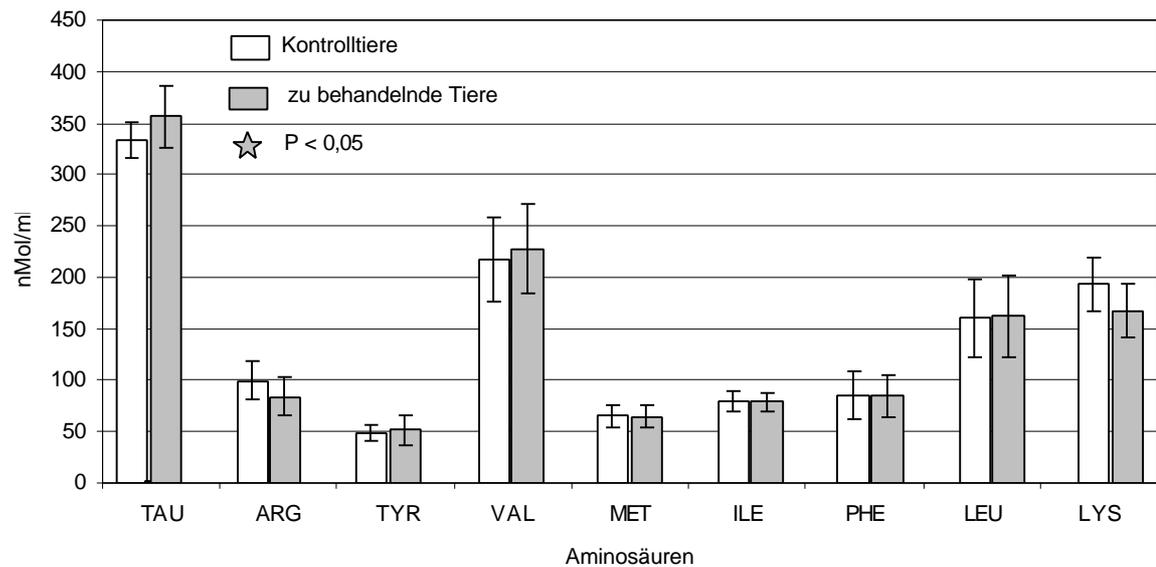


Abb. 46: Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen (TAU-LYS) der für die Kontrolle und für die Exposition vorgesehenen Tiere mit ihren Standardabweichungen (Versuch 3, 4 mg CA/l)

In Tab. 21 werden die Mittelwerte der ASK von den zur Kontrolle vorgesehenen und den zu behandelnden Tieren verglichen.

Tab. 21: Vergleich der Mittelwerte der ASK der Kontrolltiere und der zu behandelnden Tieren vor der Schadstoffexposition (Versuch 3, 4 mg CA/l, (-) bedeutet geringere, (+) größere Konzentration bei den zu behandelnden Tieren). V_K steht für den Variationskoeffizienten. Die Mittelwerte der Kontrolle entsprechen 100 %. Mit EAA sind die essentiellen Aminosäuren gekennzeichnet.

Aminosäure	Kontrolltiere		Zu behandelnde Tiere		Differenz zwischen den Mittelwerten		Signifikanz + $P \leq 0,05$ - $P > 0,05$
	Mittelwert (nMol/ml)	V_K	Mittelwert (nMol/ml)	V_K	(nMol/ml)	(%)	
ASP	266	4	281	7	15	+ 6	-
GLU (+)	52	37	49	19	3	- 6	-
GLN	168	8	149	20	19	- 11	-
GLY	297	5	315	7	18	+ 6	-
THR EAA	346	5	370	8	24	+ 7	-
HIS EAA	233	23	257	21	24	+ 11	-
CIT	19	21	21	24	2	+ 4	-
ALA	371	4	346	19	25	- 7	-
TAU	334	5	356	9	22	+ 6	-
ARG EAA	100	18	84	22	16	- 15	-
TYR	49	16	52	28	3	+ 5	-
VAL EAA	217	19	227	19	10	+ 4	-
MET EAA	65	17	64	17	1	- 1	-
ILE EAA	80	13	79	10	1	- 1	-
PHE EAA	85	27	85	24	0	0	-
LEU EAA	160	23	163	24	3	+ 2	-
LYS EAA	193	14	167	16	26	- 13	-
Summe der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen	3035		3065		30	+ 1	

Vier der siebzehn Aminosäuren hatten schon vor Versuchsbeginn eine Differenz der Mittelwerte größer als 10 %, die jedoch bei der statistischen Überprüfung zu keinen signifikanten Unterschieden führte. Der Arginin-Mittelwert der zu behandelnden Fische lag um 15 % unter dem der Kontrolltiere, dennoch wurde diese Differenz nicht als signifikant berechnet.

Insgesamt gab es zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

3.7.3.2 Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen von unbehandelten und behandelten Tieren nach vierwöchiger Exposition (Versuch 3, 4 mg CA/l)

Verhalten während der Versuchszeit:

Bei den exponierten Tieren gab es mit zunehmender Versuchsdauer mehr Nahrungsverweigerer. Im

Vergleich zum Versuch 2 (2 mg CA/l) mit drei Nahrungsverweigerern nahmen in dieser Konzentration fünf Tiere das angebotene Futter kaum mehr auf. Nach 5 Tagen Exposition fiel ein Tier (P10) durch weniger Futteraufnahme auf; nach neun Tagen waren es zwei (P10 und P7), nach elf Tagen vier (P10, P7, P8 und P4), nach 14 Tagen Exposition bis zu Versuchsende waren es fünf Tiere (+ P5), die nur noch die Hälfte oder weniger an Futter aufnahmen. Bis zu Versuchsende traten weder bei den Kontrolltieren noch bei den behandelten Tieren zusätzliche auffällige Veränderungen auf.

Zur Darstellung der Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Tieren sind in den Abbildungen 47a bis c die ASK der Einzeltiere aufgeführt.

Den Graphen zufolge sind die Aminosäuren in beiden Gruppen bei ASP, GLY (Ausnahme ein Wert in der exponierten Gruppe), THR, HIS, ARG, VAL, PHE, LEU (mit Ausnahme dreier Werte der Kontrollfische) und LYS in etwa gleich. Dies kommt rechnerisch auch in den Mittelwertdifferenzen (s. Tab. 22) zum Ausdruck. Die größten Abweichungen der Werte zwischen den Gruppen ergaben sich bei Tyrosin; hier enthielten sechs Plasmen der exponierten Forellen höhere Konzentrationen als die Kontrollfische. Auffällig sind auch die drei hohen Werte der Nahrungsverweigerer. Ähnlich sind die Verhältnisse bei Isoleucin. Bei beiden Aminosäuren sind die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen signifikant. Signifikante Unterschiede ergaben sich auch bei den Konzentrationen von Alanin; hier jedoch wiesen die Kontrolltiere höhere Konzentrationen auf. Hohe Konzentrationen zeigten vier Tiere. Bei Taurin fallen die Konzentrationen von zwei Forellen aus einer sonst gleichmäßigen Konzentrationsfolge auf.

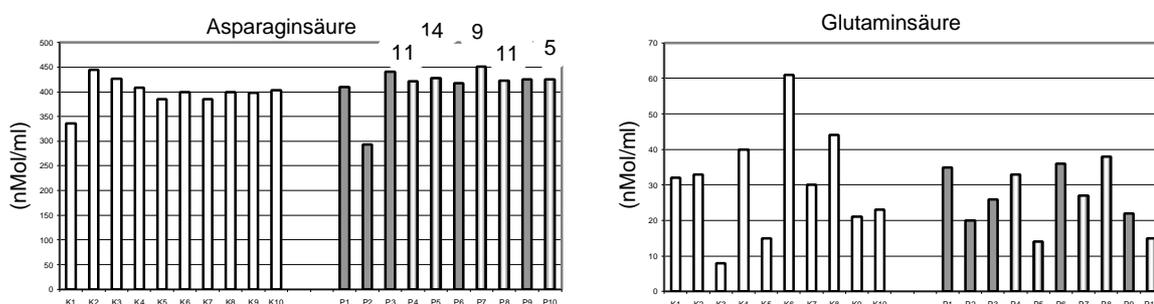


Abb. 47a: In den Abbildungen 47a bis c werden die ASK der Einzeltiere nach Versuchsende angegeben. Links stehen die Konzentrationen der Kontrolltiere (K, weiße Säulen), rechts die der exponierten Tiere (P, graue Säulen). Die schattiert gekennzeichneten Säulen (rechts) geben die Konzentrationen der Tiere an, die nach den darüberstehenden Expositionstagen nur noch die Hälfte – oder weniger – des angebotenen Futters aufnahmen (Versuch 3, 4 mg CA/l). Diese Zeitangabe ist zwar nur bei der Aminosäure Asparaginsäure eingetragen, sie gilt jedoch auch für dieselben Tiere bei allen Aminosäuren.

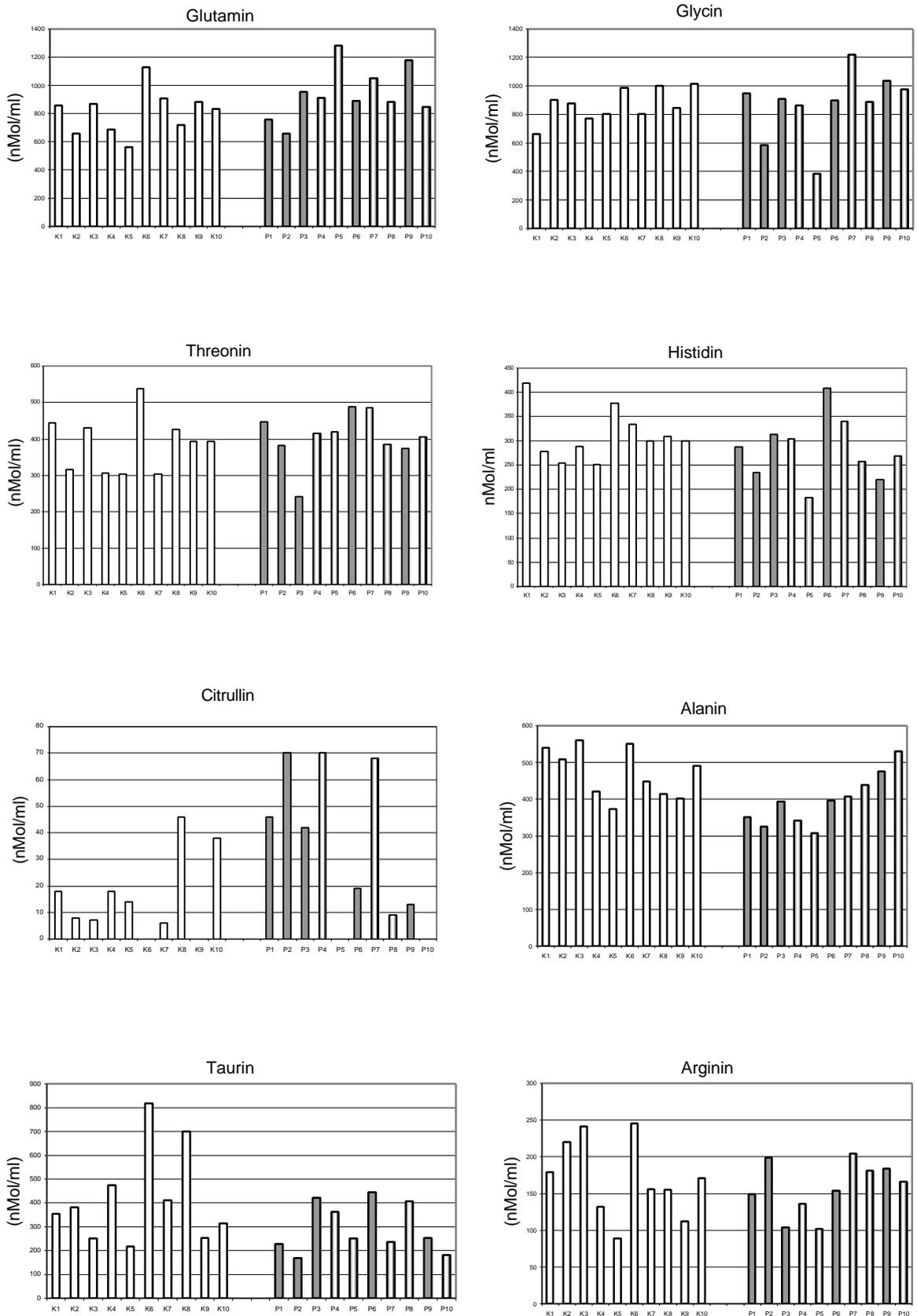


Abb. 47b: Text wie zu Abb. 47a

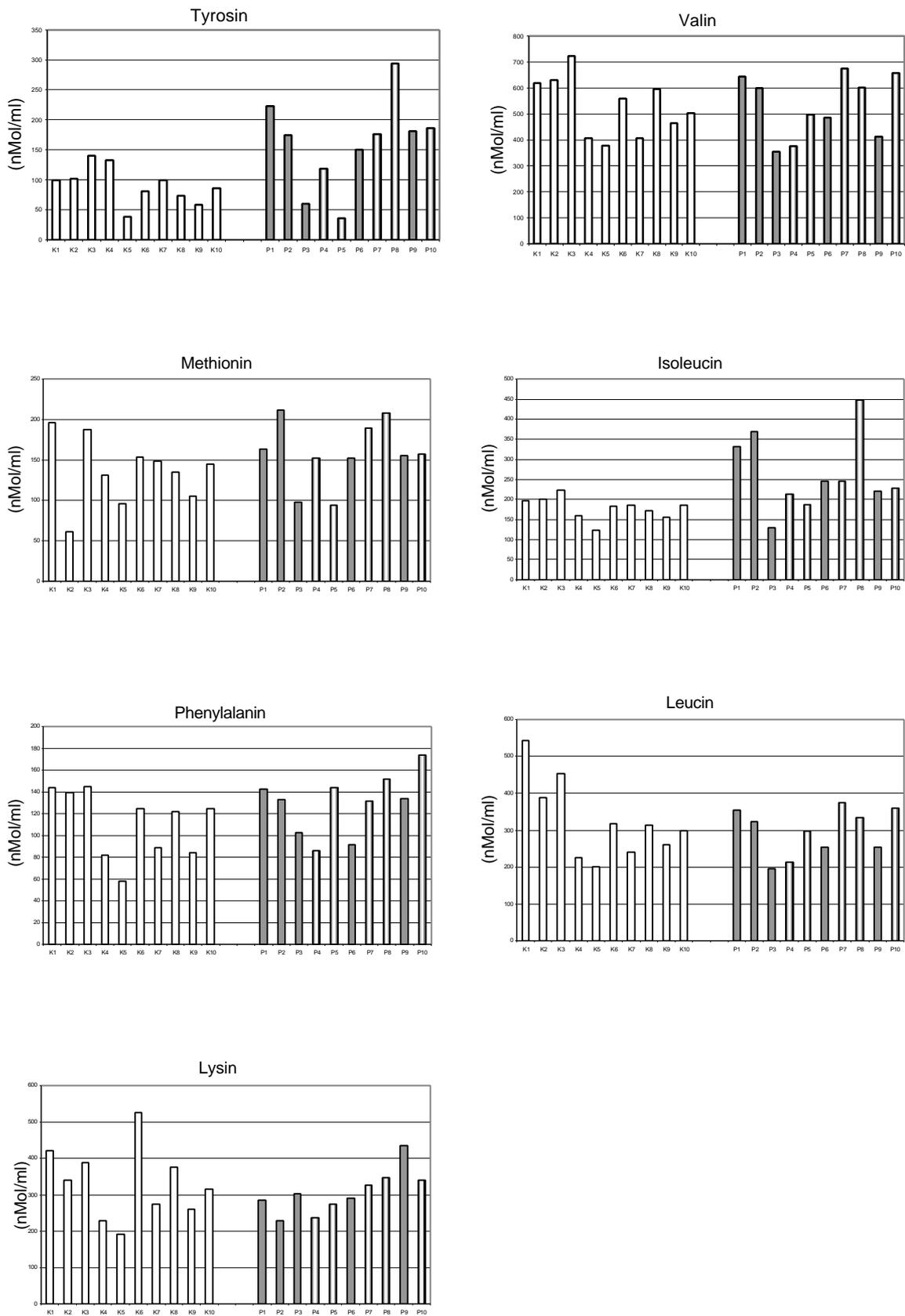


Abb. 47c: Aminosäuren-Konzentrationen der Einzeltiere nach vierwöchiger Versuchsdauer (Versuch 3, 4 mg CA/l, Text wie zu Abb. 47a)

In Abbildung 48a und 48b werden die Mittelwerte der ASK der Kontrolle und der behandelten Tiere mit den Standardabweichungen nach Versuchsende wiedergegeben. Die Häufigkeitsverteilung der ASK ist in beiden Gruppen identisch und entspricht auch derjenigen vor Versuchsbeginn (Abb. 45 und 46).

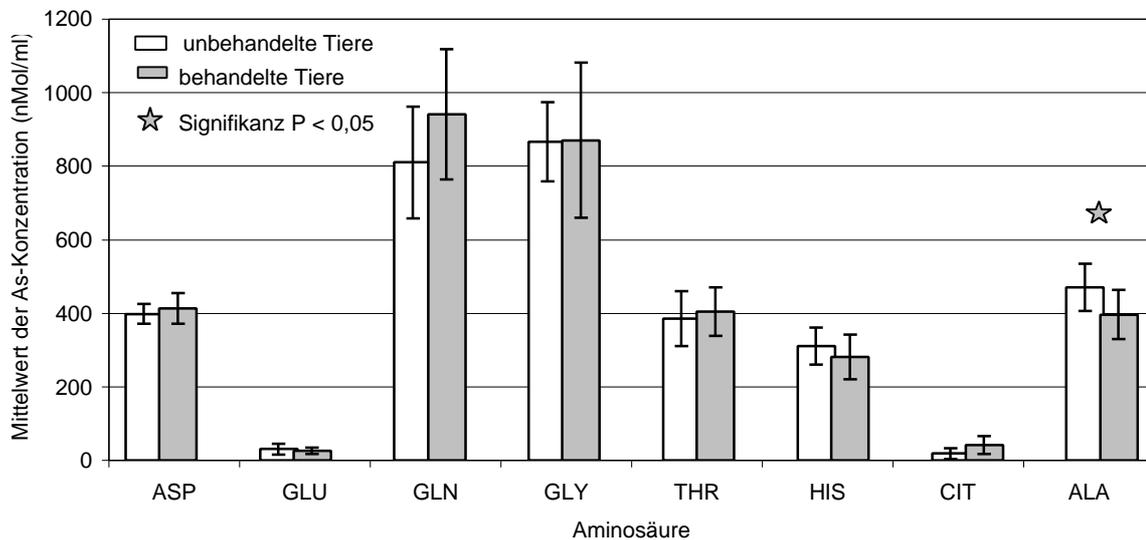


Abb. 48a: Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen von unbehandelten und behandelten Tieren **nach** vierwöchiger Exposition (ASP - ALA, Versuch 3, 4 mg CA/l)

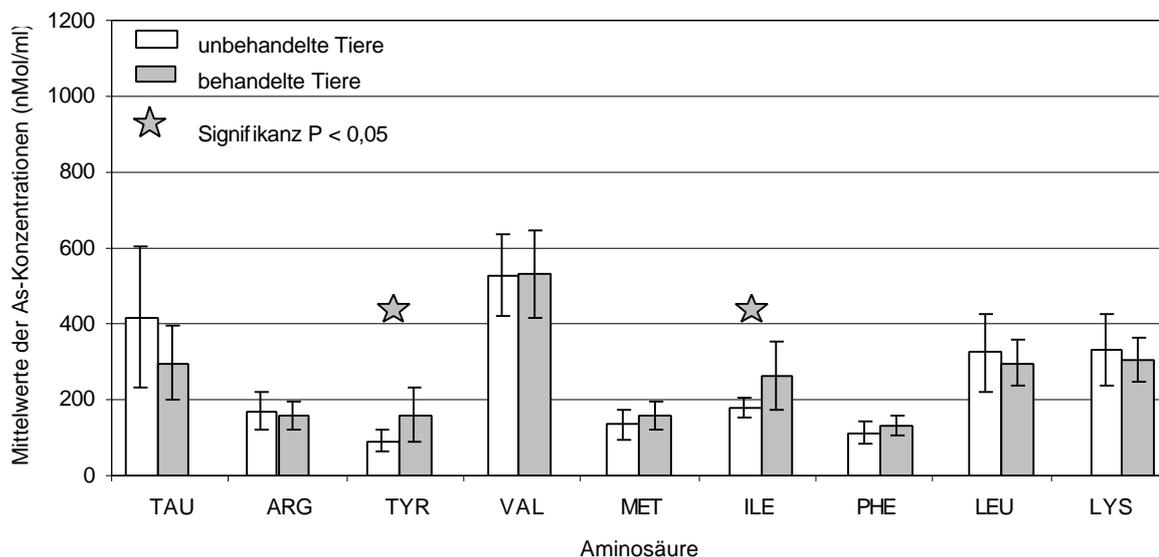


Abb. 48b: Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen von unbehandelten und behandelten Tieren **nach** vierwöchiger Exposition (TAU - LYS, Versuch 3, 4 mg CA/l)

Im Vergleich zum Versuch mit 2 mg CA/l gab es hier nur drei Aminosäuren mit signifikanten Unterschieden zwischen Kontrolle und behandelten Tieren: Alanin, Tyrosin und Isoleucin. Die Konzentrationen

nen von Tyrosin und Isoleucin waren höher bei den exponierten Tieren, die von Alanin war höher bei den unbehandelten Tieren.

In Tabelle 22 werden die Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen von Kontrolle und exponierten Tieren gegenübergestellt.

Tab. 22: Vergleich der Mittelwerte der ASK von unbehandelten und behandelten Tieren **nach** der Exposition (Versuch 3, 4 mg CA/l). (+) bedeutet: der größere Mittelwert liegt bei den behandelten, (-) bei den unbehandelten Tieren vor. V_K steht für Variationskoeffizient, EAA für Essential Amino Acid. Die Mittelwerte der Kontrolle entsprechen 100 %.

Aminosäure	Kontrolle		Behandelte Tiere		Differenz zwischen den Mittelwerten		Signifikanz + $P \leq 0,05$ - $P > 0,05$
	Mittelwert (nMol/ml)	V_K	Mittelwert (nMol/ml)	V_K	(nMol/ml)	(%)	
ASP	398	7	414	10	+ 16	+ 4	-
GLU (+)	31	45	27	30	- 4	- 13	-
GLN	810	19	941	19	+ 131	+ 16	-
GLY	866	12	870	24	+ 4	0	-
THR EAA	386	19	405	16	+ 19	+ 5	-
HIS EAA	311	16	282	22	- 29	- 9	-
CIT	20	70	42	57	+ 22	+ 116	-
ALA	471	14	397	17	- 74	- 16	+
TAU	418	45	296	33	- 122	- 29	-
ARG EAA	170	29	158	22	- 12	- 7	-
TYR	91	32	160	44	+ 69	+ 76	+
VAL EAA	529	21	530	22	+ 2	0	-
MET EAA	136	29	158	24	+ 22	+ 17	-
ILE EAA	179	15	262	34	+ 83	+ 47	+
PHE EAA	111	26	129	20	+ 18	+ 16	-
LEU EAA	324	31	296	20	- 28	- 9	-
LYS EAA	332	28	307	19	- 25	- 8	-

Citrullin und Taurin wiesen zwar größere prozentuale Differenzen zwischen unbehandelten und behandelten Tieren auf als z.B. Alanin, diese reichen im Mann - Whitney -Test zu keiner Signifikanz aus. Signifikante Unterschiede gab es bei den Aminosäuren Alanin, Tyrosin und Isoleucin.

3.7.3.3 Vergleich der Aminosäuren-Konzentrationen von Kontrolltieren mit exponierten Normalfressern bzw. Nahrungsverweigerern

Wie wirkte sich die verringerte Nahrungsaufnahme auf die Konzentration der einzelnen Aminosäuren im Plasma aus? In Tab. 23 werden die Mittelwerte der ASK von Normalfressern denen der Nahrungsverweigerern gegenübergestellt.

Tab. 23: Vergleich der Mittelwerte der ASK zwischen Normalfressern und Nahrungsverweigerern in einer 4 mg CA/l -Lösung (Versuch 3). (+) bedeutet Zunahme, (-) bedeutet Abnahme des Mittelwertes bei den Nahrungsverweigerern. Die Mittelwerte der Normalfresser entsprechen 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäuren.

Aminosäure EAA = essent. Amino Acid	Normalfresser Mittelwerte (nMol/ml)	Nahrungsverweigerer Mittelwerte (nMol/ml)	Differenz der Mittelwerte	
			(nMol/ml)	(%)
ASP	397	430	+ 33	+ 8
GLU (+)	28	25	- 3	- 9
GLN	887	994	+ 107	+ 12
GLY	875	865	- 10	- 1
THR EAA	387	422	+ 35	+ 9
HIS EAA	293	271	- 22	- 8
CIT	38	49	+ 11	+ 28
ALA	388	405	+ 17	+ 4
TAU	304	288	- 16	- 5
ARG EAA	158	158	0	0
TYR	158	162	+ 4	+ 3
VAL EAA	499	562	+ 63	+ 13
MET EAA	156	160	+ 4	+ 3
ILE EAA	259	264	+ 5	+ 2
PHE EAA	121	137	+ 16	+ 14
LEU EAA	276	316	+ 39	+ 14
LYS EAA	309	305	- 4	- 1
Summe der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen	5777	6030	+ 253	+ 4

Trotz geringerer Nahrungsaufnahme nahmen die Konzentrationen von 11 Aminosäuren zu; die Mittelwerte von Glutamin, Citrullin, Phenylalanin und Leucin erhöhten sich um mehr als 10 %. Die Mittelwerte von sechs Aminosäuren lagen geringfügig tiefer, wie zu vermuten in der analytisch und biologisch bedingten Streubreite. Da alle prozentualen Mittelwert-Differenzwerte über 10 % im Plusbereich lagen, werden damit auch die Ergebnisse aus Tab. 22 bestätigt.

In Tabelle 24 werden die Mittelwerte der ASK unbehandelter Fische mit exponierten Normalfressern verglichen.

Tab. 24: Vergleich der Mittelwerte der ASK von Kontrolle mit exponierten Normalfressern (Versuch 3, 4 mg CA/l). Der ASK Mittelwert der Kontrolle entspricht 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure.

Aminosäure EAA = essentielle Aminosäure	Kontrolltiere Mittelwerte (nMol/ml)	exponierte Normalfresser Mittelwerte (nMol/ml)	Differenz der Mittelwerte	
			(nMol/ml)	(%)
ASP	398	397	1	0
GLU (+)	31	28	3	- 10
GLN	810	887	77	+ 10
GLY	866	875	9	+ 1
THR EAA	386	387	1	+ 0,3
HIS EAA	311	293	18	- 6
CIT	19	38	19	+ 100
ALA	471	388	83	- 18
TAU	418	304	114	- 27
ARG EAA	170	158	12	- 7
TYR	91	158	67	+ 39
VAL EAA	529	499	30	- 6
MET EAA	136	156	20	+ 15
ILE EAA	179	259	80	+ 45
PHE EAA	111	121	10	+ 9
LEU EAA	324	276	48	- 15
LYS EAA	332	309	33	- 10
Summe der Mittelwerte der As-Konzentrationen	5582	5777	625	- 11

Die Ergebnisse stimmen in der Tendenz mit denjenigen der Tab. 22 überein.

3.7.3.4 Vergleich der Differenzen der Mittelwert – Differenzen der Aminosäuren-Konzentrationen zwischen Versuchsende und – start von unbehandelten und behandelten Tieren nach vierwöchiger Exposition (Versuch 3, 4 mg CA/l)

Die Differenzen der Mittelwerte der Differenzen der ASK zwischen Versuchsende und – beginn werden in Tabelle 25 wiedergegeben. In dieser Tabelle werden die Differenzen der Mittelwert-Differenzen der ASK von Versuchsende zu Versuchsbeginn miteinander verglichen, absolut und prozentual, und auf Signifikanz überprüft.

Tab. 25: Vergleich der Differenzen der Mittelwert-Differenzen der ASK. Zwischen Versuchsende und –beginn bei Kontrolle und behandelten Tieren (Versuch 3, 4 mg CA/l, negativer Wert bedeutet Abnahme, positiver Wert Zunahme der Konzentration nach Versuchsende). Die Mittelwerte der Kontrolle entsprechen 100 %. EAA steht für essentielle Aminosäure.
Für Spalten 1 und 2: negativer Wert bedeutet Abnahme, positiver Wert Zunahme der Konzentration nach Versuchsende
Für Spalten 3 und 4: negativer Wert: den kleineren Wert der Mittelwert- Differenzen weisen die behandelten Tiere auf
positiver Wert: den höheren Wert zeigen die behandelten Tiere.

Spalte	1	2	3	4	Signifikanz + < P = 0,05 - > P = 0,05	
	Aminosäure EAA = essent. Amino Acid	Kontrolle Mittelwerte der Differenzen (nMol/ml)	Behandelte Tiere Mittelwerte der Differenzen (nMol/ml)	Differenz der Mittelwert - Diffe- renzen		
			(nMol/ml)	(%)		
ASP		133	132	- 1	- 0,4	-
GLU (+)		-21	- 22	- 1	- 4,8	-
GLN		564	792	+ 228	+ 40,4	+
GLY		569	555	- 14	- 2,5	-
THR	EAA	40	35	- 5	-12,5	-
HIS	EAA	78	25	- 53	- 67,9	-
CIT		1	22	+ 21	+ 2100,0	+
ALA		100	51	- 49	- 49,0	-
TAU		84	- 60	- 144	- 171,4	-
ARG	EAA	71	74	+ 3	+ 4,2	-
TYR		42	108	+ 66	+ 157,1	+
VAL	EAA	312	303	- 9	- 2,9	-
MET	EAA	71	94	+ 23	+ 33,4	-
ILE	EAA	99	183	+ 84	+ 84,8	+
PHE	EAA	26	44	+ 18	+ 69,2	-
LEU	EAA	164	133	- 31	- 18,9	-
LYS	EAA	139	140	+ 1	+ 0,7	-

Die Prüfung auf Signifikanz für die Differenzen der Mittelwert-Differenzen zwischen den beiden Tiergruppen ergab für die Aminosäuren **Glutamin, Citrullin, Tyrosin und Isoleucin** signifikante Unterschiede. Wie aus Abb. 47b hervorgeht, gab es für Citrullin acht Messwerte, fünf für Normalfresser und drei der Nahrungsverweigerer, die innerhalb dieser Gruppen stark differierten. Die Aminosäuren Histidin, Alanin und Taurin wiesen auch große Differenzen zwischen unbehandelten und behandelten Tieren auf; die größte Differenz lag bei Taurin vor. Bei der statistischen Überprüfung ergaben sich jedoch für diese Aminosäuren keine signifikanten Unterschiede.

3.8 Vergleich der Ergebnisse der zwei Berechnungsmethoden

Die Unterschiede der Aminosäuren-Konzentrationen zwischen behandelten und unbehandelten Tieren wurden in den Versuchen 2 und 3 jeweils mit zwei verschiedenen Berechnungsmethoden überprüft. In

der Methode 1 wurden die Mittelwerte der Endkonzentrationen jeder Aminosäure zwischen behandelten und unbehandelten Tieren auf signifikante Unterschiede geprüft (U-Test, $P < 0,05$). In der Methode 2 wurden die Differenzen der ASK zwischen Versuchsende und –start berechnet. Die Mittelwerte dieser Differenzen zwischen un- und behandelten Tieren wurden ermittelt und mit dem Wilcoxon-Paardifferenz-Test auf Signifikanz ($P < 0,05$) überprüft. In Tabelle 26 werden die Ergebnisse dieser Verfahren für Versuch 2 (2 mg CA/l) und Versuch 3 (4 mg CA/l) gegenübergestellt. Aufgeführt sind hier nur die Aminosäuren behandelter Tiere, bei denen signifikante Unterschiede vorlagen. Durch Fettdruck sind die Aminosäuren gekennzeichnet, deren Konzentrationen nach der jeweiligen Berechnungsmethode signifikante Unterschiede (Wilcoxon-Paardifferenzen-Test) zeigten.

Beim Vergleich der Mittelwerte der Endkonzentration fällt auf, dass von den sieben Aminosäuren (THR, ALA, ARG, VAL, PHE, LEU, LYS), die signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren aufwiesen, sechs Aminosäuren (ALA, ARG, VAL, PHE, LEU, LYS) auch in dem zweiten Verfahren, dem Vergleich der Differenzen der Mittelwert-Differenzen, noch Konzentrationsabnahmen von über 50 % ergaben. In diesem Verfahren wies die Konzentration der Aminosäure Phenylalanin als einzige einen signifikanten Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tieren auf.

Der Vergleich der Mittelwerte der Endkonzentrationen zwischen den unbehandelten und behandelten Tieren ergab für drei Aminosäuren signifikante Unterschiede: die Konzentrationen von Tyrosin und Isoleucin nahmen zu, die von Alanin nahm ab. Weitere Konzentrationserhöhungen ergaben sich für die Aminosäuren Glutamin, Citrullin und Methionin. Der Vergleich nach Methode 2 erbrachte vier signifikante Unterschiede: für Glutamin, Citrullin, Tyrosin und Isoleucin war die Konzentrationserhöhung signifikant im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Die Aminosäuren Methionin und Phenylalanin wiesen ebenfalls Konzentrationserhöhungen, allerdings waren diese nicht signifikant (Paardifferenzen-Test, Wilcoxon, $P < 0,05$). Die fünf Aminosäuren (GLN, CIT, TYR, MET, ILE), die nach Methode 1 Zunahmen in ihrer Aminosäuren-Konzentration (im Vergleich zu den unbehandelten Tieren) zeigten, wiesen nach Methode 2 noch größere Konzentrationserhöhungen auf. Mit Ausnahme der Aminosäuren Threonin und Phenylalanin trifft diese Aussage auch für die Aminosäuren zu, deren Konzentrationen zu Versuchsende abgenommen hatten.

Tab. 26: Vergleich der zwei Berechnungsmethoden für Versuch 2 und 3. Hier sind nur die Differenzen der Aminosäuren- Konzentrationen aufgeführt, deren unterschiedliche Werte zu den unbehandelten Tieren mehr als 10 % betragen (s.o.).

Versuch 2 (2 mg CA/l)		Versuch 3 (4 mg CA/l)	
Methode 1	Methode 2	Methode 1	Methode 2
Vergleich der Mittelwerte der Endkonzentrationen behandelter Tiere	Vergleich der Differenzen der Mittelwert-Differenzen der Aminosäuren	Vergleich der Mittelwerte der Endkonzentrationen behandelter Tiere	Vergleich der Differenzen der Mittelwert-Differenzen der Aminosäuren
Zunahme bzw. Abnahme der Mittelwerte in % bei behandelten gegenüber unbehandelten Tieren	Zunahme bzw. Abnahme der Mittelwerte in % bei behandelten gegenüber unbehandelten Tieren	Zunahme bzw. Abnahme der Mittelwerte in % bei behandelten gegenüber unbehandelten Tieren	Zunahme bzw. Abnahme der Mittelwerte in % bei behandelten gegenüber unbehandelten Tieren
THR (Ab) 25	THR (Ab) 68	THR (Zu) 5	THR (Ab) 13
ALA (Ab) 17	ALA (Ab) 154	ALA (Ab) 16	ALA (Ab) 49
ARG (Ab) 36	ARG (Ab) 1050	TAU (Ab) 29	TAU (Ab) 171
VAL (Ab) 25	VAL (Ab) 197	TYR (Zu) 76	TYR (Zu) 157
PHE (Ab) 29	PHE (Ab) 381	ILE (Zu) 47	ILE (Zu) 85
LEU (Ab) 33	LEU (Ab) 156	MET (Zu) 17	MET (Zu) 33
LYS (Ab) 38	LYS (Ab) 294		GLN (Zu) 40
			CIT (Zu) 2100

Beide Berechnungsverfahren ergaben bei der statistischen Überprüfung annähernd gleiche Ergebnisse.

4. Diskussion

4.1 Allgemeines

Durch die Untersuchungen sollte festgestellt werden, wie weit bestimmte morphologische und physiologische Parameter herangezogen werden können, um die Belastung durch einen Schadstoff bei Regenbogenforellen nachzuweisen, wobei besonders die Plasmaamino­säuren-Konzentrationen von Interesse waren. Dazu wurden Versuche mit drei verschiedenen Schadstoffkonzentrationen durchgeführt, die allerdings, technisch bedingt, zu verschiedenen Jahreszeiten stattfinden mussten: Versuch 1 (1 mg 4 CA/l) und Versuch 3 (4 mg 4 CA/l) wurden im Herbst (Oktober und November) durchgeführt, Versuch 2 (2 mg CA/l) im März. Möglicherweise darf nicht davon ausgegangen werden, dass die "Herbst"- und die "Frühjahrsfische" gleich reagieren.

In Vorversuchen wurde ermittelt, wie sich Forellen der hier verwendeten Größe am besten halten lassen. Es zeigte sich, dass die Fische zumindest im Versuch einzeln gehalten werden müssen, da sich bei der Fütterung dominante Tiere mehr Futter schnappten als die schwächeren Tiere. Ferner war herauszufinden, mit welchem Erfolg es gelang, Blut aus der Schwanzvene zu entnehmen. Hierbei sollten keine inneren Verletzungen durch mehrfache Anstechversuche auftreten, da bei so behandelten Tieren die Blutparameter sich hätten anders verändern können als bei Tieren, bei denen der erste Einstechversuch gleich zur Blutentnahme führte. In Vorversuchen war im Mittel bei acht von zehn Tieren der erste Punktionsversuch erfolgreich. Fallen noch infizierte Tiere mit deutlichen Schleimhautveränderungen (z.B. Pilzbefall) – wie sie in Vorversuchen auftraten – für die Auswertung weg, dann bleiben noch sechs Fische für eine statistische Auswertung. In den Vorversuchen wurden auch keine Fische festgestellt, die weniger oder keine Nahrung zu sich nahmen. Die aus den o.g. Gründen festgelegte Zahl von zehn Versuchstieren erwies sich im Rückblick als die geringst mögliche Zahl von Versuchstieren, die eingesetzt werden musste, damit bei den verbliebenen Tieren die Auswertung der Parameter noch statistisch abgesichert werden konnte.

4.2 Einfluss von Chloranilin auf Körpergewicht, -länge und Korpulenzfaktor

4.2.1 Einfluss auf das Körpergewicht

Ein Teil der aufgenommenen Nahrung wird vom Körper resorbiert und steht somit dem Stoffwechsel zur Verfügung; der Rest wird als Kot abgegeben. Die resorbierte Nahrung liefert über den Stoffwechsel Energie und Baustoffe für das Wachstum. Kohlenhydrate und Fette decken den wesentlichen Energiebedarf, Eiweiße werden zur Synthese neuer Körpersubstanz eingesetzt. Stickstoffverluste durch Exkretion erfolgen hauptsächlich passiv (75 - 85 %) in Form von Ammoniak über die Kiemen (Steffens, 1985).

Nach Staples et al. (1976) und Elliot (1976) werden bei Regenbogen- und Bachforelle 72 % der aufgenommenen Nahrung für Stoffwechsel und Wachstum genutzt. Das Ausmaß der Nutzung der Nahrung für das Wachstum wird als Wirkungsgrad bezeichnet. Der Bruttowirkungsgrad setzt den energetischen Wert des Zuwachses in Beziehung zum energetischen Wert der aufgenommenen Nahrung. Beim Nettowirkungsgrad wird das Wachstum auf die verdaute oder assimilierte Nahrung bezogen, d.h., von dem Energiegehalt der aufgenommenen Nahrung wird der Energiegehalt des Kotes und der Stickstoff-Exkretion abgezogen (Davis und Warren, 1968; Kausch, 1972; Gerald, 1976). Kato und Sakamoto (1969) stellten fest, dass sich mit steigender Körpergröße die Wachstumsrate verringert, der Bruttowirkungsgrad sinkt und der Futteraufwand steigt. Das hängt damit zusammen, dass geringerer Zuwachs erhöhten Stoffwechsellaufwand zur Folge hat. Ein ausgewachsenes Stadium bzw. eine in einem bestimmten Alter erreichte Endgröße in der Form, wie sie bei Säugern ausgeprägt ist, gibt es bei Wirtschaftsfischen nicht (Steffens, 1985).

Die von der Futtermittelfirma empfohlene Futtermenge eines bestimmten Prozentsatzes des Körpergewichts unter der Berücksichtigung der Wassertemperatur erwies sich als ausreichend. Aus fast allen Becken mussten am nächsten Tag nur geringe Futterreste abgesaugt werden. Anfragen nach der quantitativen Zusammensetzung des Futters an Aminosäuren, wurden von der Firma nicht beantwortet.

Die geschlechtliche Entwicklung hat einen großen Einfluss auf das Wachstum: die periodische Reifung der Gonaden verursacht jährliche Wachstumszyklen. Bachforellen zeigten maximales Wachstum von Februar bis Mai, minimales aber während der Laichzeit im Oktober und November (Brown, 1946, in Steffens zitiert, 1985). Auch das Geschlecht beeinflusst das Wachstum: bei Forellen und Karpfen beginnt der Reifungsprozess im männlichen Geschlecht ein Jahr eher als im weiblichen. Durch die Gonadenreifung wird das Wachstum gebremst, die Männchen bleiben von diesem Zeitpunkt an im Wachstum hinter den Weibchen zurück (Steffens, 1974; Kato, 1975).

Einfluss auf das Wachstum nehmen noch folgende Umweltfaktoren: Temperatur, Sauerstoffgehalt, Lichtverhältnisse, Nahrungsmenge und -qualität. In den Versuchen waren die o.g. Faktoren für beide Gruppen, Kontrolltiere und behandelte Tiere, gleich.

Bei den Versuchen lagen die Temperatur und Sauerstoff-Konzentration des Haltungswassers stets zwischen 10,2°C und 16,7°C bzw. zwischen 64 und 88 mg O₂ /l. Purdom (1980) wies auf die Bedeutung der Temperatur für das Wachstum der Fische hin. Einer Temperaturerhöhung folgt eine Steigerung des Stoffwechsels, die wiederum zu einer Zunahme der Nahrungsaufnahme führt. Und damit ist eine Voraussetzung für schnelleres Wachstum gegeben. Regenbogenforellen zeigen gutes Wachstum bei Temperaturen zwischen 12°C und 18°C. Dieser Bereich wurde in den Versuchen weder unter- noch überschritten. Um gute Umweltverhältnisse zu bieten, darf nach Burrows et al. (1969) der O₂ - Gehalt nicht unter 60% des Sättigungswertes sinken. Auch diese Bedingungen konnten eingehalten werden.

Parasitenbefall und Stress sind weitere Faktoren, die das Wachstum beeinflussen. Weder Ekto- noch Endoparasiten konnten nach Versuchsende bei der Entnahme von Herz und Leber per Augenschein

erkannt werden. Wiegen, Messen, und das tägliche Füttern und Säubern der Aquarien waren unvermeidbare Stressfaktoren.

Die Forellen wurden in den sieben Tagen vom Einsetzen in die Einzelbecken bis zu Versuchsbeginn gründlich auf Verhalten und Aussehen überprüft. Auffällige Veränderungen wurden nicht beobachtet, weder im Verhalten noch im Aussehen (Pilzbefall).

Unter „Wachstum“ wird von Warren und Davis (1967) die Energiezunahme des Körpers verstanden, die sich in einer Steigerung der Körpermasse wie auch in einer Zunahme der Körperlänge manifestieren kann. In Versuch 1 hatten die unbehandelten Tiere (10 Monate alt) eine Gewichtszunahme um 61 %, die behandelten Tiere eine um 50 %. Die Tiere haben vermutlich an Muskelmasse zugelegt. Die Körperlängenzunahme betrug bei den unbehandelten Tieren 21 %, bei den behandelten 18 %. Das Gewicht der Kontrolltiere des Versuchs 2 nahm um 42 %, das der behandelten Tiere um 36 % zu; die Längenzunahme der Kontrolltiere betrug 9 %, die der behandelten Tiere 11 %. Im Vergleich zu Versuch 1 liegt hier eine geringere Gewichtszunahme vor, die sowohl mit dem größeren Ausgangsgewicht wie auch mit dem höheren Alter der Tiere (15 Monate) erklärt werden kann. Im Versuch 3 liegt die Gewichtszunahme der Kontrolltiere (11 Monate) bei 37 %, die der behandelten bei 23 %. Die Gewichtszunahme ist hier am geringsten, was z.T. auch mit dem größeren Ausgangsgewicht und mit der Jahreszeit begründet werden kann. Die Längenzunahme der unbehandelten Tiere betrug 13 %, die der behandelten 10 %.

Die von Kato u. Sakamoto (1969) geäußerte Feststellung, die Wachstumsrate verringere sich mit steigendem Körpergewicht, wird durch die Ergebnisse (Abb. 11a, 11b, 12 u. 13, 14 u. 15, Tab. 2, 3 u. 5a) bestätigt. Nach jeder Exposition war die Gewichtszunahme verringert, mehr oder weniger deutlich in Abhängigkeit von der Chloranilin-Konzentration.

Die Ergebnisse sind bestimmt durch drei Parameter:

- Jahreszeit
- Fischgröße
- Chloranilin - Konzentration

Die Gewichtszunahme war bei dem im Spätherbst (November) durchgeführten Versuch unter 4 mg CA/I signifikant geringer als bei den unbehandelten Tieren. Bei dem nur einen Monat früher stattgefundenen Versuch mit 1 mg CA/I des Vorjahres gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Da auch der Mittelwert der Kontrolltiere in der 4 mg CA/I-Konzentration geringer war als der der Kontrolltiere in der 1 mg CA/I-Konzentration (Oktober), kann daraus geschlossen werden, dass die höhere Schadstoffkonzentration im Spätherbst den signifikanten Unterschied bewirkte. Die behandelten Tiere in Versuch 1 hatten ein mittleres Startgewicht von 58 g und eine Gewichtszunahme von 50 %, die in Versuch 3 hatten ein Startgewicht von 69 g und eine Gewichtszunahme von 23 %. Die Fische im Versuch 3 hatten ein um 11 g höheres Startgewicht und eine um 27 % geringere Gewichtszunahme als die Fische im Versuch 1. Diese geringere Gewichtszunahme kann auch als Folge der hohen Schadstoffkonzentration gedeutet werden. Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ist bei den behandelten Tieren eine deutliche Gewichtsabnahme nur bei den Herbstversuchen (1 und 4 mg CA/I) festzustellen.

Unter der Wirkung von 1 mg und 2 mg CA/l ist die geringere Gewichtszunahme der exponierten Tiere tendenziell, unter 4 mg CA/l mg signifikant geringer.

4.2.2 Einfluss auf die Körperlänge

Bei Fischen gibt es „unbegrenztes Wachstum“ im Gegensatz zu dem Wachsen von Säugern und höheren Wirbeltieren. Deshalb ist damit zu rechnen, dass das Längenwachstum beim Fisch qualitativ unabhängig von der Ausgangsgröße zu beeinflussen ist.

In Versuch 2 (2 mg CA/l) im März war kein Unterschied in der Länge zwischen behandelten und unbehandelten Tieren festzustellen. In den Herbstversuchen mit 1 und 4 mg Chloranilin/l zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen. Daraus könnte geschlossen werden, die Herbsttiere reagierten empfindlicher auf den Schadstoff als die Tiere im Frühjahr. Zieht man die in Tabelle 8b dargestellten Ergebnisse in die Beurteilung mit ein, wird ersichtlich, dass die Nahrungsverweigerung das Verhältnis zwischen Kontrolltieren und exponierten Tieren stark beeinflussten, mehr in der 4 mg CA/l-Konzentration als in der 2 mg CA/l-Konzentration des Frühjahrs.

Die Versuche ergaben jedoch, dass bei Versuch 1 (1 mg CA/l, Versuchszeit Oktober) und bei Versuch 3 (4 mg CA/l, Versuchszeit November) eine deutliche Reduktion des Zuwachses, verglichen mit der Kontrolle, zu erzielen war. Dies war bei Versuch 2 (2 mg CA/l, Versuchszeit März) nicht der Fall. Eine einfache Erklärung für diesen Unterschied liegt in der Beachtung der Jahreszeit mit starker Gewichtszunahme im Frühjahr und Gewichtsabnahme und Fetteinlagerung im Herbst.

Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Versuch 1 und 3 im Vergleich zu Versuch 2 lassen sich mit der Jahreszeit begründen. Die Abhängigkeit von der Konzentration allein ist kaum als Erklärung plausibel. Im Frühjahr kann auch das Längenwachstum zu Gunsten des Körpermasse- und Gonadaufbaues reduziert sein.

Die Ergebnisse aus Versuch 1 und 3 lassen den Schluss zu, dass 4-Chloranilin auf das Längenwachstum der Regenbogenforelle in dieser Jahreszeit stark hemmend wirkt; das Längenwachstum der Fische in Versuch 2 wurde nicht so stark gehemmt.

4.2.3 Einfluss auf den Korpulenzfaktor

In der FULTONschen Formel für die Berechnung des Korpulenzfaktors werden die beiden Parameter Gewicht und Körperlänge zueinander in Beziehung gesetzt.

Abweichungen des Korpulenzfaktors können sich durch den Füllungsgrad des Verdauungskanals, die geschlechtliche Entwicklung und durch die Körperbeschaffenheit (Fettablagerung etc.) ergeben. Wachstum soll in einer Zunahme der Eiweißsubstanz (Muskulatur) nachzuweisen sein und nicht in einer erhöhten Fettablagerung, wie sie bei zu starker Fütterung auftreten kann. Nach Steffens (1985) sollte das Futter so zusammengesetzt sein, dass möglichst hohe Anteile daraus für den Eiweißaufbau genutzt werden können; der Energiebedarf sollte weitgehend über die Kohlenhydrate und Fette gedeckt werden. Diesen Bedingungen entsprach das verabreichte Forellenfutter.

Bei Versuch 1 und 3 (Oktober und November) ist der Korpulenzfaktor am Anfang des Versuchs deutlich höher als im Frühjahr (höherer Fettgehalt). Er nimmt während der beiden Versuche bei jeweils beiden Gruppen ab. Im Frühjahr dagegen ist der Ausgangswert niedrig und nimmt im Versuch zu. Die Behandlung mit Chloranilin bewirkt bei keiner Konzentration (1, 2, 4 mg CA/l) eine signifikante Veränderung der Zu- oder Abnahme.

Die Veränderung des Korpulenzfaktors ist eher eine Folge der unterschiedlichen Stoffwechsel- und Wachstumssituation in der Jahreszeit. Demgegenüber lässt sich eine Wirkung des Schadstoffs nicht erkennen.

Die Veränderung des Korpulenzfaktors beim Einzeltier ist abhängig von der Höhe des Korpulenzfaktors am Anfang. Bei hohem Korpulenzfaktor nimmt derselbe im Versuch ab, bei niedrigem legt er zu.

4.3 Einfluss von Chloranilin auf Leber und Herz

4.3.1 Einfluss auf die Leber

Viele anthropogene Schadstoffe werden in der Leber metabolisiert. Dabei können die Leberzellen – abhängig von der Toxizität und der Konzentration des Schadstoffs – unterschiedlich geschädigt werden.

Den Einfluss von 4-Chloranilin auf die Leber konnten Braunbeck et al. (1993) an Primärhepatocyten von Regenbogenforellen noch nach 7 Tagen Kulturdauer nachweisen; Primärhepatocyten wurden auch zur Untersuchung der Einflüsse anderer Umweltchemikalien eingesetzt (Braunbeck, 1993). Troge (1997) untersuchte die Wirkung von 3,4-Chloranilin und 4-Chloranilin auf verschiedene Zelllinien (R1 – fibroblastenähnliche Zellen aus der Leber der Regenbogenforelle und NRK – Zellen aus der Niere einer Ratte) und konnte eindeutig die höhere Toxizität des 3,4-Dichloranilins belegen. Nach Troge verloren die R1-Zellen ihre Anheftungsfähigkeit bei Konzentrationen "unter 700 mg 4-CA/l", die NRK-Zellen waren viel empfindlicher und verloren ihre Anheftungsfähigkeit schon bei 10 mg 4-CA/l. Beide Zelllinien reagierten also erst auf wesentlich höhere Konzentrationen als sie hier eingesetzt wurden. Nach Hermens et al. (1990) übrigens liegt der LC_{50} 96h – Wert für 4-CA, an Regenbogenforellen bestimmt, bei 11 mg 4-CA/l.

In dieser Arbeit wurden die Mittelwerte der Lebergewichte der in den verschiedenen Konzentrationen gehaltenen Forellen miteinander verglichen. Bezieht man das Lebergewicht auf das dazugehörige Körpergewicht, so erkennt man, dass mit steigendem Körpergewicht auch das Lebergewicht unbelasteter Fische zunimmt. Der Quotient Leber- durch Körpergewicht ist aussagekräftig.

Die Verringerung der Relation Lebergewicht/Körpergewicht durch den Schadstoff wird in den Versuchen 2 und 3 (2 mg und 4mg CA/l) deutlich. Bei 1 mg CA/l tritt kein Effekt auf, was entweder auf die geringe Konzentration oder auf den niedrigen Ausgangswert des Quotienten zurückzuführen sein

könnte. Die Jahreszeit und damit die Stoffwechsel- / Wachstumsphase dürften hierbei keine große Rolle spielen, wie der Vergleich von Versuch 2 und 3 deutlich zeigt. Die Werte der Nahrungsverweigerer beeinflussten maßgeblich das Entstehen der signifikanten Unterschiede der Quotienten bei Versuch 2 und 3.

Beide Konzentrationen, 4 mg CA/l stärker als 2 mg CA/l, beeinflussten den Stoffwechsel der Leber. Diese Schädigung könnte der Grund für die Reduzierung des Lebergewichts sein.

Die bei der Präparation der Tiere in Versuch 2 und 3 festgestellte Verfärbung der Leber, der Galle und des Fettkörpers bei den in 4-CA exponierten Fischen wiesen auf eine zunehmende Verfettung der Leber und Vergiftung des Organismus hin: statt rotbraun wie bei den Kontrolltieren und den exponierten Fischen in Versuch 1 (1 mg CA/l) war die Leber heller, mehr braungelb (Versuch 2), in Versuch 3 war sie noch intensiver gelb gefärbt, die Farbe des Fettkörpers war grau bis weiß. Die Kiemen waren blass.

Braunbeck et al. (1990) untersuchten die Wirkungen einer 4-CA-Konzentration von 0,2 mg/l an Regenbogenforellen auf zellulärer Ebene. Schon bei dieser niedrigen Konzentration reagierten die Leberzellen mit Fraktionierung und Vesikulierung des Rauhen Endoplasmatischen Retikulums (RER), die Zahl der Peroxisomen nahm ab, die eingelagerten Glykogenmengen nahmen geringfügig ab. Die Zahl der Mitochondrien und der Lipidvesikel erhöhte sich.

Außer durch Schadstoffe sind weiter verschiedene Ursachen für physiologische Veränderungen des Lebergewichts verantwortlich zu machen. Hunger führt zu einer Reduktion der Lebermasse bei 1- und 2-sömmerigen Karpfen. Schon nach 7 Tagen Hunger bei 10-20 °C hat Albrecht (1966) ein um 30 %, nach 15 Tagen ein um 40 % geringeres Lebergewicht festgestellt. Die Nahrungsverweigerer wiesen stark reduzierte Lebergewichte auf.

Auch eine zu große Menge an Omega 3-Fettsäuren (mehrfach ungesättigt) im Forellenfutter führt zur Abnahme der Lebermasse (Takeuchi und Watanabe, 1977). Leberverfettung kann auf mehrere Ursachen zurückgeführt werden: Pantothen säuremangel führt zu degenerativen Veränderungen der Leber, u.a. zur Leberverfettung (Wolf, 1951; Tunison et al., 1945; Mc Laren et al., 1947; Kitamura et al., 1967). Eine Überdosierung von Niacin (Nicotinamid) in der Nahrung bindet Cholin, das als Methionin-donor für die Methylierung der Nicotinsäure fungiert und dann im Fettstoffwechsel nicht wirksam werden kann. Dieser sekundäre Cholinmangel stört den Fetttransport in die Körperdepots und hat eine Leberverfettung zur Folge (Steffens, 1985). Diese kann auch als eines der Mangelsymptome von Inosit (Vit. B-Komplex) auftreten (Steffens, 1985). Ebenso kann ein Mangel an Cholin zu einer Leberverfettung führen. Denn das Cholin bildet mit Fettsäureestern des Glycerins und der Phosphorsäure wasserlösliche Lecithine und fördert dadurch den Abtransport von Fettsubstanzen aus der Leber. Ein Cholinmangel äußert sich auch in schlechtem Wachstum, leichter Gelbfärbung der Leber und in einer relativen Vergrößerung der Lebermasse (Mc Laren et al., 1947; Phillips et al., 1958; Kitamura et al., 1967).

Das hier eingesetzte Forellenfutter war das gleiche, das der Züchter schon seit längerer Zeit einsetzt und damit gute Ergebnisse bezüglich Wachstum der Fische erzielt. Leider war die Herstellerfirma nicht

bereit, nähere Einzelheiten über die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren im Futter zu geben. Da die Forellen ausreichend zusammengesetztes Futter bekamen, sind alle o.g. Gründe für eine Abnahme des Lebergewichts und für eine Verfettung der Leber auszuschließen, wie auch die Lebern der nichtexponierten Forellen zeigten. Die festgestellten Veränderungen der Leber können somit nur auf den Einfluss des Chloranilins zurückgeführt werden.

4.3.2 Einfluss auf das Herz

Bei einem Vergleich der Herzgewichte unbehandelter und exponierter Tiere sind die Differenzen der Mittelwerte in den drei Konzentrationen nicht signifikant (vgl. Abschnitt 3.5.3).

Wie bei der Leber ergeben sich erst aus dem Vergleich der Mittelwerte der Quotienten Herz- durch Körpergewicht von Kontroll- und behandelten Tieren Erkenntnisse über die Reaktion des Organismus auf den Schadstoff (vgl. Tab. 11a und Abb. 28).

Das relative Herzgewicht steigt bei Behandlung mit 2 und 4 mg CAI deutlich an. Unter 1 mg CAI war kein Effekt erkennbar. Die Schwellenkonzentration liegt als hier bei zwei mg CAI, wie auch bei einigen anderen Parametern.

Eine mögliche Erklärung:

durch die Schadstoffexposition wurden die Tiere einer erhöhten Leistungsanforderung ausgesetzt. Diese Situation beantwortete der Organismus mit dem Allgemeinen Anpassungssyndrom (AAS), d.h. Catecholamine, Corticosteroide und Thyroxin wurden vermehrt abgegeben. Zu vermuten wäre auch, dass durch erhöhte Glukagonbildung und Anregung der Gluconeogenese dem Körper mehr Energie für den Metabolismus zugeführt wird. Als Folge dieser erhöhten Kreislaufaktivität nimmt das Herzgewicht geringfügig zu.

Bei den Nahrungsverweigerern in Versuch 3 war kein Unterschied im Herzgewicht zu den Kontrolltieren festzustellen. Daraus kann gefolgert werden, dass die fehlende Nahrungsaufnahme nicht direkt auf die Veränderung des Herzgewichts einwirkt. Der Quotient Herz-/Körpergewicht war in Versuch 2 und 3 bei den Nahrungsverweigerern geringfügig kleiner als bei Normalfressern.

4.4 Blutbild

Die Zusammensetzung des Blutes ist abhängig von der jeweiligen physiologischen Situation des Organismus. Verschiedene Faktoren können die Zahl der Blutkörperchen und die chemische Zusammensetzung des Plasmas beeinflussen: Ernährung, Jahreszeit, Alter, Geschlecht, Wasserqualität, Temperatur und Schadstoffe. Die Hämatologie ist zu einem wichtigen diagnostischen Mittel geworden, obwohl sie bisher bei Fischen selten eingesetzt wurde (Lysak, 1959). Gründe für die fehlende Akzeptanz der Blutanalyse bei Fischen sind zu erkennen in:

1. der geringen Blutmenge, die man jungen Fischen entnehmen kann ohne ihnen zu schaden,
2. der größeren Gerinnungsfähigkeit des Blutes, die nach der Blutentnahme eventuell eine sehr schnell durchzuführende Analyse erfordert,

3. den jahreszeitlich bedingten Schwankungen der Blutzusammensetzung,
4. den individuellen Unterschieden zwischen den Geschlechtern einer Art,
5. den Unterschieden zwischen den verschiedenen Spezies.

In den letzten 50 Jahren gab es nur wenige Biologen, die sich mit der Blutanalyse von Teleosteen intensiver beschäftigten: Dambrowski (1953), Topf (1955), Weinreb (1958), Lysak (1959), Haider (1967), Finn und Nielson (1971) sowie Lehmann et al. (1976).

Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) und Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) sind die Arten, deren Blut mehrfach analysiert wurde.

Denton und Youssef (1975) beobachteten bei der Regenbogenforelle bezüglich ihrer Blutwerte eine jahreszeitliche Abhängigkeit. Die Jahreszeit beeinflusse ebenso den Hämoglobin- und Hämatokritwert der Zellen wie die Serumproteinkonzentration und das Zellvolumen. Im Februar / März konnten höhere Proteinkonzentrationen als im Juli / August festgestellt werden. Haider (1972) kommt zu einer gegensätzlichen Aussage. Nach seinen Untersuchungen hat die Jahreszeit keinen Einfluss auf die Erythrozytenzahl.

Nach Lysak (1959) liegt die Blutmenge eines Säugers zwischen 1/10 und 1/13, beim Fisch zwischen 1/23 bis 1/40 seines Körpergewichts; die Blutmenge, die entnommen werden darf, ohne dem Fisch zu schaden, wird mit 1/50 bis 1/60 des Körpergewichtes angegeben (Lehmann und Stürenberg, 1974). In weniger als sechs Wochen nach der Entnahme soll sich die Erythrozytenzahl wieder auf ihren Normwert eingestellt haben (Lysak, 1959), wobei der Normwert bei 1.200.000 Erythrozyten/mm³ liegt (Lehmann und Stürenberg, 1974).

Hauptbildungsort für die Erythrozyten ist die Kopfniere, ein Gewebe cranial der Niere gelegen. Der prozentuale Anteil des hämopoetischen Gewebes am Gesamtnierengewebe beträgt 64 %. Auch in der Milz werden rote Blutkörperchen gebildet, die dann im peripheren Blut zu funktionstüchtigen Erythrozyten heranreifen (Lehmann und Stürenberg, 1975). Nach Knoll (1957) werden Erythrozyten auch im Lymphsystem gebildet. Fijan (1961) sah zwischen der Hämpoese bei Fischen und Säugern prinzipiell keine Unterschiede. Topf (1955) und Haider (1968) gelang der Nachweis mehrerer Lymphozyten-Spezies im Darmtrakt; sie schlossen daraus auf eine Lymphopoese im Darmtrakt. Lehmann und Stürenberg (1975) erkannten die Milz als eines der wichtigsten Abbauorgane.

Einen ausführlichen Bestimmungsschlüssel für die Zuordnung der verschiedenen Blutzellen und deren Entwicklungsstadien geben Haider (1967) sowie Lehmann und Stürenberg (1975). Die Bestimmung der Blutzellen in dieser Arbeit erfolgte nach Lehmann und Stürenberg.

In allen drei Konzentrationen nimmt die relative Anzahl der reifen Erythrozyten bei den behandelten Tieren leicht ab (Abb. 29 – 34). Parallel dazu sind die Werte für die Erythrozyten-Abbauformen deutlich größer nach der Behandlung (Tab. 12, 13 und 14). Vor allem nach Behandlung mit 2 und 4 mg CAI vermehrt sich die Zahl der Erythroblasten und Proerythrozyten viel stärker als bei der Kontrolle. Auch bei der relativen Anzahl der Granulozyten und Lymphozyten erkennt man eine starke Vermehrung nach Einwirkung von 2 und 4 mg CAI.

Allgemein gesehen ergibt sich, dass durch die Schadstoffwirkung der Turnover der Erythrozyten stark angeregt wird. Erythrozyten-Vorstufen treten relativ zur Anzahl von „normalen“ Erythrozyten vermehrt auf wie auch Abbauförmungen verstärkt zu beobachten sind. Das vermehrte Auftreten von Granulozyten und Lymphozyten ist als Stress-Reaktion (Roberts, 1978) zu deuten. Mit der Freisetzung von Granulozyten wird die Abwehrfunktion des Organismus gegen Bakterien und Pilze erhöht. Folgt man dieser Aussage, dann ist die 1 mg CA/I-Konzentration für die Regenbogenforelle noch kein Stressor: unbehandelte und behandelte Tiere haben die gleiche relative Zahl an Granulozyten. Eine Konzentration von 2 mg CA/I verursacht als starker Stressor eine um den Faktor 1,7 erhöhte Bildung der Granulozyten. Die 4 mg CA/I-Konzentration hemmt anscheinend diese vermehrte Bildung.

In dieser Arbeit nahm die relative Konzentration der Lymphozyten bei den behandelten Tieren mit der Schadstoffkonzentration zu; die höchsten relativen Lymphozytenwerte zeigte die 4 mg CA/I-Konzentration. Zu beachten sind hier die Werte bei den unbehandelten Tieren: die relative Konzentration der Lymphozyten war bei Versuch 1 im Herbst und bei Versuch 2 im Frühjahr gleich, Versuch 3 im Spätherbst zeigte eine Reduktion um mehr als die Hälfte. Jahreszeitlich bedingte Schwankungen können also nicht ausgeschlossen werden.

Die Spindelzellen entsprechen physiologisch dem Thrombozytensystem bei höheren Vertebraten. Auch ihre Vermehrung bei den behandelten Tieren ist eine Abwehrreaktion. Damit der Gerinnungsprozess ablaufen kann, müssen die Thrombozyten das Enzym Thrombokinasе abgeben. Die Spindelzellenkonzentration wies jahreszeitliche Schwankungen auf: bei den Kontrolltieren war die relative Anzahl im Herbst am geringsten, im Frühjahr am höchsten. Bei den Schadstoff exponierten Tieren im Versuch 2 (2 mg CA/I) lag im Frühjahr die höchste relative Anzahl vor, im Versuch 1 (1 mg CA/I) im Herbst war sie geringer und erreichte im Versuch 4 (4 mg CA/I) im Spätherbst ihr Minimum. Die jahreszeitlich bedingten Unterschiede in der relativen Anzahl der Spindelzellen wurden von Chloranilin also nicht beeinflusst.

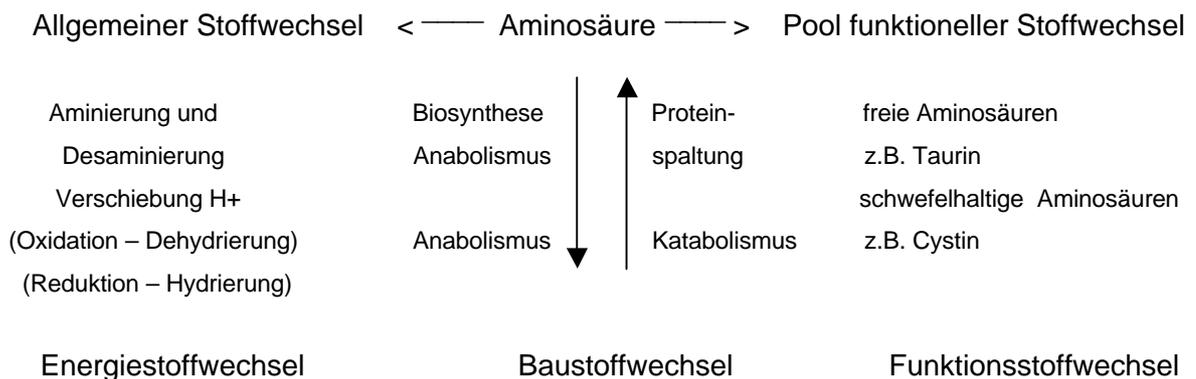
Ein Vergleich der Faktoren für die Zu- oder Abnahme der Blutzellen, bezogen auf die Zellzahl der behandelten Tiere, ergibt eindeutig die größten Veränderungen für die 2 mg CA/I-Konzentration. Unter Berücksichtigung der Faktoren in der 4 mg CA/I-Konzentration lassen die Werte den Schluss zu, dass die Frühjahrestiere wesentlich empfindlicher auf Chloranilin reagierten als die im Spätherbst, obwohl diese Tiere der doppelten Schadstoffkonzentration ausgesetzt waren (Tab. 12 u.14a). Möglicherweise gibt das verstärkte Auftreten von Erythrozyten-Abbauförmungen bei den Märztieren einen Hinweis auf verstärktes Turnover im Frühjahr. Vergleicht man die Veränderungen der Blutzellen von Versuch 1 mit Versuch 3, die beide im Herbst durchgeführt wurden, so kann nur die höhere Schadstoffkonzentration im Versuch 3 Ursache für die starke Veränderung der Blutzellen sein.

4.5 Einfluss von Chloranilin auf die Konzentration der Aminosäuren

4.5.1 Bedeutung des Aminosäuren-Pools

Zwanzig verschiedenen Aminosäuren, als proteinogene oder biogene Aminosäuren bezeichnet, sind Bestandteile von Proteinen. Sie werden in essentielle und nichtessentielle Aminosäuren unterteilt. Als essentiell werden Aminosäuren bezeichnet, die der Organismus nicht selbst synthetisieren kann und auf deren Zufuhr er über die Nahrung unbedingt angewiesen ist (EAA = Essential Amino Acid). Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA = No Essential Amino Acid) kann der Organismus durch Eigensynthese aufbauen. Neben diesen 20 Standard-Aminosäuren kommen in Proteinen auch weitere Aminosäuren vor; sie entstehen aus den proteinogenen Aminosäuren durch chemischen Umbau, der nach der Biosynthese erfolgt. Es handelt sich hierbei um Aminosäurenderivate, auf die in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen wird.

Es besteht ein gewisses Gleichgewicht zwischen Aminosäuren und Proteinen. Das folgende Schema veranschaulicht diesen Zusammenhang.



Für Mensch und Albinoratten (Lehninger et al., 1998) sind folgende Aminosäuren essentiell: Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin. Sie werden von Pflanzen und Mikroorganismen gebildet und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Die Aminosäuren Alanin, Asparaginsäure, Asparagin, Cystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin kann der Mensch selbst bilden. Taurin, eine nicht biogene Aminosäure, wird auch als bedingt essentiell bezeichnet, weil der Organismus sie aus Cystein und aus Methionin selbst bilden kann. Sie ist die im menschlichen Körper am häufigsten vorkommende freie Aminosäure. „Frei“ deshalb, weil sie nicht als Baustein von Proteinen dient und in vielen Zellen und Geweben vorkommt. Taurin ist beim Menschen an vielen physiologischen Prozessen beteiligt, u.a. an der Osmoregulation der Zelle über die Steuerung des intra – und extrazellulären Kalziumspiegels. Taurin als die vorherrschende Aminosäure im Muskelgewebe und deren Einfluss auf die Osmoregulation beim Karpfen (*Cyprinus carpio*) und Tilapie (*Oreochromis mossambicus*) wurde von Hegab u. Hanke (1983) sowie Assem u. Hanke (1983) beschrieben.

Für viele Fischarten wurde bestätigt, dass die zehn essentiellen Aminosäuren des Menschen auch für Fische essentiell sind (Ketola, 1982; Nose u. Murai, 1990).

Die qualitative Aufnahme an Aminosäuren bei der Regenbogenforelle ist gleich der der Säugetiere (Luquet und Kaushik, 1981). In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass der Eiweißabbau den Forellen als wichtigste Energiequelle dient. Ihr Stoffwechsel ist somit abhängig von einer regelmäßigen Eiweißaufnahme. Über Nahrungsaufnahme und Abbau von Gewebeprotein, z.B. Muskelgewebe, wird der Aminosäure-Pool aufrecht erhalten. Da Aminosäuren nicht gespeichert werden können, müssen Forellen stets eine mehr oder weniger konstante Konzentration freier Aminosäuren im Plasma haben. Veränderungen ihrer Konzentration ergeben sich durch den Aufbau körpereigener Proteine sowie durch ihren weiteren Abbau zur Energiegewinnung. Die Oxidation freier Aminosäuren zur Energiegewinnung hängt ab vom Proteingehalt der Nahrung (Kim et al., 1992).

Ward (1968) wies in einer der ersten in vitro-Untersuchungen über die Aminosäuren-Aufnahme im Darm von Regenbogenforellen nach, dass die Aufnahme mehrerer Aminosäuren von der Konzentration der Na⁺-Ionen und von der Verfügbarkeit von Adenosintriphosphat (ATP) abhängt. Er konnte eine Na⁺-Ionen abhängige Aufnahme der Aminosäuren L-Alanin, L-Histidin, L-Methionin und L-Tryptophan in den Darm der Regenbogenforellen nachweisen.

Billard und Menezo (1984) verglichen die Aminosäuren-Zusammensetzung und deren Konzentrationen von Blut der Regenbogenforelle mit der des Karpfens. Im Vergleich zum Karpfen hatte die Forelle eine 4-fach erhöhte Aminosäuren-Konzentration im Blut. Alanin zeigte die höchste Konzentration im Plasma. Zwischen Karpfen und Forelle konnten große Unterschiede in Zusammensetzung und Konzentration der Aminosäuren im Plasma aufgezeigt werden, die mit der Jahreszeit und dem unterschiedlichen Stoffwechsel der Tiere erklärt werden. Die von Billard u. Menezo (1984) ermittelten Aminosäuren-Konzentrationen im Plasma der Regenbogenforelle stimmen z.T. mit den eigenen Werten überein; unterschiedliche Aminosäuren-Konzentrationen können vermutlich auf die verschiedenen Jahreszeiten der Untersuchungen zurückgeführt werden.

Gras et al. (1982) untersuchte die Aminosäure-Konzentrationen in verschiedenen Organen des Blutkreislaufes der Regenbogenforelle. Im Plasma stellte er folgende Reihenfolge der Aminosäuren fest: die größte Konzentration wies Taurin (730 nMol/ml) auf, danach folgten ALA, VAL, GLU und ASP, LEU, LYS und GLY. Billard et al. (1984) fand im Forellenplasma die Folge: TAU, ALA, VAL, und GLU und LEU; die Gesamtaminosäurenkonzentration im Plasma bei 0,8 bis 1,5 kg schweren männlichen Forellen betrug 5166 nMol/ml (Dezember). Untersuchungen von Walton und Wilson (1986) im November ergaben folgende Häufigkeitsverteilung der Aminosäuren im Plasma der Regenbogenforelle: TAU, GLY, ALA, GLN und VAL. Sie ermittelten eine Gesamtaminosäurenkonzentration im Plasma von 5859 nMol/l.

Die Häufigkeitsverteilung der Aminosäuren-Konzentrationen variierte auch in der vorliegenden Untersuchung. Folgende Häufigkeitsverteilungen lagen vor:

- In Versuch 1: LYS, ALA, THR, GLY, GLN, TAU und VAL,
- in Versuch 2: GLN, GLY, ALA, VAL, TAU, LYS und LEU,
- in Versuch 3: GLN, GLY, VAL, ALA, ASP, TAU und LYS.

Diese Reihenfolgen der ASK lagen nach Versuchsende vor. Die Häufigkeitsverteilung der ASK vor Versuchsbeginn bei Versuch 2 und 3 entsprach der zu Versuchsende. Diese Aminosäuren erwiesen sich in mehrfachen Analysen als die quantitativ dominanten.

Untersuchungen über den Stoffwechsel von Salmoniden (Walton und Cowey, 1981) ergaben, dass Salmoniden, u.a. Fische, relativ hohe Konzentrationen an Protein und an essentiellen Aminosäuren benötigen, in manchen Fällen mehr als doppelt so viel wie Ratten, Hühner und Schweine (Atherton und Aitken, 1970). Philips (1969) nimmt an, dass 70% der im Futter enthaltenen Kalorien in Protein übergeführt werden. Wilson (1981) schätzt, dass das Trockengewicht der Regenbogenforelle zu 65 bis 75 % aus Protein besteht. Nach Walton und Cowey (1981) hängt die Proteinsyntheserate von mehreren Faktoren ab, z.B. von der Fischart, vom Gewebe, von der Temperatur etc. Im Allgemeinen ist die Syntheserate in der Leber höher als im Muskel. Wenn aber das Muskelgewebe mehr als 55 - 60% des Fischgewichts beträgt, kann der Muskel der Hauptort der Eiweißsynthese sein. Versuche von Narayansinghi und Eales (1975) an Regenbogenforellen ergaben eine Einbaufolge eines radioaktiv gekennzeichneten ¹⁴C-Aminosäuren-Gemisches in ein Protein in folgender Reihenfolge: Leber-Plasma > Eingeweide > Kiemen > Muskel.

Folmar (1993) zitiert Versuchsergebnisse von Sandnes et al. (1988), Denton und Youssef (1975) und von van Bohemen et al. (1981), in denen jahreszeitliche Schwankungen des Gesamtproteingehalts im Blut beim Atlantischen Lachs, bei jugendlichen und erwachsenen Regenbogenforellen, bei der Bach- (*Salmo fontinalis*) und Seeforelle (*S. trutta*) nachgewiesen wurden. Jugendliche und erwachsene Regenbogenforellen erreichten jeweils Maximalwerte des Gesamtproteingehalts im Juni/Juli, wobei die erwachsenen Tiere deutlich höhere Werte aufwiesen als die Jungfische.

Für den Proteingehalt im Serum des erwachsenen Atlantischen Lachses konnte keine Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Futters nachgewiesen werden. Ob kohlenhydratreiche oder – arme Nahrung angeboten wurde, der Serumproteingehalt lag zwischen 4,1 und 5,7 g/dl. Im März wurden die geringsten, im Dezember die höchsten Werte gemessen. Für die Bachforelle (*S. fontinalis*) wurde eine Konzentration des Serumproteins von 4 – 7 g/dl ermittelt (Booke, 1964; Heming and Paleczny, 1987, Goede and Barton, 1990), wobei jahreszeitliche und geschlechtsbedingte Unterschiede festzustellen waren. Die in den vorliegenden Untersuchungen ermittelten Summen der Aminosäuren – Mittelwerte lagen zwischen 3300 und 6030 nMol/l, wobei berücksichtigt werden muss, dass einige Aminosäuren, z.B. Asparagin, Serin, Prolin und Tryptophan, nicht mitbewertet wurden. Diese Werte stimmen mit den von Billard und Menezo (1984) und Walton et al. (1985) ermittelten Konzentrationen annähernd überein.

Wilson (1985) beschreibt in seiner Übersicht „Amino Acids and Proteins“ die Versuchsergebnisse von Lee u. Putnam (1973) und von Takeuchi u. Watanabe (1977), die für Regenbogenforellen einen starken Einfluss des Eiweißgehalts im Futter auf Wachstum und Energieversorgung des Körpers beobachteten. Je nach Entwicklungsstand soll das Futter einen Proteinanteil von 50 – 35 % haben.

Wurde Regenbogenforellen Futter mit verschiedenen Proteingehalten angeboten, so konnte Walton (1986b) nur geringe Konzentrationsveränderungen der Enzyme feststellen, die die Aminosäuren abbauen, d.h. sie zeigten nur eine geringe Anpassungsfähigkeit zur Verwertung der neuen Nahrung.

Tiews et al. (1973) Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Takeuchis; er beobachtete, dass die Wachstumsrate der Regenbogenforellen weitgehend unbeeinflusst von der Futterzusammensetzung ist.

Frame (1958) beobachtete bei einem erwachsenen männlichen Lachs, dass die Konzentration freier Aminosäuren schon 1 - 4 Stunden nach der Nahrungsaufnahme ein Maximum erreichte und 6 - 8 Stunden später wieder auf ihren Ausgangswert zurückgefallen war.

Delong et al. (1958) hat beim Quinnet (*Saumon quinnat*, *Oncorhynchus tshawytscha*) eine Steigerung des Proteinverbrauchs mit zunehmender Temperatur gefunden, die mit einer Zunahme des Energieumsatzes erklärt werden kann. Zeitoun et al. (1973) beobachtete einen erhöhten Proteinbedarf bei Regenbogenforellen, wenn der Salzgehalt steigt. Nach Smiths (1978) Berechnungen ist der Eiweiß-Energie-Umsatz beim Fisch wesentlich besser als der bei Vögeln und Säugern. Nach seiner Berechnung gewinnen Fische 74 %, Säuger und Vögel nur 59 % ihrer Energie aus Protein.

In seinen ausführlichen Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel der Karpfen (*Cyprinus carpio*) wies Böhme (Dissertation 1993) nach, dass sich die Aminosäuren-Konzentrationen im Hungerzustand nur wenig ändern. French et al. (1981) stellte bei Regenbogenforellen, die längere Zeit hungern mussten, eine Verdoppelung der Gluconeogenese aus Aminosäuren fest. Parallel dazu wurde eine entsprechende Zunahme der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Tätigkeit in der Leber gemessen. Daraus wurde geschlossen, dass Aminosäuren aus dem Muskeleiweiß möglicherweise die wichtigsten Substanzen sind, die die Forelle zur Aufrechterhaltung des Glucosespiegels benötigt oder zu Glykogen umsetzt (Nagai und Ikeda, 1971; Walton und Cowey, 1982).

In Hungerphasen ist bei den „Fett-Fischen“, z.B. Aal (*Anguilla anguilla*), der Abbau der Lipide in Leber und Muskel (Dave et al., 1975; Larsson und Lewander, 1973; Love, 1970) die Hauptenergiequelle für den Stoffwechsel). Die „Nicht-Fett-Fische“, z.B. Schollen, Karpfen und Forellen, decken ihren Energiebedarf hauptsächlich durch den Abbau von Proteinen bzw. Aminosäuren; erst danach werden die Glykogen- und Lipidreserven angegriffen (Driedzic und Hochachka, 1978; Love 1970). Durch diesen Abbau der Proteine bei den „Nicht-Fett-Fischen“ wird auch die Zusammensetzung der freien Aminosäuren im Plasma verändert. Besonders stark werden die quantitativ dominanten Aminosäuren wie z.B. Alanin, Glycin, Histidin, Lysin, Threonin, Serin und Glutamin katabolisiert (Knapp und Wieser, 1981).

Bei Fischen haben Aminosäuren einen großen Anteil an der gesamten osmotischen Konzentration in den Zellen. Cowey (1985) stellte im Plasma des Atlantischen Lachses, einem anadromen Wanderfisch, sehr hohe Taurin-Konzentrationen fest. Hegab und Hanke (1983) erkannten in den Aminosäuren Taurin und Glycin die wichtigsten osmoregulatorischen Effektoren in den Muskelzellen von *Oreochromis mossambicus*. Die Taurin-Konzentration veränderte sich parallel zur Natrium-Konzentration im Plasma der Tilapien. In Zusammenhang mit Coweys Erkenntnissen kann der Aminosäure Taurin (und Glycin?) eine regulatorische Aufgabe im Wasserhaushalt der Muskelzelle zugeschrieben werden. Untersuchungen darüber für die Konzentration des Taurins im Plasma der Regenbogenforelle stehen noch aus.

Nach Gluth u. Hanke (1984b) sind alle Schadstoffe Stressoren, die eine mehr oder weniger unspezifische Veränderung der Cortisol – und Glucose-Konzentration bewirken. Typische Reaktionen sind Erhöhungen der Blut-Glucose und der Cortisol-Konzentration. Die Leber wird durch Cortisol zum Glykogen-Abbau und /oder zur Gluconeogenese (aus Protein) angeregt. Die Glucose-Bereitstellung verringert den Bestand freier Aminosäuren im Plasma.

Schadstoffe sind Stressoren und stellen über eine vermehrte Abgabe von Cortisol, T₃ (Trijodthyronin) und Glucose den Körper auf Höchstleistung ein; das Herz reagiert entweder mit erhöhter Pumpleistung – was zu einer Zunahme der Muskulatur führen kann (Gewichtszunahme), oder die Schadstoffkonzentration ist derart hoch, dass eine Schädigung bzw. ein Abbau des Herzmuskels eintritt. Eine Gewichtsabnahme des Herzens wäre die Folge.

Der Katabolismus der Aminosäuren erfolgt in zwei Reaktionsschritten:

- a. nach der Desaminierung erfolgt eine Umwandlung zu Intermediärmetaboliten, die in den Citratcyclus eingeschleust werden können.
- b. diese Metaboliten werden zu H₂O und CO₂ oxidiert (Schramm, 1998).

Walton und Wilson (1986) konnten bei Regenbogenforellen schon zwei Stunden nach Gabe eines mit Casein angereicherten Futters eine Zunahme der freien Aminosäuren im Plasma nachweisen, wobei die Aminosäuren Alanin und Glycin 36 % der Gesamtaminosäurenkonzentration ausmachten (die Taurin-Konzentration wurde hierbei nicht beachtet). 12 Stunden nach der Fütterung zeigten die Aminosäuren Valin, Glutamin und Leucin höhere Konzentrationen als Glycin und Alanin. Diese fünf Aminosäuren (ALA, GLY, VAL, GLN und LEU) stellen mehr als 50 % der Plasma-Aminosäuren.

Nach Fütterung von Aminosäurengemischen (Schlisio u. Nicolai, 1978; Yamada et al., 1981) erreichten sie ihre höchste Konzentration im Plasma nach 12 Stunden bei einer Wassertemperatur von 10°C. Wurden Proteine als Futter angeboten (Nose, 1972; Yamada et al., 1981), konnten erst nach 24 Stunden die höchsten Aminosäurenkonzentrationen im Plasma nachgewiesen werden. Nach 24 h NEAA bzw. nach 48 h EAA (= Essential Amino Acid) ihrer Maximalkonzentrationen im Plasma waren die Konzentrationen der Aminosäuren im Plasma der mit Casein gefütterten Forellen wieder auf den Ausgangswert gesunken. Yamada et al. (1981) konnte erst 12 Stunden nach Gabe einer Proteindiät ein Ansteigen der Aminosäuren im Plasma der Forellen feststellen. Im Gegensatz zum Blutplasma war die Konzentration der freien Aminosäuren in der Leber auch Stunden nach der Fütterung nahezu unverändert. Der Warmwasser-Fisch Karpfen (*Cyprinus carpio*) erreichte maximale Konzentrationen der freien Aminosäuren schon nach 4 – 8 Stunden (Plakas et al., 1980).

Untersuchungen ergaben, dass für jede Aminosäure spezifische Enzyme die katabolische Startreaktion katalysieren. Waarde (1982) fand bei der Untersuchung verschiedener Gewebe auf Transaminierungsreaktionen, dass die Fischleber hohe Aktivitäten aufweist für den Abbau von Alanin, Asparaginsäure, Isoleucin, Leucin, Valin, Histidin und Tyrosin.

4.5.2 Vergleich der Ergebnisse

Die Literaturübersicht macht deutlich, dass Veränderungen in der Konzentration bestimmter Aminosäuren nicht einfach zu interpretieren sind. Bisher bietet die Literatur nur wenige Bezugspunkte zu Veränderungen im Aminosäurepool unter Schadstoffeinfluss.

Die Aminosäuren-Konzentrationen des Plasmas der für die Kontrolle und für die Schadstoffexposition vorgesehenen Tiere wurden bei den Versuchen mit 2 und 4 mg CA/l jeweils vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende bestimmt und auf ihre Signifikanz überprüft. Dazu wurde einmal ein Anfangs- und Endwertevergleich mittels U-Test (Mann/Whitney) und zweitens ein Paardifferenzenvergleich nach Wilcoxon (Anfangs- und Endwert-Differenz jeweils zwischen Kontrolle und behandelten Tieren) durchgeführt. Der Sinn eines doppelten Vergleichs ist eine möglichst genaue Erfassung von signifikanten Unterschieden.

Einen Vergleich der Differenzen der Mittelwerte in Prozent zwischen den Kontrolltieren und den exponierten Tieren von der 1 mg- über die 2 mg- zur 4 mg-CA/l-Konzentration zeigt Tab. 27. Die Konzentrationen der Aminosäuren zeigten verschieden starke Veränderungen in den einzelnen Schadstoffkonzentrationen.

Tab. 27: Die prozentualen Veränderungen der Mittelwerte zwischen Kontrolltieren und exponierten Tieren werden wiedergegeben. (-) bedeutet Abnahme, (+) Zunahme des Mittelwertes der exponierten Fische. Die statistisch signifikanten Unterschiede sind fett gedruckt.

Aminosäure	Versuch 1 1 mg CA/l	Versuch 2 2 mg CA/l	Versuch 3 4 mg CA/l
ASP	- 3	- 14	+ 4
GLU (+)	+ 13	+ 2	- 13
GLN	- 1	- 2	+ 16
GLY	- 3	- 18	0
THR EAA	+ 5	- 25	+ 5
HIS EAA	+ 9	- 13	- 9
CIT	----	+ 7	+116
ALA	- 6	- 17	- 16
TAU	- 13	- 20	- 29
ARG EAA	- 9	- 36	- 7
TYR	- 24	- 16	+ 76
VAL EAA	- 5	- 25	0
MET EAA	+ 2	- 9	+ 17
ILE EAA	0	- 10	+ 47
PHE EAA	- 1	- 29	+ 16
LEU EAA	- 3	- 33	- 9
LYS EAA	+ 12	- 38	- 8

Im Vergleich der Mittelwerte zwischen unbehandelten und exponierten Tieren ergaben sich signifikante Unterschiede.

Beim Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen zwischen den zur Kontrolle vorgesehenen Fischen und den zu exponierenden Fischen gab es bei den drei Versuchen vor Versuchsbeginn keine signifikanten Unterschiede.

Nach Versuche wurden

bei Bewertung nach Methode 1 folgende Unterschiede festgestellt;

in Versuch 1 (1 mg CA/l): keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen,

in Versuch 2 (2 mg CA/l) für folgende Aminosäuren: THR, ALA, ARG, VAL, PHE, LEU und LYS,

in Versuch 3 (4 mg CA/l) war die Konzentration von Alanin erniedrigt, von Tyrosin und Isoleucin erhöht

Bei Bewertung nach Methode 2 ergeben sich für:

Versuch 1 (1 mg CA/l): keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen

Versuch 2 (2 mg CA/l): ein signifikanter Unterschied für Phenylalanin,

Versuch 3 (4 mg CA/l): vier signifikante Unterschiede, für Glutaminsäure, Citrullin, Tyrosin und Isoleucin.

Die geringeren Aminosäurenkonzentrationen der zwei Nahrungsverweigerer in Versuch 2, die zunehmende Zahl der Nahrungsverweigerer in Versuch 3 beeinflussten stark den Mittelwert der Aminosäurenkonzentrationen, aber auch die Werte der Normalfresser unter den exponierten Tieren waren zumindest tendenziell von denen der Kontrollfische verschieden.

Wie sind diese Befunde zu erklären? Unter den kleinen Schadstoffkonzentration sind die ASK im Plasma kleiner, möglicherweise liegt schon ein Abbau vor. Die Unterschiede, wie sie sich besonders bei Versuch 2 tendenziell und statistisch feststellbar ergaben, können durch Hemmung der Aufnahme oder durch verstärkten Abbau der ASK erklärt werden. Grundsätzlich wäre auch eine erhöhte Proteinsynthese denkbar, die zu Abnahme des Aminosäurespiegels führen könnte. Letzteres erscheint wenig wahrscheinlich, da unter der Wirkung aller Schadstoffkonzentrationen zumindest tendenziell eine Gewichtsabnahme feststellbar war. Die im Vergleich zu den Kontrolltieren höheren ASK unter 4 mg CA/l könnten durch einen verstärkten Organabbau verursacht worden sein, wodurch sich eine höhere Plasmakonzentration erklären ließe.

Diese Hypothesen wären selbstverständlich durch Untersuchungen zu verifizieren.

Überblick über mögliche Ursachen der Veränderung der Aminosäurenkonzentrationen:

- A. Welche Ursachen können zu einer **Abnahme** der Konzentration führen?
 1. erhöhter Verbrauch für Proteinsynthesen
 2. erhöhter Abbau der Aminosäuren
 3. verringerte Bereitstellung durch Proteinabbau
 4. verringerte Aufnahme durch fehlende oder veränderte Transportproteine
 5. Verbrauch durch Gluconeogenese

B. Welche Ursachen können eine **Zunahme** der Aminosäurekonzentration bewirken?

1. verstärkter Proteinabbau
2. Hemmung des Verbrauchs für Synthesen
3. Hemmung des Abbaus

Bei keiner Versuchsreihe waren vor Versuchsbeginn signifikante Unterschiede in den ASK zwischen den für die Kontrolle und den für die Schadstoffexposition vorgesehenen Tieren festgestellt worden. Folglich können die aufgetretenen signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und behandelten Tieren nach der Schadstoffexposition nur auf 3 Ursachen zurückgeführt werden:

- a. Aminosäuren-Konzentrationsveränderungen, die bei fast allen Individuen einer Gruppe nach Behandlung auftraten und im Mittel zu einem signifikanten Konzentrationsunterschied führten. Diese Veränderungen sind dann eindeutig als Effekt der Schadstoffeinwirkung in Verbindung mit einer jahreszeitlichen Prädisposition zu deuten.
- b. Individuelle größere As-Konzentrationsunterschiede zwischen den Fischen nach Behandlung einer Gruppe, die den Mittelwert erheblich verschieben (Vergleich vor Versuchsbeginn bei zwei Versuchen).
- c. Individuell große Aminosäuren-Konzentrationsunterschiede durch Nahrungsverweigerung. Dies ist dann ein Sekundäreffekt des Schadstoffs.

Welche Funktionen übernehmen nun diese sieben Aminosäuren im Metabolismus der Zelle, deren Konzentrationsdifferenzen zwischen unbehandelten und exponierten Tieren in den Konzentrationen von 2 und 4 mg CA/l sich signifikant unterschieden? Bis auf Alanin sind alle genannten Aminosäuren essentielle Aminosäuren.

Für **Threonin** (THR) führen Walton und Cowey (1981) drei Möglichkeiten auf, wie sie in Säugern abgebaut werden kann:

Threonin wird durch die Threonin-Aldolase zu Glycin und Acetaldehyd abgebaut,

Threonin wird durch die Threonin-Desaminase zu Ammonium und alpha-Ketobuttersäure abgebaut,

Threonin wird durch die Threonin-Dehydrogenase zu Aminoaceton umgesetzt.

Abbaureaktion (1) kann in der Regenbogenforelle nicht ablaufen, da in ihrer Leber keine Threonin-Aldolase nachgewiesen werden konnte. Die Enzyme für die Abbaureaktionen (2) und (3), die im Cytosol bzw. in den Mitochondrien stattfinden, konnten nur in sehr geringer Konzentration gefunden werden.

Die Plasma-Konzentration der Aminosäuren Threonin, Serin und Asparagin erhöht sich leicht bei euryhalinen Tilapien (*Oreochromis mossambicus*) nach Überführung in höhere Salzkonzentrationen (Assem u. Hanke, 1983). Die Threonin-Konzentration stieg dabei auch in der Muskulatur an, jedoch nicht in der Leber. Die Konzentration im Cytosol ist mit 3 mMol/kg zu gering, um Einfluss auf die Osmoregulation der Zelle nehmen zu können. 4-Chloranilin könnte sowohl eine anregende Wirkung auf die das Threonin abbauenden Enzyme hervorgerufen (Versuch 2) oder über einen verstärkten Pro-

teinabbau eine Zunahme der Konzentration bewirkt haben. (Weitere Lösungen s. S. 113/114: B 2. und 3). Zur Klärung dieser Frage sollten exponierte Tiere auf eine Zunahme der Threonin abbauenden Enzyme und auf eine Konzentrationsabnahme der THR-Transportproteine überprüft werden.

Alanin (ALA), zeigte im Vergleich zu den unbehandelten Tieren eine um 17 % geringere Konzentration im Plasma (Versuch 2) auf. Alanin wird bei den meisten Organismen durch Transaminierung mit Glutamat gebildet. Der Abbau zu Pyruvat erfolgt durch Transaminierung mit 2-Oxoglutarat. Eine der wichtigen Aufgaben des Alanins ist die Lieferung von NH_3 - Gruppen in nicht-toxischer Form in die Leber (Lehninger, 1987; Kim et al., 1992). NH_3 entsteht im Muskelgewebe durch den Abbau der Aminosäuren. In der Leber kann Ammoniak zu Harnstoff umgesetzt werden, der dann über die Nieren ausgeschieden wird. Knochenfische scheiden den Aminostickstoff hauptsächlich über die Kiemen aus (ammonotelische Tiere). Dieser Transportaufgabe entsprechend ist die Konzentration der Aminosäuren Alanin und Glutamin im Plasma meist höher als die der anderen (Glucose-Alanin-Cyclus). Alanin und Glycin sind die NEAA, die in höchster Konzentration im Plasma der Regenbogenforelle vorkommen (bis zu 36 % der totalen Aminosäuren-Konzentration, wenn man die Taurin - Konzentration nicht beachtet (Walton u. Wilson, 1986), allerdings in ihren Konzentrationen auch abhängig von der aufgenommenen Nahrung (Nose, 1972; Schlisio u. Nicolai, 1978; Kaushik u. Luquet, 1979; Yamada et al., 1981). Kim et al. (1992) hat Alanin als Carrier des Aminosäure-Stickstoffs und - Kohlenstoffs beschrieben und vermutet, dass sie im Glucose-Alanin-Cyclus beim Fasten und bei Bewegungsabläufen eine wichtige Rolle spielt.

Die Aminosäuren Alanin, Serin und Glycin werden bei Regenbogenforelle und Aal zur Glucose- oder Glykogensynthese eingesetzt (Cowey et al., 1977a; Walton u. Cowey, 1979a, b; Hayashi u. Ooshiro, 1977, 1979; Renaud u. Moon, 1980).

Beim stenohalinen Karpfen (*Cyprinus carpio*) konnte beim Übergang in höhere Salzkonzentration eine Zunahme der Alanin - Konzentration im Leber- und Muskelgewebe nachgewiesen werden, wobei die Konzentrationszunahme in der Leber höher war als im Muskelgewebe (Hegab u. Hanke, 1983). Während die Alanin - Konzentration im Muskelgewebe konstant blieb, schwankte sie in der Leber; Gründe dafür waren nicht zu erkennen.

Alanin kommt in der Fisch- und Säugetiermuskulatur die Rolle eines Lieferanten für den Aminosäuren-Stickstoff und – Kohlenstoff zu. Die Alanin- und Glutamin-Konzentrationen sind oft die den Stoffwechselumsatz in der Leber begrenzenden Aminosäuren. Einzelne Aminosäuren sind an der Funktion von Transportsystemen beteiligt (Mailliard et. al., 1995).

Bei der Vielfalt der Verknüpfungen der Aminosäure Alanin im Metabolismus ist es nicht möglich, ohne weitere Untersuchungen genaue Aussagen über die Wirkung des 4-Chloranilins zu machen. Ein erster Angriffspunkt des Chloranilins könnten die zur Alanin - Bildung eingesetzten Transaminasen sein. Veränderungen ihrer Konzentrationen unter Chloranilin sollten überprüft werden (s. S. 113/114: A 2, A 4).

Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren wies **Arginin** (ARG) bei CA - exponierten Tieren eine um rund 36 % geringere Konzentration in der 2 mg CA/I-Konzentration und eine 7 % geringere Konzen-

tration in der 4 mg CA/I – Lösung auf. Arginin ist eine essentielle Aminosäure und muss mit der Nahrung aufgenommen werden; sie wird von Mikroorganismen und Pflanzen aus der nichtessentiellen Aminosäure Glutamat gebildet. Ihr Abbau in der Zelle geht über Glutamat zu 2-Oxoglutarat, das dann in den Tricarbonsäure-Cyclus (TCC) eingeschleust wird. Bei ureotelischen Tieren findet im Harnstoffcyclus ein Auf- und Abbau von Arginin statt (Ornithin → Citrullin → Arginin u. u.). Proteine, die einen hohen Anteil an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin aufweisen, sind z.B. Histone. Histone sind Strukturproteine der Eukaryonten-Chromosomen. Von den fünf Hauptklassen haben die Histone-Klassen H3 und H4 mehr Arginin als Lysin und werden deshalb als argininreich bezeichnet. Durch Versuche mit suboptimaler Arginin-Versorgung konnte Rodehutschord et al. (1995) bei Regenbogenforellen eine Eigensynthese von Arginin nachweisen.

Das Enzym Arginase baut Arginin zu Harnstoff und Ornithin ab. In der Leber mehrerer Salmonidenarten (Onishi u. Murayama, 1969; Walton u. Cowey, 1981) konnten Arginase-Konzentrationen nachgewiesen werden. Während diese Konzentration mit zunehmender Reife im männlichen Geschlecht steigt, nimmt sie im weiblichen ab. Bei vielen anderen Fischarten wurde Arginase in folgenden Organen nachgewiesen: Leber, Nieren, Herz, Galle, Kiemen, Ovarien, Hoden und in der Muskulatur. Das Enzym kommt sowohl in den Mitochondrien wie im Cytosol der Leberzellen von Regenbogenforellen vor (Walton u. Cowey, 1979b). Fleischfressende Arten hatten eine höhere Arginase - Konzentration in ihren Organen als pflanzenfressende (Cvancara, 1969). Fauconneau et al. (1992) erkannten eine wachstumsfördernde Funktion des Arginins. Fütterungsversuche von Kim et al. (1992) ergaben, dass der Arginin - Bedarf der Forelle wesentlich höher ist als der der Säugetiere: 1,4 % Arginin im Futter für Forellen stehen 0,6 % im Futter für Schweine gegenüber (NRC, 1988). Als ammonotelische Tiere bilden die Forellen über den Harnstoff-Cyclus wenig Arginin (Walton and Cowey, 1977). Die Enzyme des Harnstoff-Cyclus wurden alle in der Leber der Salmoniden nachgewiesen (Huggins et al., 1969), aber einige sind in so geringer Konzentration vorhanden, dass die Existenz eines Harnstoff-Cyclus unwahrscheinlich erscheint. Die Funktion des Arginin liegt also mehr in seiner Beteiligung am Aufbau von Strukturproteinen. Da unter Chloranilineinfluss die Arginin-Konzentration sank, kommt eine schädigende Wirkung des Chloranilins auf die Transportproteine in Frage, was zu überprüfen wäre (s. S. 113/114: A 4).

Der Vergleich der Mittelwerte für Valin (VAL) zeigte für die Schadstoff exponierten Tiere einen Rückgang um rd. 25 % für die 2 mg CA/I – Konzentration (signifikant), in der 4 mg CA/I -Konzentration lag keine Veränderung vor, d.h. die Mittelwerte der Aminosäurekonzentration der Kontrolltiere und der exponierten Tiere waren gleich. Der Vergleich der Differenzen der Mittelwert-Differenzen zeigt weder in der 2 - noch in der 4 mg CA/I – Konzentration signifikante Unterschiede. In der 2 mg CA/I- Konzentration ist der Unterschied zwischen unbehandelten und exponierten Tieren jedoch wesentlich größer (69 %), ohne Signifikanzniveau zu erreichen.

Im Plasma der Regenbogenforelle macht Valin zusammen mit den Aminosäuren Alanin, Glycin, Glutamin und Leucin mehr als die Hälfte aller Aminosäuren aus (Walton et al., 1986). Valin wird desaminiert und gelangt über Succinyl-CoA in den Citratcyclus. Angaben über die Bedeutung Valins für bestimmte Synthesen konnten keine gefunden werden.

Walton und Cowey bemerkten schon 1982, „dass es für die Enzyme, die in den Katabolismus der Aminosäuren Asparagin, Cystin, Cystein, Isoleucin, Lysin, Methionin, Prolin und Valin eingreifen, keinerlei Hinweise gibt, obgleich ihre Existenz aus Experimenten gefordert werden muss“. Bei Salvatores' et al. (1965); Stieber u. Cvancara (1977) Leberpräparationen mit diesen Aminosäuren wurde Ammoniak freigesetzt, was auf die Existenz dieser Enzyme schließen lässt.

Becker (1997) beschreibt in seiner Dissertation, dass bei suboptimaler Versorgung der Regenbogenforellen mit Valin eine geringere Nahrungsaufnahme beobachtet wurde, die sich bis zur Nahrungsverweigerung steigerte. Ein Grund für die Signifikanz bei der 2 mg CA/I-Konzentration könnte in der Jahreszeit liegen. Im Frühjahr beginnt das Wachstum mit all den dazugehörigen Stoffwechselveränderungen. Chloranilin könnte inhibitorisch auf einen oder einige dieser metabolen Wege wirken, was im Einzelfall noch zu überprüfen wäre (s. S. 113/114: A 1, A 4).

Der Vergleich der Mittelwert-Differenzen ergab für **Phenylalanin** (PHE) eine Abnahme von 29 % für die Schadstoff exponierten Tiere in der 2 mg CA/I-Konzentration, eine Zunahme von 16 % in der 4 mg CA/I-Konzentration. Beim Abbau wird Phenylalanin durch die Phenylalanin - Hydroxylase zu Tyrosin oxidiert. Dieses Enzym wurde in der Leber von Forellen und sechs anderen Fischarten nachgewiesen (Voss u. Waisman, 1966). Phenylalanin ist die Ausgangssubstanz für die Catecholamine, Tyrosin, Thyroxin, Melanin und für die morphinähnlich wirkenden Hormone, die Endorphine. Für Hormonsynthesen besteht stets ein hoher Bedarf an Phenylalanin.

Bei bestimmten Lebererkrankungen können die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Methionin nur mangelhaft metabolisiert werden; es kann zur Anreicherung dieser Aminosäuren im Gehirn kommen. Parallel dazu nimmt die Konzentration der Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin ab. Diese Veränderungen rufen eine Störung der Gehirnleistung hervor: Gedächtnisstörungen, mangelnde Konzentrationsfähigkeit, Verlangsamung der Reaktion und Bewusstlosigkeit können die Folge sein. Mangelerscheinungen für Fische wurden noch nicht beschrieben. Die relativ hohe Abnahme des Phenylalanins im Frühjahr (2 mg CA/I) kann mit der erhöhten Leistungsanforderung (Stress) und mit der Jahreszeit erklärt werden (s. S. 113/114: A 1, A 3), die Zunahme im November eher mit einer beginnenden Schädigung des Stoffwechsels durch die höhere CA-Konzentration (s. S. 113/114: B 1 – B 3). Diese Hypothese sollte durch Versuche mit höheren Schadstoffkonzentrationen überprüft werden.

Die **Glutamin** (GLN) – Konzentration im Plasma erhöhte sich bei den in 4 mg CA/I exponierten Forellen um rund 16 %, bei den mit 2 mg CA/I behandelten Tieren nahm sie um 2 % ab. Walton u. Cowey (1982) konnten im Tiergewebe zwei verschiedene Glutaminasen nachweisen, die beide Glutamin zu Glutaminsäure und Ammoniak metabolisieren. Glutaminase I ist Phosphat abhängig und wird durch Glutaminsäure gehemmt; Glutaminase II ist Phosphat unabhängig. In der Regenbogenforelle konnte nur die Glutaminase I in Leber, Kiemen und Nieren nachgewiesen werden (Walton u. Cowey, 1977). Assem u. Hanke (1983) beobachteten beim euryhalinen *Oreochromis mossambicus* mit der Überführung in höhere Salzkonzentrationen eine Zunahme der Glutamin-Konzentration in der Leber.

Glutamin übernimmt bei vielen biosynthetischen Reaktionen die Rolle des Ammoniaklieferanten (Lehninger et al., 1998). Es ist mit seiner Amidgruppe an der Biosynthese von Hexosaminen beteiligt, es

fördert die Regeneration von Mucoproteinen und des Darmepithels (Lexikon der Biochemie, 1999). Glutamin ist die Haupttransportform von Ammoniak.

Die Reaktionen zur Glutaminsynthese sind einfach:



Glutamin ist eine ungiftige neutrale Verbindung, die im Gegensatz zu Glutamat Zellmembranen leicht passieren kann (Lehninger et al., 1998). Nur in den Leberzellen kann das Enzym Glutaminase Glutamin zu Glutamat und NH_4 umwandeln. Hier könnte ein Angriffspunkt für Chloranilin sein: Chloranilin könnte inhibierend auf die Aktivität der Glutaminase wirken. Auch die Glutamin - Synthetase könnte in ihrer Wirkung durch Chloranilin gehemmt werden. Dieses Enzym, das aus zwölf Untereinheiten besteht, kann durch mindestens sechs Endprodukte des Glutaminmetabolismus sowie durch Alanin und Glycin allosterisch gehemmt werden. Jede der zwölf Untereinheiten kann durch acht Inhibitoren gehemmt werden. Jeder Inhibitor bewirkt für sich allein nur eine teilweise Hemmung. Die Wirkung der verschiedenen Inhibitoren verstärken sich jedoch gegenseitig und alle acht zusammen inhibieren das Enzym vollständig. Die Zufuhr von Glutamin zu Stoffwechselreaktionen, die Glutamin benötigen, kann somit kurzfristig eingestellt werden (Lehninger et al., 1998). Eine mögliche Wirkung von Chloranilin könnte nun einen oder mehrere dieser Inhibitoren so beeinflussen, dass seine / ihre Hemmwirkung teilweise oder ganz aufgehoben wird und somit mehr Glutamat zu Glutamin umgesetzt werden kann (s.S. 113/114: B 2).

Zum Abbau: Glutamin gibt unter Einwirkung der Glutaminase den Amid - Stickstoff an einen Akzeptor ab und wird zu Glutamat. Glutamat wird durch Glutamat-Dehydrogenase zu alpha-Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citrat-Cyclus. Chloranilin könnte die Glutaminase hemmen, doch die geringe Abnahme der Glutaminsäure-Konzentration (13 %) steht im Widerspruch zur relativ großen (16 %) Konzentrationserhöhung des Glutamins. Weitere Untersuchungen zu Veränderungen der Glutaminase-Konzentration unter CA-Einwirkung wären nötig.

Die **Citrullin** (CIT) – Konzentration nahm bei den in 2 mg CA/l gehaltenen Forellen um 7 %, bei den in 4 mg CA/l gehälteren um 116 % zu; diese Zunahme ist signifikant. Citrullin ist eine nichtessentielle und nicht proteinogene Aminosäure. Aus Carbamylphosphat und L-Ornithin bildet die Ornithin-Carbamyl-Transferase in der Mitochondrienmatrix der Leberzellen L-Citrullin, das ins Cytosol der Zelle gelangt. Im Cytosol reagiert Citrullin mit Aspartat und wird zu Argininsuccinat. Argininsuccinat-Lyase spaltet es in Fumarat und Arginin. Die Arginase spaltet Arginin in Harnstoff und Ornithin, das wieder in die Mitochondrienmatrix gelangt und als Akzeptor für eine neue Reaktion mit Carbamylphosphat zur Verfügung steht.

Wie kann man die hohe Konzentrationszunahme durch 4-CA erklären? Gegen eine Anregung des gesamten Harnstoffcyclus spricht die äußerst geringe Erhöhung der Arginin-Konzentration. Des Weiteren wäre eine Hemmung der Kondensationsreaktion zwischen der Aminogruppe von Aspartat und der Carbonyl-Gruppe von Citrullin denkbar; somit würde sich zwar kurzfristig eine Erhöhung des Citrullin-Niveaus ergeben, doch der Cyclus käme zum Erliegen, da weniger Arginin bzw. Ornithin zur Verfügung stünde.

Einen Angriffspunkt für Chloranilin im Harnstoff-Cyclus zu erkennen, ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht möglich; um so mehr, weil die Enzyme des Harnstoff-Cyclus auch bei unbehandelten Forellen kaum vorhanden sind. Möglicherweise kann Citrullin noch über andere Synthesewege aufgebaut werden. Die Bedeutung des Citrullins im Zusammenhang mit dem Harnstoffcyclus scheint relevant zu sein.

Tyrosin (TYR), eine nichtessentielle, proteinogene Aminosäure, nahm im Vergleich zu den unbehandelten Tieren in der 2 mg CA/I-Konzentration um 16 % ab, in der 4 mg CA/I-Konzentration nahm sie um 76 % zu. Tyrosin ist die Vorstufe von Melanin und Thyroxin. In Goldfischen konnte Abramowitz und Chavin (1978) Tyrosinase nachweisen. Tyrosin und alpha-Ketoglutarat werden durch die Tyrosin-Aminotransferase (TAT) zu Glutamat und Hydroxyphenylpyruvat umgesetzt (Walton u. Cowey, 1981). Dieses Enzym – TAT – konnte in mehreren Salmoniden nachgewiesen werden (Fellman et al., 1971; Bell, 1968; Nemeth u. Jurani, 1974). Das Enzym ist spezifisch für alpha-Ketoglutarat als Amino-Akzeptor und spielt vermutlich eine Rolle beim Eiweißabbau und der Gluconeogenese. Beim Bachsai- bling (brook trout) gehen die Tyrosin-Konzentrationen während der Eizellreifung und bei Estradiolbe- handlung zurück (Whiting u. Wiggs, 1977, 1978).

Beim Tyrosin-Abbau werden Teile des Kohlenstoffskeletts zu Acetoacetyl-CoA / Acetyl-CoA, das im Citratcyclus weiter metabolisiert wird (Lehninger et al., 1998). Die Zunahme der Tyrosin-Konzentration bei den behandelten Fischen im Spätherbst könnte mit einer Hemmwirkung des Chloranilins auf die Tyrosin abbauenden Enzyme erklärt werden (s.S.114: B 2, B 3), die Abnahme im Frühjahr kann auf die Gonadenreifung zurückgeführt werden (s.S. 113/114: A 1).

Beim Vergleich der Mittelwert-Differenzen von **Isoleucin (ILE)** wiesen die einer Konzentration von 4 mg CA/I exponierten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Tieren eine um 47 % höhere Kon- zentration auf, in der 2 mg CA/I-Konzentration lag eine Abnahme von 10 % vor. Isoleucin ist eine es- sentielle und proteinogene Aminosäure. Ihr Aufbau kann über zwei verschiedene Synthesarten erfol- gen:

- aus Aspartat über Threonin zu Isoleucin
- aus Pyruvat zu Isoleucin

Die Isoleucin – Synthese beschreibt Campbell (1997) als ein gutes Beispiel für eine feedback- Hemmung. Fünf Enzyme sind an der Isoleucin-Synthese beteiligt; die zunehmende ILE-Konzentration hemmt die weitere ILE-Synthese dadurch, dass sie als allosterischer Inhibitor sich mit dem Enzym, der Threonindesaminase verbindet, das Threonin im ersten Schritt katalysiert. Isoleucin gehört zu den ketogenen Aminosäuren. Das Kohlenstoffskelett wird über Acetyl-CoA und Propionyl-CoA zu Succinyl- CoA abgebaut, das ein Zwischenprodukt im TCC ist (Lehninger et al., 1998).

Da Isoleucin als essentielle Aminosäure aufgenommen werden muss, könnte die 4 mg CA/I- Konzentration eine oder mehrere der für den Abbau des Isoleucins zuständigen Enzyme inhibieren (s.S. 113/114, B 2). Die Abnahme in der 2 mg CA/I-Konzentration im Frühjahr kann der Stoffwechsel steigernden Wirkung des Chloranilins zugeschrieben werden (s. S. 113/114: A 1). Untersuchungen im Herbst mit dieser Konzentration könnten Aufschluss darüber geben, inwieweit auch die Jahreszeit die Isoleucin-Konzentration beeinflusst.

Über die Funktion von **Leucin** (LEU) finden sich wenige Angaben in der Literatur. Neben Alanin (9 %) und Lysin (7 %) ist Leucin die Aminosäure, die in Proteinen als zweithäufigste (7,5 %) vorkommt (Lehninger, 1998). Sie ist beteiligt am Lysin -Transport. Zwischen Leucin und Isoleucin, Arginin und Lysin wie auch zwischen Valin und Serin stellten Kaushik und Luquet (1976) einen Antagonismus fest. Der Leucin-Abbau erfolgt über Acetyl-CoA und / oder Acetoacetyl-CoA. Bei einem zu hohen Leucin-Gehalt im Futter beobachtete Choo et al. (1991) pathologische Veränderungen an Haut, Flossen und Wirbelkörpern.

Beim Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren-Konzentrationen von unbehandelten und behandelten Tieren nach der Exposition in einer 2 mg CA/l – Konzentration haben sieben Aminosäuren (Threonin, Alanin, Arginin, Valin, Phenylalanin, Leucin und Lysin) signifikant geringere Konzentrationen als die Kontrolltiere. Insgesamt nahmen die Mittelwerte der Konzentrationen von 15 Aminosäuren ab, nur zwei nahmen zu (GLU und CIT, Tab. 17). Mit Ausnahme von Threonin nehmen die Konzentrationen der genannten Aminosäuren auch beim Vergleich der Differenzen der Mittelwert-Differenzen ab.

In der 4 mg CA/l – Konzentration nahmen die Mittelwerte der Konzentrationen von Glutamin, Citrullin, Tyrosin, Methionin, Isoleucin und Phenylalanin bei den behandelten Tieren deutlich zu (mehr als 15 %). Signifikante Unterschiede lagen vor Alanin, Tyrosin (Abnahmen) und Isoleucin (Zunahme, Tab. 22). In diesem Versuch waren es acht Aminosäuren (ASP, GLN, THR, CIT, TYR, MET, ILE und PHE), deren Konzentrationen zugenommen hatten.

Worauf können diese Veränderungen der Aminosäuren-Konzentrationen durch den Schadstoff 4-Chloranilin zurück geführt werden? Verschiedene Lösungen sind denkbar (s. auch S. 113/114):

4-Chloranilin hemmt den Aminosäure - Abbau durch Beeinflussung der Enzyme oder Transportproteine, die für Aufnahme und Weiterleitung der Aminosäuren zuständig sind. 4-Chloranilin oder dessen Metaboliten 4 – Chlornitroso - und 4 – Chlornitrobenzol verändern die Enzyme / Transportproteine derart, dass ihre Erkennungs – bzw. Bindungsfähigkeit eingeschränkt wird oder verloren geht. 4-Chloranilin, ein Stressor, fördert den Aminosäure – Abbau zur Energiegewinnung; die Gluconeogenese aus Aminosäuren wird gesteigert.

Die Produktion von Wirkstoffen gegen den Stressor wird angeregt; aus Phenylalanin / Tyrosin werden Catecholamine synthetisiert. Als weitere Möglichkeiten, auf eine Stressreaktion zu reagieren, muss die verstärkte Aufnahme von Aminosäuren aus dem Darm sowie eine Veränderung der Na⁺-Ionen-Konzentration erwähnt werden, die zusammen mit ATP in die Aufnahme mehrerer Aminosäuren eingreift (Ward 1982). Veränderungen der Methionin -/ Cystein - bzw. Taurin - Konzentration ermöglichen den Zellen, auf Konzentrationsveränderungen des Außenmediums zu reagieren.

Welche Schlussfolgerungen kann man aus den Ergebnissen ziehen?

Alle eingesetzten 4-CA-Konzentrationen bewirkten Effekte tendenzieller Art oder statistisch abgesicherte Wirkungen bei einzelnen Parametern. So bewies die Arbeit, dass in eine Untersuchung mög-

lichst viele biologische Merkmale einbezogen werden sollten, was eigentlich selbstverständlich ist. Die Miterfassung der Aminosäurenkonzentration erwies sich als sehr wertvoll.

Bei Prüfungen auf Schadstoffwirkung erwartet man allgemein, dass sich parallel zu den eingesetzten höheren Schadstoffkonzentrationen auch die dadurch bewirkten Effekte verstärken. Allerdings zeigte sich in vielen Versuchen zur Toxizität unterschiedlicher Stoffe, dass vor Einsetzen einer negativen Wirkung auch zunächst positive Effekte innerhalb eines eng begrenzten Konzentrationsbereiches eintreten können. Solche positiven Effekte lassen sich unter anderem als Kompensation auf eine Streßreaktion deuten.

In dieser Arbeit entsprachen die Quotienten Herz- / Körpergewicht und Leber- / Körpergewicht dieser Erwartung; der Vergleich der Mittelwerte der Herz- und Lebergewichte und der Korpulenzfaktoren zwischen Kontrolltieren und exponierten Tieren ergab keine signifikanten Unterschiede. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gab es bei dem Parameter Längenzunahme in den 1 und 4 mg CA/l - Konzentrationen der Herbstversuche. Wider Erwarten zeigte der Versuch mit 2 mg CA/l im Frühjahr keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die reduzierte Gewichtszunahme war signifikant verschieden in der 4 mg CA/l - Konzentration.

Die größten Unterschiede zwischen den Gruppen in der relativen Anzahl der Blutzellen ergaben sich für die 2 mg CA/l – Konzentration des Frühjahrs und nicht, wie zu erwarten gewesen wäre, für die 4 mg CA/l – Konzentration im Spätherbst. Die gleichen Widersprüche im Ergebnis zeigten die Aminosäurenkonzentrationen. Beim Vergleich der Endwerte (Methode 1) waren sieben Aminosäuren signifikant verschieden in Versuch 2 (2 mg CA/l) und nur drei in Versuch 3. Der Vergleich der Differenzen der Mittelwert-Differenzen (Methode 2) ergab in Versuch 2 einen, in Versuch 3 waren es vier signifikante Unterschiede. Die Auswertung nach dieser Methode zeigt also keinen Widerspruch. Auch das Auftreten von drei Nahrungsverweigerern in Versuch 2 und von fünf Nahrungsverweigerern in Versuch 3 weist eindeutig auf schadstoffbedingte Stoffwechselveränderungen hin. Mit den Ergebnissen der Bestimmung der Aminosäuren-Konzentrationen im Plasma der Fische kann die Empfindlichkeit dieser Methode bestätigt werden. Da eine Konzentration von 1 mg CA/l schon geringe Veränderungen der ASK im Plasma der Fische bewirkte, wie aus den Standardabweichungen geschlossen, erscheint es durchaus sinnvoll, weitere Versuche mit anderen Substanzen in dieser Art durchzuführen, sofern alle anderen Parameter (z.B. jahreszeitliche Veränderungen) in der Auswertung mit berücksichtigt werden können.

Die Ergebnisse für die Parameter Längenzunahme, Anzahl der relativen Blutzellen in Versuch 2 und die Anzahl der signifikanten Konzentrationsunterschiede (nach Methode 1) entsprechen nicht der Versuchserwartung. Welche Erklärungen für die genannten Widersprüche gibt es? Eine Antwort liegt in den verschiedenen Jahreszeiten, in denen die Versuche durchgeführt wurden. Der Stoffwechsel der Fische unterliegt einem Jahresrhythmus, der zu beachten ist. Die Frühjahrestiere reagierten auf die geringere Konzentration empfindlicher als die Tiere auf die doppelt so hohe Konzentration im Späthjahr. Die eingesetzten Versuchstiere unterschieden sich auch im Alter, das sich in unterschiedlichen Stoffwechselleistungen auswirken kann. Jahreszeit und Alter der Versuchstiere müssen in zukünftigen Versuchen beachtet werden, doch die genetisch vorgegebenen, individuellen Reaktionsnormen bleiben. Diese biologische Schwankungs- oder Streubreite der Tiere erschwert die Bestimmung eines

Schadstoffgrenzwertes. Deshalb wäre anzustreben, möglichst genetisch einheitliche Tiere aus bekannter und hierfür eingerichteter Zucht einzusetzen. Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte kann diese Methode zur Nachahmung empfohlen werden.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu überprüfen, welche Parameter sich bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) unter Einfluss von 4-Chloranilin verändern. Regenbogenforellen wurden über vier Wochen drei verschiedenen Konzentrationen – 1, 2 und 4 mg Chloranilin/l – ausgesetzt.

- a. Eine signifikant geringere Gewichtszunahme von 14% ist erst in der höchsten Chloranilin – Konzentration von 4 mg CA/l aufgetreten. Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren zeigten die in 1 mg CA/l gehaltenen Fische eine Abnahme des Mittelwertes von 10,4%, die in der 2 mg CA/l – Konzentration gehaltenen Tiere wiesen eine Zunahme des Mittelwertes von 4,6% auf.
- b. Die Mittelwerte der Körperlängenzunahme war bei den Tieren signifikant geringer, die der 1 – und 4 - mg CA/l – Konzentration (- 3,6% bzw. -3,5%) ausgesetzt waren.
- c. Beim Vergleich der Mittelwerte der Korpulenzfaktorendifferenzen, der Mittelwerte von Herz- und Lebergewichten der Kontrolltiere und der exponierten Tiere sind in allen Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede aufgetreten.
- d. Die Mittelwerte der Quotienten Leber - / Körpergewicht unterschieden signifikant zwischen unbehandelten und behandelten Tieren in der 2 – und 4 – mg CA/l – Konzentration (21% bzw. 27%).
- e. Die Mittelwerte der Quotienten Herz - / Körpergewicht waren in der 1 mg CA/l – Konzentration nicht signifikant, in der 2 – und 4 – mg CA/l – Konzentration jedoch signifikant verschieden (28% bzw. 20%).
- f. Die relative Zahl der Erythroblasten II, der Proerythrozyten und Spindelzellen war signifikant geringer bei den Fischen in der 2 mg CA/l – Konzentration. In der 4 mg CA/l – Konzentration war nur die relative Zahl der reifen Erythrozyten signifikant geringer als bei den unbehandelten Tieren.
- g. Beim Vergleich der Mittelwerte der Aminosäuren – Konzentrationen am Versuchsende haben in der 2 mg CA/l - Konzentration sieben Aminosäuren (THR, ALA, ARG, VAL, PHE, LEU und LYS) signifikant niedrigere Konzentrationen. In der 4 mg CA/l – Konzentration waren nur die Aminosäuren Alanin, Tyrosin und Isoleucin signifikant verändert, wobei der Mittelwert von Alanin der exponierten Tiere geringer (16%), die Mittelwerte von Tyrosin (43%) und Isoleucin (32%) der exponierten Tiere größer waren als die der Kontrolltiere.
- h. Vergleicht man die Veränderungen der Aminosäuren-Konzentrationen zwischen Versuchsende und -beginn, so lag für die 1 mg CA/l – Konzentration kein Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Tieren vor, in der 2 mg CA/l – Konzentration ergab sich ein Unterschied für Phenylalanin (-169%). In der 4 mg CA/l – Konzentration waren es vier Aminosäuren – Glutamin, Citrullin, Tyrosin und Isoleucin – deren Konzentrationen signifikant höher waren.
- i. Einen wichtigen Hinweis für die Wirkung des Schadstoffs liefert die Zahl der Nahrungsverweigerer: in der 1 mg CA/l – Konzentration gab es keine, in der 2 mg CA/l – Konzentration gab es drei und in der 4 mg CA/l – Konzentration traten fünf Nahrungsverweigerer auf.

5. Summary

The objective of this paper was to examine which parameters will vary in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under the influence of 4-chloroaniline (ca). Rainbow trout were exposed to three different concentrations of chloranilin (1-, 2, 4 mg ca/l) over a period of four weeks.

- a. A significantly minor decrease in weight (-14%) could only be evidenced at the highest chloranilin concentration of 4 mg ca/l. In comparison to the nontreated control, the percentage in weight loss in the 1 mg treated samples was 10,4% and in the 2 mg treated samples the trout evidenced a weight gain of 4,6%.
- b. The mean value of increase in body length was significantly less in the animals which were exposed to the 1- and 4 mg ca/l treatment (-3,6% and -3,5%).
- c. No significant differences resulted in any tested concentration, when comparing the mean values of the differences of the corpulence-factors (or condition-factor) and the mean values of heart and liver weights between treated and nontreated fishes.
- d. The mean values of the quotient liver weight / body weight was significantly different between treated and nontreated animals at the 2 – and 4 mg ca/l concentration.
- e. The mean value of the quotient heart weight / body weight was of no significant difference to the control in the 1 mg ca/l treatment, it was, however, significantly different in the 2 – and 4 mg ca/l treatment.
- f. In comparison to the nontreated animals the relative number of the erythroblast II, the proerythrocytes and thrombocytes was significant less in the 2 mg ca/l concentration. In the 4 mg ca/l concentration there was only the relative number of the matured erythrocytes which was less significant in comparison to the nontreated animals.
- g. The comparison of the mean value of the amino acid concentrations at the end of the experiment to the control indicates for the 2 mg ca/l concentration, that the mean values of seven amino acids were significantly lower: threonin, alanin, arginin, valin, phenylalanin, leucin and lysin. In the 4 mg ca/l treated sample only the amino acids alanin, tyrosin and isoleucin showed significant differences at the end of the experiment. The mean value of the alanin concentration was smaller in 16% of the treated animals. The mean value of tyrosin concentration increased by 43% and the mean value of isoleucin was higher by 32% than in nontreated animals.
- h. When comparing the changes of amino acid concentrations from the beginning of the experiment, with those at the end, no differences were noted between nontreated and treated animals at the 1 mg ca/l concentration. The 2 mg ca/l concentration showed an influence in phenylalanin content (-169%). In the 4 mg ca/l treatment, the concentration of four amino acids: glutamin, citrullin, tyrosin and isoleucin evidenced significant differences in treated and nontreated animals.
- i. An important reference to the effect of the pollutant is the increasing number of food refusers with increasing pollutant concentration.

6. Literaturverzeichnis

- ABLETT, R.F., SINNHUBER, R.O. UND SELOVONCHICK, D.P. (1981): The effect of bovine insulin on [14C] glucose and [3H] leucine incorporation in fed and fasted rainbow trout (*Salmo gairdneri*)
Gen.Comp. Endocrinol. 44: 418-427
- ABRAMOWITZ, J. UND CHAVIN, W. (1978): Comparison of tyrosinase activity in the integument of xanthic and albino goldfish. Comp. Biochem. Physiol. 60B: 81-85
- ADELMAN, I.R. UND SMITH, L.L.JR. (1976): Fathead Minnows (*Pimephales promelas*) and goldfish (*Carassius auratus*) as standard fish in bioassay and their reaction to potential reference toxicants. J. Fish. Res. Board Can., 33: 209-214
- AHNE, W. (1985): Untersuchungen über die Verwendung von Fischzellkulturen für Toxizitäts –bestimmungen zur Einschränkung und Ersatz des Fischtests. Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene I. Abt. Orig. B 180: 480-504
- ALBRECHT, M.-L. (1966): Das Hungervermögen des Karpfens (*Cyprinus carpio*).
Dt. Fischerei-Ztg. 13: 340-344
- ASSEM, H. S., ABO HEGAB, S. UND HANKE, W. (1982): Response of cortisol to pollutants in fish. Gen. Comp. Endocrinol. 46: 408
- ASSEM, H. UND HANKE, W. (1983): The significance of the amino acids during osmotic adjustment in teleost fish – I. Changes in the euryhaline *Seratherodon mossambicus*. Comp. Biochem. Physiol.: 74A, No.3, 531-536
- ATHERTON, W. D. UND AITKEN A. (1970): Growth, nitrogen metabolism and fat metabolism in *Salmo gairdneri*. Comp. Biochem. Physiol. 36: 719-747
- BARNHART, R.A. (1969): Effects of certain variables on haematological characteristics of rainbow trout. Transactions of the American Fisheries Society. 98: 411-418
- BECKER, A. (1997): Dosis-Wirkungs-Versuche zur notwendigen Versorgung der Regenbogenforelle mit verschiedenen essentiellen Aminosäuren. Diss. Universität Bonn, Shaker Verlag, Aachen
- BELL, G. R. (1968): Distribution of transaminases in the tissue of Pacific salmon with emphasis on the properties and diagnostic use of GOT. J. Fish. Res. Bd. Canada 25: 1247-1268
- BESCH, W.-K., KEMBALL, A., MEYER-WAARDEN, K. UND SCHARF, B. (1977): A biological monitoring system employing rheotaxis in fish. In: Biological monitoring of water and effluent quality. (Hrsg.: Cairns, J.Jr., Dickson, K.L. and Westlake, G.F.), ASTM STP 607, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA., 56-74
- BESCH, W.-K., SCHARF, B.W. UND MAYER, E. (1987): Toxizitätstest mit Goldorfe und Zebraabräbling – Vorschläge zur Durchführung und Bemerkungen zur Aussagekraft von Toxizitätstesten mit der Goldorfe (*Leuciscus idus*) und dem Zebraabräbling (*Brachydanio rerio*). In: Roth, L. – Wassergefährdende Stoffe, Landsberg/Lech: Ecomed Verlagsgesellschaft, 1982, Losebl. - Ausg. 5. Erg.

- BESCH, W.-K., HAMM, A., LENHART, B., MELZER, A., SCHARF, B. UND STEINBERG, C. (1988): Limnologie für die Praxis, Grundlagen des Gewässerschutzes, Ecomed-Verlag, Landsberg/Lech
- BILLARD, R. UND MENEZO, Y. (1984): The amino acid composition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Seminal fluid and blood plasma: A comparison with carp (*Cyprinus carpio*).
Aquaculture, 41: 255-248
- BITTNER, A., MÜLLER, R., KEPPLER, R. UND HANKE, W. (1980): Veränderungen des Elektrolytgehaltes bei Karpfen (*Cyprinus carpio*) unter dem Einfluss von Umweltgiften. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1980, 276
- BLAXHALL, P.C. UND DAISLEY, K.W. (1973): Routine haematological methods for use with fish blood.
J. Fish. Biol. 5: 771-781
- BÖHM, R. (1993): Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel der Leber des Karpfens (*Cyprinus carpio*), Diss. Universität Karlsruhe
- BOOKE, H.E. (1964): Blood serum protein and calcium levels in yearling brook trout.
Prog. Fish.-Cult. 26:107-110
- BOOKE, H.E. (1964): A review of variations found in fish serum proteins. N.Y. Fish Game J. 11: 37-57
- BRAUNBECK, T., BRESCH, H. UND STORCH, V. (1990): Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloraniline. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 19: 405-418
- BRAUNBECK, T. (1993): Isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in primary culture: Cytopathological effects of 4-chloraniline *in vitro*. Aquat. Toxicol. 25: 83-110
- BRAUNBECK, T., HANKE, W. UND SEGNER, H., (1993): Fish in Ecotoxicology and Ecophysiology, VCH Weinheim, 418 pp
- BRAUNBECK, T., HAUCK, C. UND ZAHN, T. (1993): Primärzellkulturen aus Fischhepatocyten als alternatives Testsystem in der ökotoxikologischen Forschung. In: Hardegg, W., Livaditis, I., Vogt, M. (Hrsg.) Tierschutz durch Alternativen, pp. 243-247
- BRESCH, HORST (1982): Investigation of the long-term action of xenobiotics on fish with special regard to reproduction, Ecotoxicology Environmental Safety 6: 102 -112
- BRESCH, H., BECK, H., EHLERMANN, D., SCHLASZUS, H. UND URBANEK, M. (1990): A long-term toxicity test comprising reproduction and growth of zebrafish with 4-chloraniline. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 19: 419-427
- BRESCH, H. (1991): Early life-stage test in zebrafish versus a growth test in rainbow trout to evaluate toxic effects, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 46: 641-648
- BROWN, M.E. (1946): The growth of brown trout (*Salmo trutta* L.) II. The growth of two-year old trout at a constant temperature of 11,5°C., J. exp. Biol. 22: 130-144
- BURROWS, R.E. (1968): The influence of fingerling quality an adult salmon survivals. Trans. Amer. Fish. Soc. 4, 777-784

- CAMPBELL, NEIL A. (1997): Biologie. Heidelberg, Berlin, Oxford; Spektrum, Akad. Verl., ISBN 3-8274-0032-5
- CANALS, M. A., GALLARDO, A., BLASCO, J. UND SANCHEZ, J. (1992): Uptake and metabolism of L-alanine by freshly isolated trout (*Salmo trutta*) hepatocytes: the effect of fasting. J. exp. Biol. 169: 37-52
- CHEMIKALIENGESETZ (CHEMG., 1980): Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen vom 16.9.1980, Bundesgesetzblatt I, 1718
- CHOO, P.-S., SMITH, T.K., CHO, S.Y. UND FERGUSON, H.W. (1991): Dietary excesses of leucine influence growth and body composition of rainbow trout. J.Nutr. 121: 1932-1939
- CHORUS, I. (1987): Literaturrecherche und Auswertung zur Notwendigkeit chronischer Tests – insbesondere des Reproduktionstests – am Fisch für die Stufe II nach dem Chemikaliengesetz. Umweltbundesamt Berlin
- COOPER, J.D., OGDEN, G., MCINTOSH, J UND TURNELL, D.C. (1984): The stability of the o-phthalaldehyde/ 2 mercaptoethanol derivatives of amino acids. An investigation using HPLC with a precolumn derivatization technique. Anal. Biochem. Physiol., 7: 29-38
- COWEY, C.B. (1985): Amino acid composition of whole body tissue of rainbow trout and atlantic salmon, Aquaculture 1985
- COWEY, C. B., DE LA HIGUERA M. UND ADRON, J. W. (1977) : The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout. Br. J. Nutr. 38: 385-395
- CVANCARA, V. A. (1969): Studies on tissue arginase and ureogenesis in fresh water teleosts. Comp. Biochem. Physiol. 29: 631-638
- DAMBROWSKI, H. (1953): Das Blut des gesunden Karpfens (C.c.L.), Der Fischwirt 10: 345-349
- DAVE, G., JOHANSSON-SJÖBECK, M.L., LARSSON, A. UND LIDMAN, U. (1975) : Metabolic and haematological effects of starvation in the european eel (*Anguilla anguilla* L.) – carbohydrate, lipid, protein and inorganic ion metabolism. Comp. Biochem. Physiol. 52A: 423-430
- DAVIS, G.E. UND WARREN, C.E. (1968): Estimation of food consumption. In: Ricker, W.E.: Methods for assessment of fish production in fresh waters. IBP handbook No. 3, Oxford und Edinburgh: 204-225
- DELONG, D. C., HALVER, J. E. UND MERTZ, E. T. (1958): Nutrition of salmonoid fishes, J. Nutr. 65, 589
- DENTON, J.E. UND Youssef, M.K. (1975): Seasonal changes in haematology of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Comp. Biochem. Physiol., Vol 51A: 151-153
- DONALDSON, L.R. UND JOYNER, T. (1983): Lachse und Forellen als Zuchtfische. Spektrum d. Wissenschaft, Sept. 1983
- DRIEDZIC, W. R. UND HOCHACHKA, P.W. (1978): Metabolism in fish during exercises. In: Fish Physiology (Ed.: W.S. Hoar; D. J. Randall), Academic Press, New York: 502-543

- ELLIOT, J.M. (1976): Body composition of brown trout (*Salmo trutta* L.) in relation to temperature and ratio size. J. Anim. Ecol. 45: 273-289
- FAUCONNEAU, B., BASSERES, ANNE UND KAUSHIK, S.J. (1992): Oxidation of phenylalanine and threonine in response to dietary arginine supply in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)
Comp. Biochem. Physiol. Vol. 101 A, No. 2, pp 395-401
- FELLMAN, J. H., ROTH, E. S. UND FUJITA, T. S. (1971): Study of tyrosine aminotransferase in developing salmon. Comp. Biochem. Physiol. 40B: 241-248
- FENT, KARL (1998): Ökotoxikologie, Thieme Verlag Stuttgart
- FIJAN, N. (1961): Die haemopoetische Funktion der Niere bei einigen Süßwasserfischarten. Bioloski Glasnik 14: 167-216
- FINN, J.P. UND NIELSON, N.O. (1971): The inflammatory response of rainbow trout.
J. Fish Biol. 3: 463-478
- FOGELS, A. UND SPRAGUE, J.B. (1977): Coparative short-term tolerance of zebrafish, flagfish, and rainbow trout to five poisons including potential reference toxicants. Water Research 11: 811-817
- FOLMAR, L. C. (1993): Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: a bibliography and synopsis of selected effects. Environ. Tox. and Chemistry. 12: 337-375
- FRAME, E. G. (1958): The levels of individual free amino acids in the plasma of a normal man at various intervals after a high-protein meal. Jour. Clin. Invest., 37: 1710-1723
- FRENCH, C. J., MOMMSEN, T. P. UND HOCHACHKA, P. W. (1981): Amino acid utilisation in isolated hepatocytes from rainbow trout. Eur. J. Biochem. 113: 311-317
- GERALD, V.M. (1976): The effect of size on the consumption, absorption and conversion of food in *Ophiocephalus punctatus* Bloch. Hydrobiologia 49: 77-85
- GLUTH, G. UND HANKE, W. (1984): A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pullutants at sublethal concentration – II. The dependency on the temperature. Comp. Biochem. Physiol, 78c, 39-45
- GLUTH, G. UND HANKE, W. (1984): A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pullutants at sublethal concentration – I. The depency on exposure time. Ecotox. Environ. Safety 9: 179-188
- GOEDE, R. W. UND BARTON, B. A. (1990): Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. Am. Fish. Soc. Symp. 8: 93-108
- GRAS, J., GUDEFIN, Y., CHAGNY, F. UND PERRIER, H. (1982): Free amino acids and ninhydrin-positive substances in fish - II. Cardio-respiratory system: plasma, erythrocytes, heart and gills of the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 73B. No.4 pp. 845-847, 1982

- HAIDER, G., (1967): Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopoese einiger Teleostier. I Beobachtungen an Zellen der roten Reihe. Zool. Anz. 179: 355-384
- HAIDER, G., (1968): Vergleichende Untersuchungen zur Blutmorphologie und Hämatopoese einiger Teleostier. III. Beobachtungen an Leukozyten und Plasmazellen. Zool. Anz. 180: 110-130
- HAIDER, G., (1969): Hämatologische Beobachtungen an Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* Rich.) I. Alters- und jahreszeitlich bedingte Schwankungen des Hämoglobingehaltes. Biol. Abteilung des Instituts für Siedlungswasserbau u. Wassergütewirtschaft der Universität Stuttgart
- HAIDER, G., (1971): Changes related to age and season in the serum protein of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.), Z. Fisch Hilfswiss. 18: 107-124
- HALSBAND, E. UND I. (1963): Veränderungen des Blutbildes von Fischen infolge toxischer Schäden. Arch. f. Fischereiw. 14: 68-85
- HANKE, W., GLUTH, G., GIANNAROS, T., ZACHMANN, A., MÜLLER, R. (1984): Ökotoxikologische Untersuchungen am Karpfen. Jül. Spez. 276: 247-264
- HAYASHI, S. UND OOSHIRO, Z. (1977): Gluconeogenesis in perfused eel liver – Effect of starvation, amino-oxyacetate, D-malate and hormones. Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ. 26: 89-95
- HAYASHI, S. UND OOSHIRO, Z. (1979): Gluconeogenesis in isolated liver cells of the eel. J. comp. Physiol. 132B: 343-350
- HEGAB, S.A. UND HANKE, W. (1983): The significance of the amino acids during osmotic adjustment in teleost fish – II. Changes in the stenohaline *Cyprinus carpio*. Comp. Biochem. Physiol.: 74A, No.3, 537-543
- HEMING, T.A. UND PALECZNY, E.J. (1987): Compositional changes in skin mucus and blood serum during starvation of trout. Aquaculture 66: 265-273
- HERMENS, J., BRADBURY, S.P. UND BRODERIUS, S.J. (1990): Influence of cytochrome P450-mixed function oxidase induction on the acute toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of primary aromatic amines. Ecotoxicology and Environmental Safety 20: 156-166
- HOLM, P. (2000): Wirkung ausgewählter Pestizide auf Fische, Fischnetz-info Nr.4, Mai 2000, Projekt Fischnetz, EAWG, Pf 611, 8600 Dübendorf
- HUGGINS, A. K., SKUTCH, G. UND BALDWIN, E. (1969): Ornithine urea cycle enzymes in teleost fish. Comp. Biochem. Physiol., 28: 587-602
- JUNGERMANN, K. UND KATZ, N. (1989): Functional specialization of different hepatocyte populations. Physiol. Rev. 69: 708-764
- KATO, T. (1975): The relation between the growth and reproductive characters of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Bull. Freshwaters Fisheries Res. Lab. 25: 83-115
- KATO, T. UND SAKAMOTO, Y. (1969): Studies on the variation of growth in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. I. The effect of grading of body size on the course of growth. Bull. Freshwater Fisheries Lab. 19: 9-16

- KARG UND KÖSTER, (2002): Umweltchemie der Pestizide: Umweltchemie und Erkundungs-Bedarf bei Belastung durch Pestizide und deren Metaboliten, Innolab GmbH, Harburg
- KAUSHIK, S.J. UND LUQUET, P. (1979): Influence of dietary amino acid patterns on the free amino acid contents of blood and muscle of rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.), Comp. Biochem. Physiol. B, 64: 175-180
- KAUSCH, H. (1972): Stoffwechsel und Ernährung der Fische. Im Handbuch der Tierernährung Bd. II, Verlag P. Parey, Hamburg, Berlin: 690-738
- KETOLA, H. G. (1982): Amino acid nutrition of fishes: Requirements and supplementation of diets. Comp. Biochem. Physiol. 73B, 17-24
- KIM, K-I., KAYES, T. B. UND AMUNDSON, C. H. (1992): Requirements for lysine and arginin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquaculture, 106: 333-344
- KIM, KYU-IL, GRIMSHAW, T. W., KAYES, T. B. UND AMUNDSON, C. H. (1992): Effect of fasting or feeding diets containing different levels of protein or amino acids on the activities of the liver amino acid-degrading enzymes and amino acid oxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquaculture, 107: 89-105
- KITAMURA, S., OHARA, S., SUWA, T. UND NAKAGAWA, K. (1967): Studies on vitamin requirements of rainbow trout. II. The deficiency symptoms of fourteen kinds of vitamin. Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries 33 : 1126-1131
- KNAPP, R. UND WIESER, W. (1981): Effects of temperature and food on the free amino acids in tissues of roach (*Rutilus rutilus* L.) and rudd (*Sardinus erythrophthalmus* L.). Comp. Biochem. Physiol. 68A: 187-198
- KNOLL, W. (1957): Vergleichende Hämatologie, in: Handbuch der gesamten Hämatologie, Bd. 1, Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien, 6-16
- LAALE, H.W. (1977): The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in Fisheries Research. A literature review. J.Fish Biol. 10: 121-173
- LARSSON, A. UND LEWANDER, K. (1973): Metabolic effects of starvation in the eel, *Anguilla anguilla* L., Comp. Biochem. Physiol. 44A: 367-374
- LEE, D.J. UND PUTNAM, G.B. (1973): The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test
- LEHMANN, J. UND STÜRENBERG, F.-J. (1974): Haematologisch-serologische Substratuntersuchungen an der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Rich.) I. Methodik zur Blutentnahme und Blutuntersuchung bei Fischen. Gewässer und Abwässer 53/54, 114-132
- LEHMANN, J. UND STÜRENBERG, F.-J. (1975): Haematologisch-serologische Substratuntersuchungen an der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Richardson) II. Beschreibung und Darstellung der wichtigsten Zellen in der Blutbildungsstätte und im peripheren Blutgefäßsystem. Gewässer und Abwässer 55/56: 7-123

- LEHMANN, J., STÜRENBERG, F.-J. UND HESSE, F. (1976): III. Normwerte des Haemogramms unter Berücksichtigung alters- und jahreszeitlich bedingter Schwankungen. *Gewässer und Abwässer* 59, 7-32
- LEHNINGER, A. L. (1987): *Prinzipien der Biochemie*, Berlin; New York: de Gruyter,
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L. UND COX, M. (1998): *Prinzipien der Biochemie*, 2. Aufl., Heidelberg, Berlin, Oxford. Spektrum, Akad. Verlag, ISBN 3-8274-0325-1
- LENZ, D., SEGNER, H. UND HANKE, W. (1993): Comparison of different endpoint methods for acute Cytotoxicity tests with the R1-cell line; aus: Braunbeck, T., Hanke, W., Segner, H. (=eds): *Fish, Ecotoxicology and Ecophysiology*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim. 93-102
- LEXIKON DER BIOCHEMIE, Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl., (1999) ISBN 3-8274-0408-7
- LONGENECKER, J. B. UND HAUSE, N. L., (1959): Relationship between plasma amino acids and composition of the ingested protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 84: 46-59
- LOVE, M.R. (1970): *The chemical biology of the fish*. Academic Press, London, New York
- LUQUET, P. UND KAUSHIK, S. J. (1981): Besoins en proteines et en acides amines. In: *Nutrition des poissons*, pp 172-184, Edited by M. Fontaine CNRS, Paris
- LYSAK, A. (1959): Die Blutentnahme von Fischen zu diagnostischen Zwecken sowie deren Einfluss auf das spätere Blutbild und den Zuwachs. *Acta Hydrobiol.* 1: 37-54
- MAIER-BODE UND HARTEL, K. (1981): Linuron and monolinuron. *Residue Rev.* 77: 1-364
- MAILLIARD, M. E., STEVENS, B. R. UND MANN, G. E., (1995): Amino acid transport by small intestinal, hepatic, and pancreatic epithelia. *Gastroenterology*, 108: 888-910
- MAMBRINI, M. UND KAUSHIK, S.J (1995): Indispensable amino acid requirements of fish: correspondence between quantitative data and amino acid profiles of tissue proteins. *J. Appl. Ichthyol.* 1995, 11: 240-247
- MCLAREN, B.A., KELLER, E., O'DONNELL, D.J. UND ELVEHJEM, C.A. (1947): The nutrition of rainbow trout. I. Studies of vitamin requirements. *Arch. Biochem. Biophys.* 15: 169-178
- MEYER, V., (1974): *Atlas zur Anatomie und Morphologie der Nutzfische*, Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin
- MÜLLER, R., BITTNER, A., KEPPLER, R. UND HANKE, W. (1980): Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels bei Karpfen (*Cyprinus carpio*) unter dem Einfluss von Umweltgiften. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 1980, 277
- NAGAI, M. UND IKEDA (1971): Carbohydrate metabolism in Fish – Effects of starvation and dietary composition on the blood glucose level and the hepatopancreatic glycogen in carp. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 37: 404-409

- NARAYANSINGH, T. UND EALES, J.G. (1975): Effects of thyroid hormones on in vitro $1-^{14}\text{C}$ L – leucine incorporation into plasma and tissue protein of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 52B: 399-405
- NEMETH, S. UND JURANI, M. (1974): Hepatic tyrosine aminotransferase in stressed trout and rats. Gen. Comp. Endocrinol. 22: 388
- NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1988): Nutrient Requirements of swine, 9 th. edn. National Academy Press, Washington, DC, 63 pp
- NOSE, T. (1972): Changes in patterns of free plasma amino acids in rainbow trout after feeding. Bull. Freshwater Fish. Res. Lab., Tokyo, 22: 137-144
- NOSE, T. UND Murai, T. (1990): Japan. Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin. In: Nutrition: Proteins and Amino Acids, ed. By A. Yoshida et al., pp. 85-95
- OECD (1982), Beschluss C 82, Test-Parameter für das OECD-MPD (Minimum Premarketing Set of Data
- ONISHI, T. UND MURAYAMA, S. (1969): Studies on enzymes of cultivated salmonid fishes I – Activities of protease, amylase, arginase, GOT and GPT. Bull. Tokai reg. Fish Res. Lab. 59: 111-119
- PHILLIPS, A.M. (1969): Nutrition, digestion and energy utilisation
In: Fish Physiology (Ed.: W.S. Hoar; D.J. Randall), Academic Press, New York, 391-432
- PHILLIPS, A.M. JR., PODOLIAK, H.A., BROCKWAY, D., R UND VAUGHN, R.R. (1958): Metabolic effect of MS 222, methylpentynol, and sodium amytal in aquarium water. – In: The nutrition of trout. Cortland Hatchery Rep. (26). N.Y. Conserv. Dept., Fish Res. Bull. (21): 79-86
- PLAKAS, S. M., KATAYAMA, T., TANAKA, Y. UND DESHIMARU, O. (1980): Changes in the levels of circulating plasma free amino acids of carp (*Cyprinus carpio*) after feeding a protein and an amino acid diet of similar composition. Aquaculture, 21: 307-322
- PURDOM, C.E. (1980): Genetics and fish breeding. Fish and fisheries series 8. London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman u. Hall, pp: 25-43
- RENAUD, J. M. UND MOON, T. W. (1980): Characterization of gluconeogenesis in hepatocytes from the American eel. J. Comp. Physiol. 135B: 115-125
- RIPPEN, G. (1984): Handbuch der Umweltchemikalien, Ecomed, Landsberg, 240 S.
- ROBERTS, R. (1978): Fish Pathology, Bailliere Tindell London
- RODEHUTSCORD, M., MANDEL, S., PACK, M., JACOBS, S. UND PFEFFER, E. (1995): Free amino acids can replace protein-bound amino acids in test diets for studies in rainbow trout (*O. mykiss*). J. Nutr.. 125, 4: 956-963
- RUDOLPH, P. U. BOJE, R. (1986): Ökotoxikologie: Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz. Ecomed, Landsberg

- SALVATORE, F., ZAPPIA, V. UND COSTA, C. (1965): Comparative biochemistry of deamination of L-amino acids in elasmobranches and teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 16: 303-310
- SANDNES, K., LIE, O. UND WAAGBO, R. (1988): Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *J. Fish. Biol.* 32: 129-136
- SAS INSTITUTE INC. (1982 b), SAS User's Guide: Statistics. Cary, N. C.
- SCHLISIO, W. UND NICOLAI, B.(1978): Kinetic investigations on the behaviour of free amino acids in the plasma and of two aminotransferases in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) after feeding on a synthetic composition containing pure amino acids. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 59: 373-379
- SCHWARZ, E. UND HANKE, W. (1986): The influence of atrazine and pentachlorophenol on the regulation of T₄ and T₃ in the blood of the carp (*Cyprinus carpio*). *Acta Endocr.*, submitted.
- SCHRAMM, M. (1998): Zur Ökotoxikologie von kleinen Fließgewässern – Leberultrastruktur und hämatologische Parameter als Biomarker bei Fischen. Medien Verlag Köhler, Tübingen, ISBN 3-932694-33-3
- SMITH, L.S. (1966): Blood volumes of three salmonids. *J. Fish. Res. Bd. Can.*: 23(9)
- SMITH, R.R. (1971): A method for measuring digestability and metabolize energy of fishfeeds. *Progr. Fish. Cult.* 33: 132-134
- SMITH, R.R. (1978): Methods for determination of digestibility metabolizable energy of feedstuff for finfish. *Proc. World Symp. On finfish nutrition and fishfeed technology*, Hamburg, Vol. II, Berlin 1979: 453-459
- SMITH, R R. (1989): Nutritional energetics in fish nutrition, Second Edition, edited by John E. Halver, Academic Press Inc., San Diego, New York, Berkeley etc.
- SPIESER, O.H. (1980): Prüfparameter bei der Entwicklung von toxikologischen Verhaltenstests an Fischen. In: DFG – Forschungsbericht „Methoden der Toxizitätsprüfung an Fischen – Situation und Beurteilung“, Harald Boldt Verlag, Boppard 1980, S. 143-150
- SPIESER, O.H. UND YEDILER, A. (1986): Empfindliche Parameter bei der Entwicklung von Langzeittests an Fischen. Umweltforschungsplan des Bundesministers des Innern „Umweltchemikalien/Schadstoffwirkungen“, Forschungsbericht 10603030 im Auftrag des UBA, 1986
- STAPLES, D.J. UND NOMURA, N. (1976) : Influence of body size and food ration on the energy budget of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish. Biol.* 9: 29-43
- STEFFENS, W. (1974): Der Zeitpunkt des Eintritts der Geschlechtsreife bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) und seine wirtschaftliche Bedeutung. *Z. Binnenfischerei DDR* 21: 267-270
- STEFFENS, W. (1985): Grundlagen der Fischernährung. 1. Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag Jena
- STIEBER, S. T. UND CVANCARA, V. A. (1977): Tissue deamination of L- amino acids in the teleost *Stizostedion vitreum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 56B: 285-287

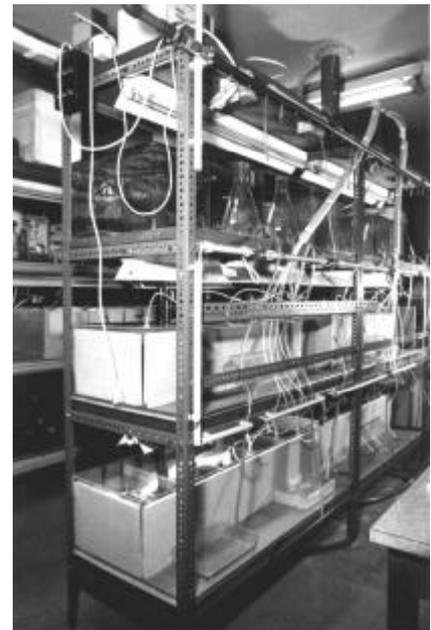
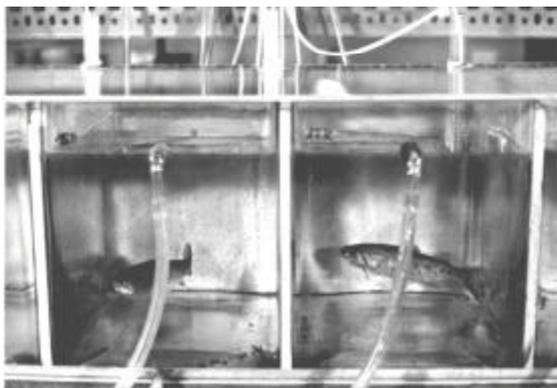
- TAKEUCHI, T UND WATANABE, T. (1977): Dietary levels of methyl laurate and essential fatty acids requirement of rainbow trout. Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries 45: 893-898
- TIEWS, K., KOOPS, H., GROPP, J. UND TIEWS, J. (1973): Über die Körperzusammensetzung netzgehaltener Forellen (*Salmo gairdneri*) in Abhängigkeit von Fütterung und Wachstum. Arch. Fisch Wiss. 24: 261-269
- TOPF, W. (1955): Die Blutbildung und Blutbildungsstätten im Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) Zschr. Fisch. Hilfsw. 3/4: 257-288
- TROGE, M. (1997): Vergleichende Untersuchungen zur Toxizität von 4-Chloranilin und 3,4-Dichloranilin an verschiedenen tierischen Zell-Kulturen, Shaker Verlag 1997
- TUNISON, A.V., PHILIPS, A.M., SHAFFER, H.B. UND MAXWELL, J.M. (1945): The nutrition of trout. Fisheries Res. Bull. 1-21
- VAN BOHEMEN, C.G., LAMBERT, J.G.D. UND PUETE, J. (1981): Annual changes in plasma and liver in relation to vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gen. Comp. Endocrinol. 44: 94-107
- VASSILEVA, L. UND KAZAKOVA, M. (1977): Parachloraniline effect on human chromosomes in vitro. Med. Biol. Probl. 5: 243-247
- VOSS, J. C. UND WAISMAN, H. A. (1966): The phenylalanine hydroxylase content of livers of various vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 17: 49-58
- WAARDE, A. (1982): Aerobic and anaerobic ammonia production fish. Comp. Biochem. Physiol. 74B: 675-684
- WALTON, M.J. UND COWEY, C.B. (1977): Aspects of ammoniogenesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Comp. Biochem. Physiol., 57B: 143-149
- WALTON, M.J. UND COWEY, C.B. (1979A): Gluconeogenesis by isolated hepatocytes from rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. 62B: 75-79
- WALTON, M.J. UND COWEY, C.B. (1979B): Gluconeogenesis from serine in rainbow trout liver. Comp. Biochem. Physiol. 62B: 497-499
- WALTON, M.J. UND COWEY, C.B. (1981): Distribution and some kinetic parameters of serine catabolising enzymes in rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. 68B: 147-150
- WALTON, M.J. UND COWEY, C.B. (1982): Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. Comp. Biochem. Physiol. 73B: 59-79
- WALTON, M.J. UND COWEY, C.B. UND ADRON, J. W. (1984): The effect of dietary lysine levels on growth and metabolism of rainbow trout (S.g.). Br. J. Nutr. 52: 115-122
- WALTON, M.J. UND WILSON, R.P. (1986): Postprandial changes in plasma and liver free amino acids of rainbow trout fed complete diets containing casein. Aquaculture, 51: 105-115

- WALTON, M.J. UND COWEY, C.B., COLOSO, R. M. UND ADRON, J. W. (1986b): Dietary requirements of rainbow trout for tryptophan, lysine and arginine determined by growth and biochemical measurements. *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 2 nos. 1- 4 pp 161-169, Kugler Publications, Amsterdam / Berkeley
- WARD, W.E. (1968): The uptake of amino acids by intestinal segments on trout, *Salmo gairdneri*. Ph.D. Thesis, College of Arts and Sciences, Kent State University, Ohio
- WARD, J.M., REZNIK, G. UND GARNER, F.M. (1980): Proliferative lesions of the spleen in male F 344 rats fed diets containing p-chloraniline. *Vet. Pathol.* 17: 200-205
- WARREN, C.E. UND DAVIS, G.E. (1967): Laboratory studies on the feeding, bioenergetics and growth of fish. In: Gerkin, S.D.: *The biological basis of freshwater fish production*. Blackwell Scientific Publ., Oxford, Edinburgh : 175-214
- WEBER, E. (1986): *Grundriss der biologischen Statistik*, Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- WEDEMEYER, G.A. UND NELSON, N.C. (1975): Statistical methods for estimating normal blood chemistry ranges and variance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Shasta strain. *J. Fish. Res. Board Can.* 32: 551-554
- WEINREB, E.L. (1958): Studies on the histology and histopathology of rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). I. Haematology: Under normal and experimental conditions of inflammation. *Zoologica* 43: 145-154
- WHITING, S. J. UND WIGGS, A. J. (1977): Effect of nutritional factors and cortisol on tyrosine transaminase activity in liver of brook trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 58B: 189-193
- WHITING, S. J. UND WIGGS, A. J. (1978): Effect of sexual maturation and estradiol -17- beta on liver glycogen and tyrosine aminotransferase activity in brook trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 60B: 463-465
- WILSON, R. P., (1985): In: *Nutrition and Feeding in Fish* (C. B. Cowey, A. M. Mackie, and J. G. Bell, eds), pp 1-16, Academic Press, London
- WOLF, L.E. (1951): Diet experiments with trout. 1. A synthetic formula for dietary studies. 2. Effect of mineral supplements in diets of rainbow trout. 3. Effect of the lack of certain vitamins on rainbow trout. *Prog. Fish Culturist* 13: 17-24
- YAMADA, S. SIMPSON, K.L., TANAKA, Y. UND KATAYAMA, T. (1981): Plasma amino acid changes in rainbow trout *Salmo gairdneri* forced-fed casein and a corresponding amino acid mixture. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 47: 1035-1040
- ZACHMANN, A. UND HANKE, W. (1986): A forced swimming activity test on fish. Hormonal and metabolic studies and influence of pollution. *Proc. 8 th. Conf. Europ. Soc. Comp. Physiol. Biochem.*, Strasbourg
- ZAHN, T., HAUCK, C., HOLZSCHUH, J. UND BRAUNBECK, T. (1995): Acute and sublethal toxicity of seepage waters from garbage dumps to permanent cell lines and primary cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a novel approach to environmental risk assessment for chemicals and chemical mixtures. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltschutz.* 196: 455-479

ZEITOUN, L. H., TACK, P. I., HALVER, J. E. UND ULLREY, D. F. (1973): Influence of salinity on protein requirements of rainbow trout *Salmo gairdneri* fingerlings. J. Fish. Bd. Canada, 30: 1867-1873

ZEITOUN, L. H., ULLREY, D. E., MAGEE, W. T., GILL, J. L. UND BERGEN, W. G. (1976): Quantifying nutrient requirements of Fish. J. Fish. Res. Bd Canada, 33: 167-172

Anlage 1



Aufbau der Versuchsanlage (vor Zugabe von 4-CA)

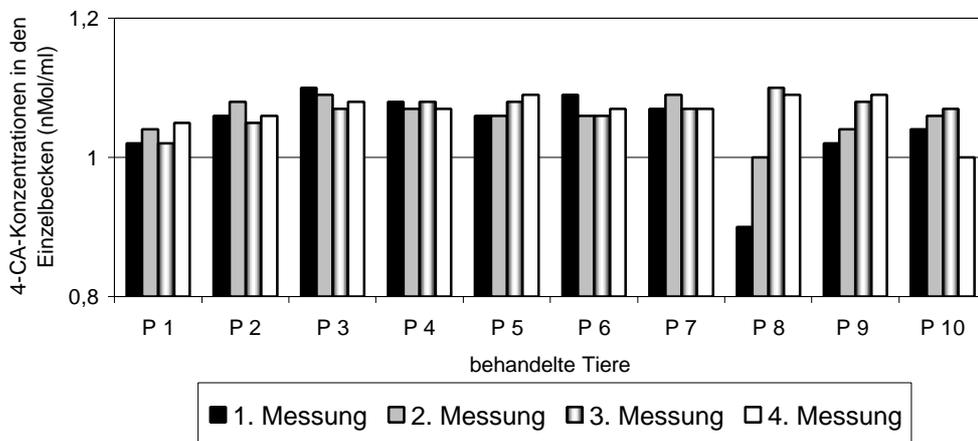
Bilder oben links und rechts: Vollglasaquarien, seitliche Vorderansicht. Erkennbar ist die Styropor-Isolierung zwischen den Aquarien, der hinten rechts angebrachte Wasserzufluss und der vorne in der Mitte sich befindende Wasserabfluss.

Bild unten links zeigt die Isolierung (weiße Styroporkante) zwischen den Becken mit dem in der Mitte oben gelegenen Wasserabfluss.

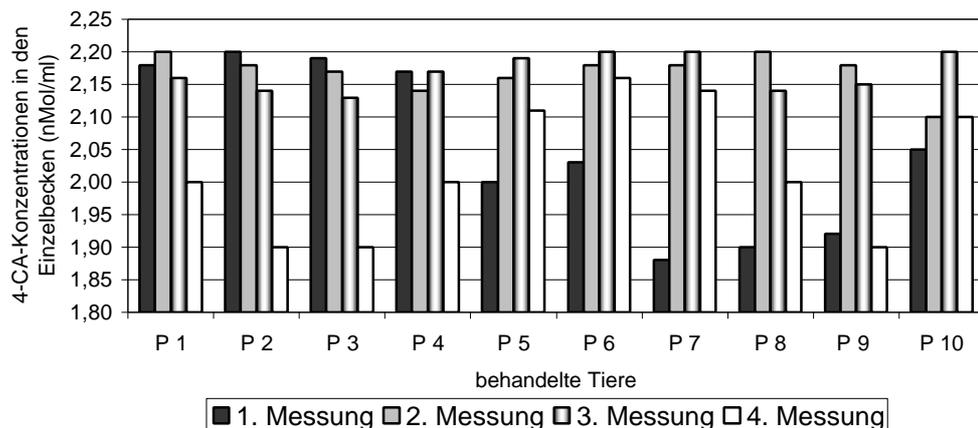
Bild unten rechts: Ansicht der Rückseite mit der isolierten Wasserzufuhr. Die Styropor-Platten dienen zur optischen und thermischen Isolierung.

Anlage 2 Messung der 4-CA-Konzentrationen in den Einzelbecken

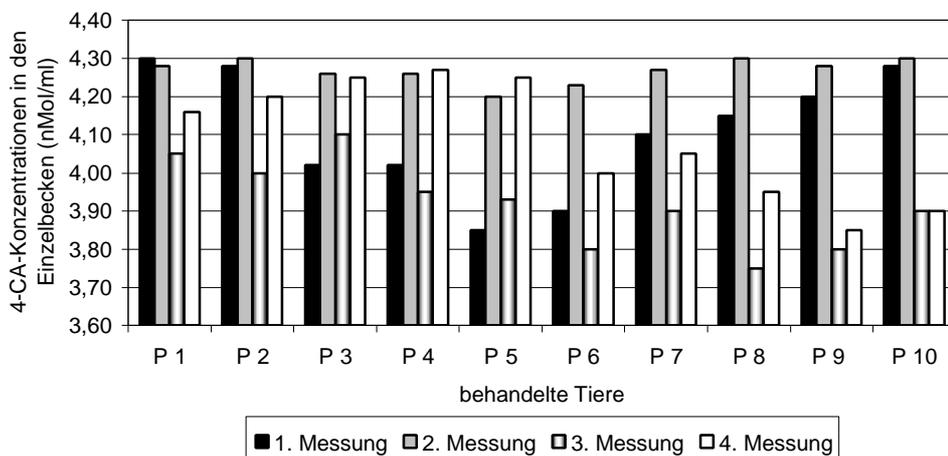
As Versuch 1 (1 mg CA/l) Messung der 4-CA-Konzentration in den Becken



As Versuch 2 (2 mg CA/l) Messung der 4-CA-Konzentration in den Becken

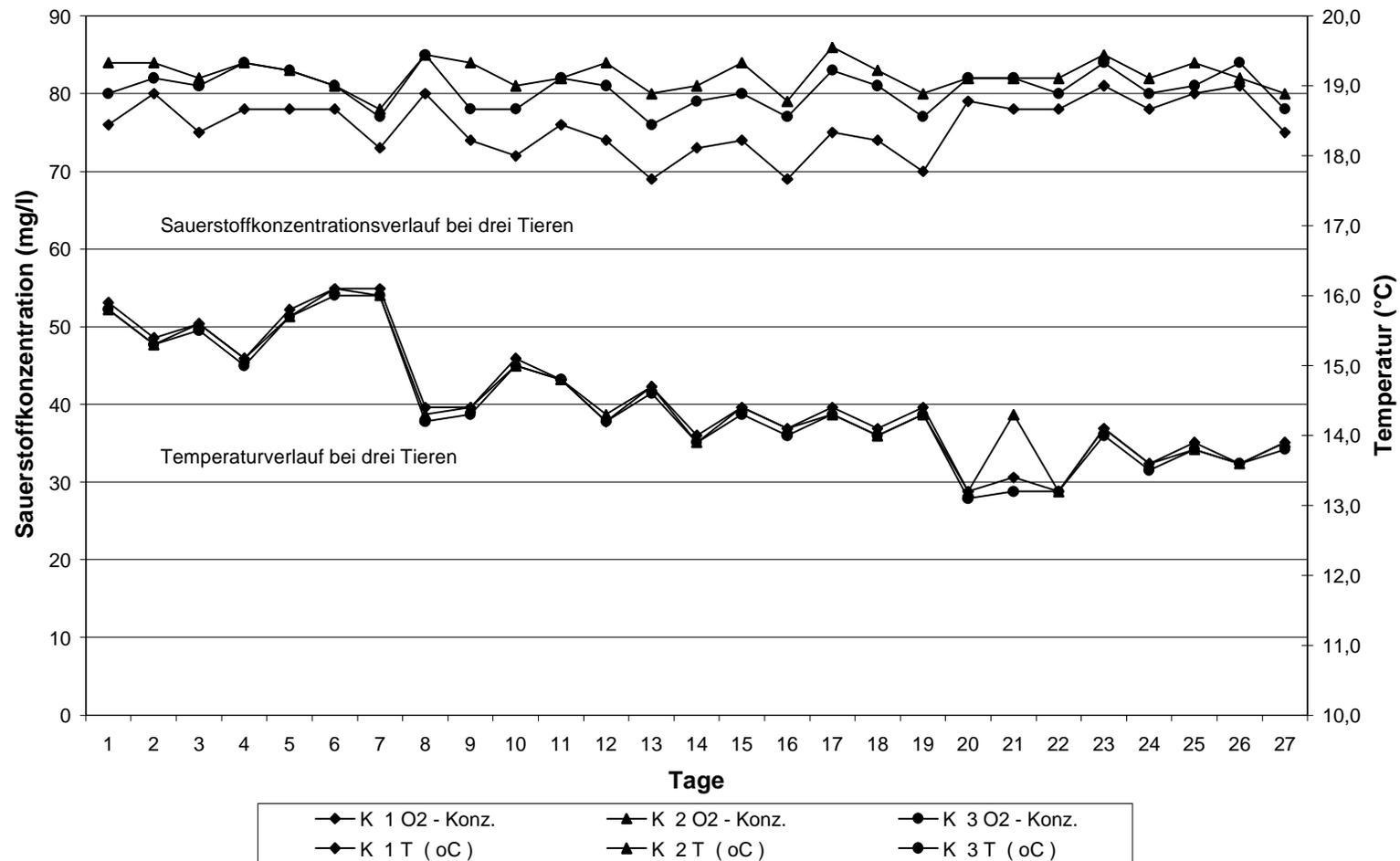


As Versuch 3 (4 mg CA/l) 4 CA-Konzentration in den Becken

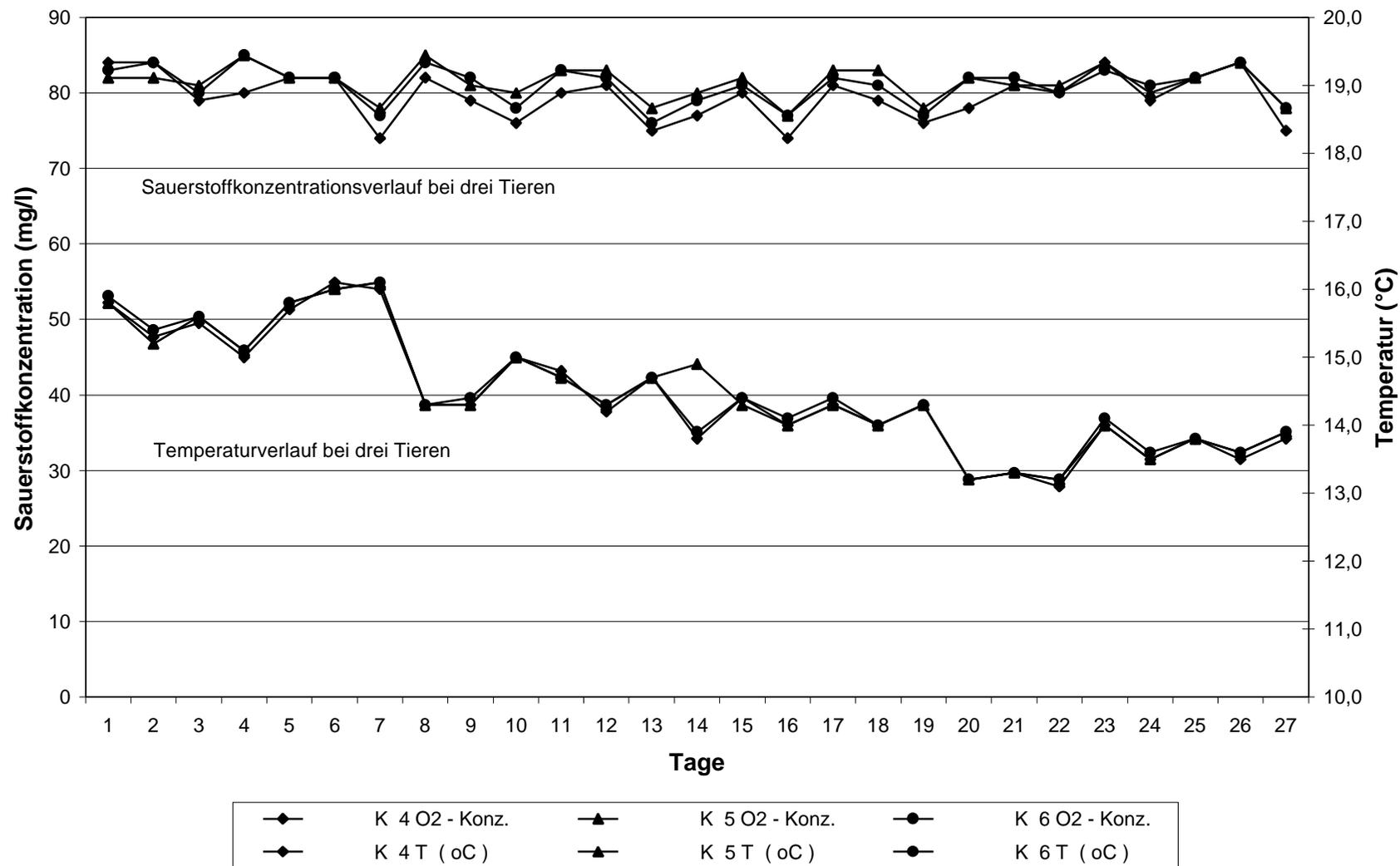


Anlage 3

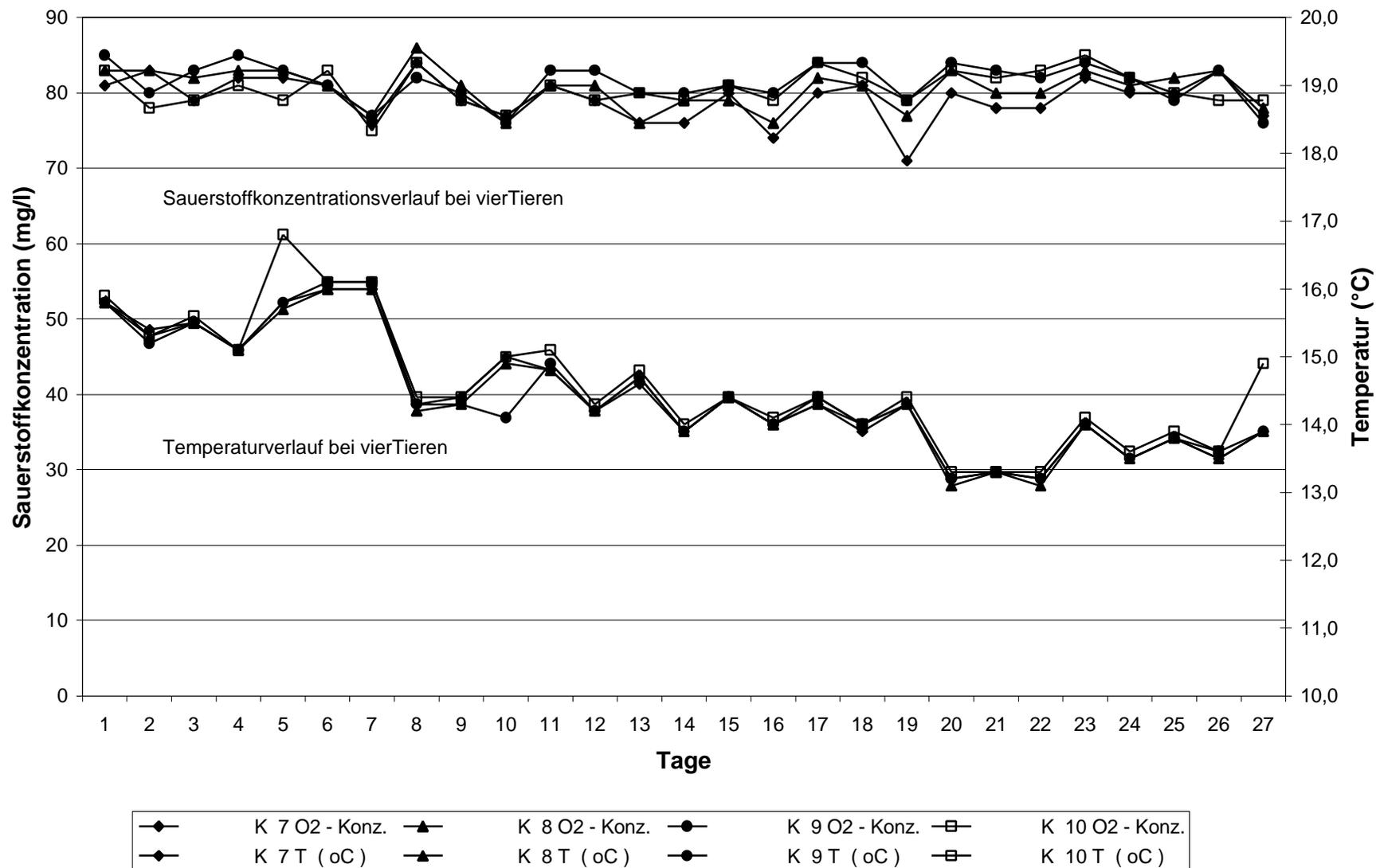
Anlage 3.1.1 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/l) bei den Kontrolltieren K1 – K3



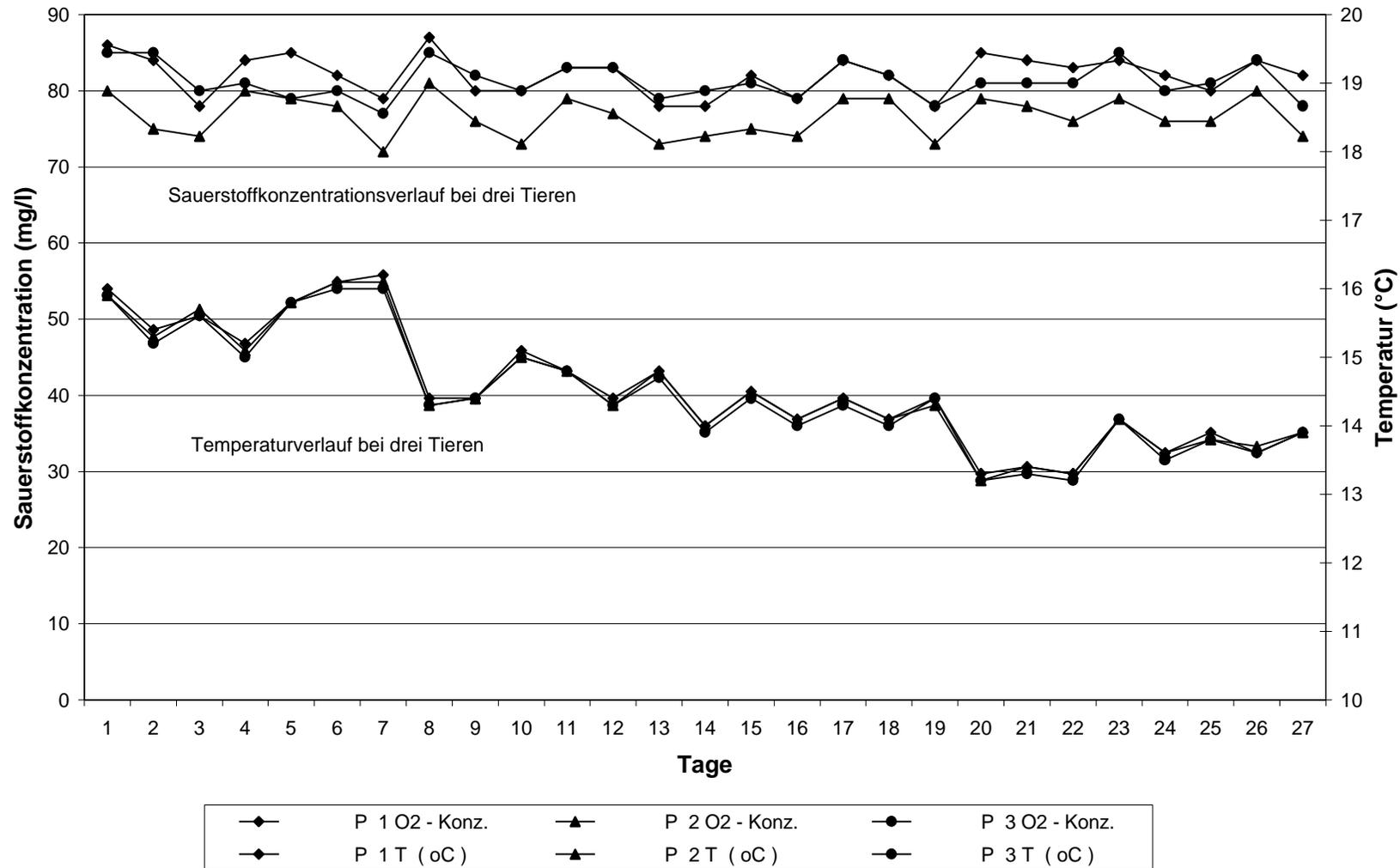
Anlage 3.1.2 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/l) bei den Kontrolltieren K4 – K6



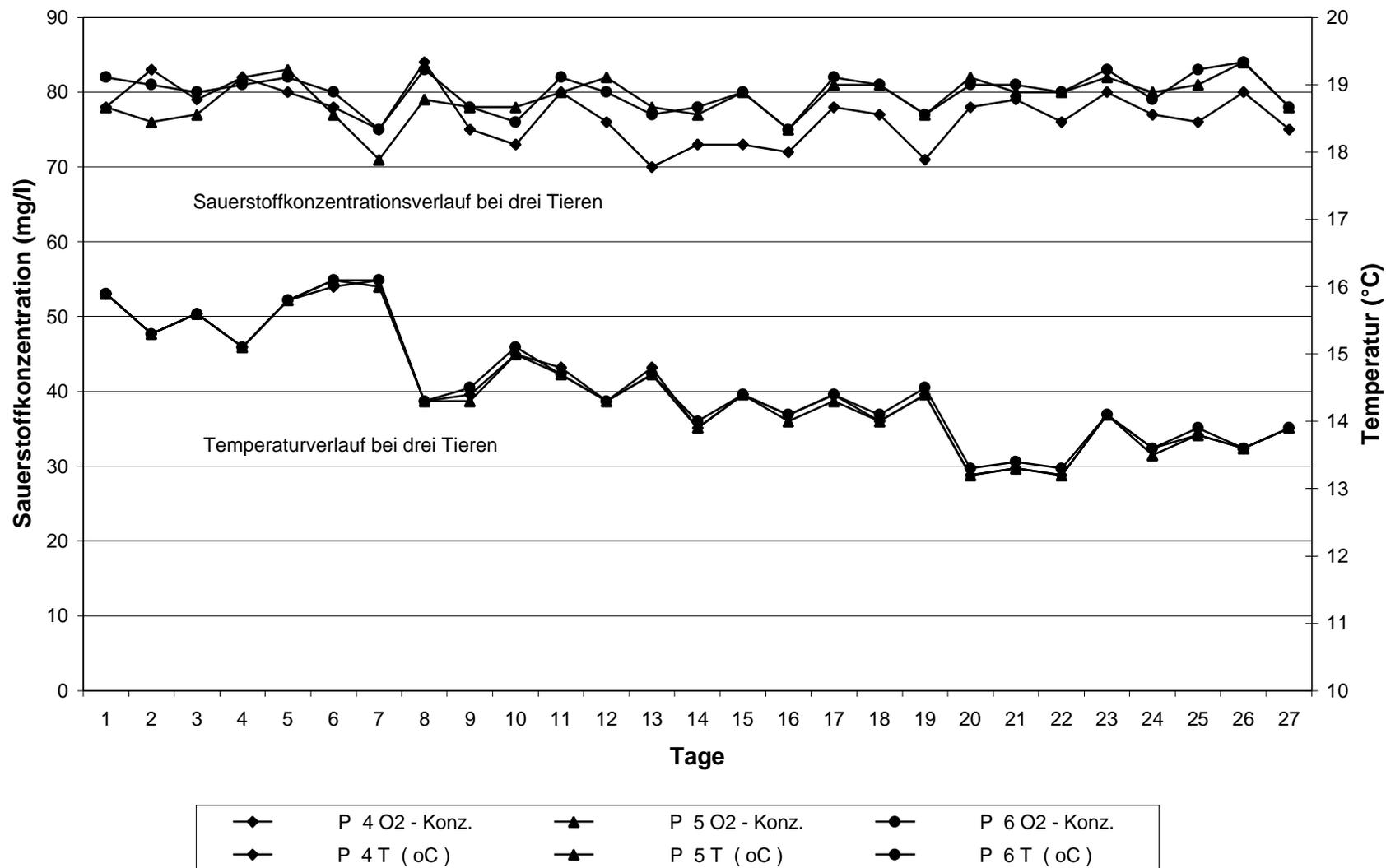
Anlage 3.1.3 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/l) bei den Kontrolltieren K7 – K10



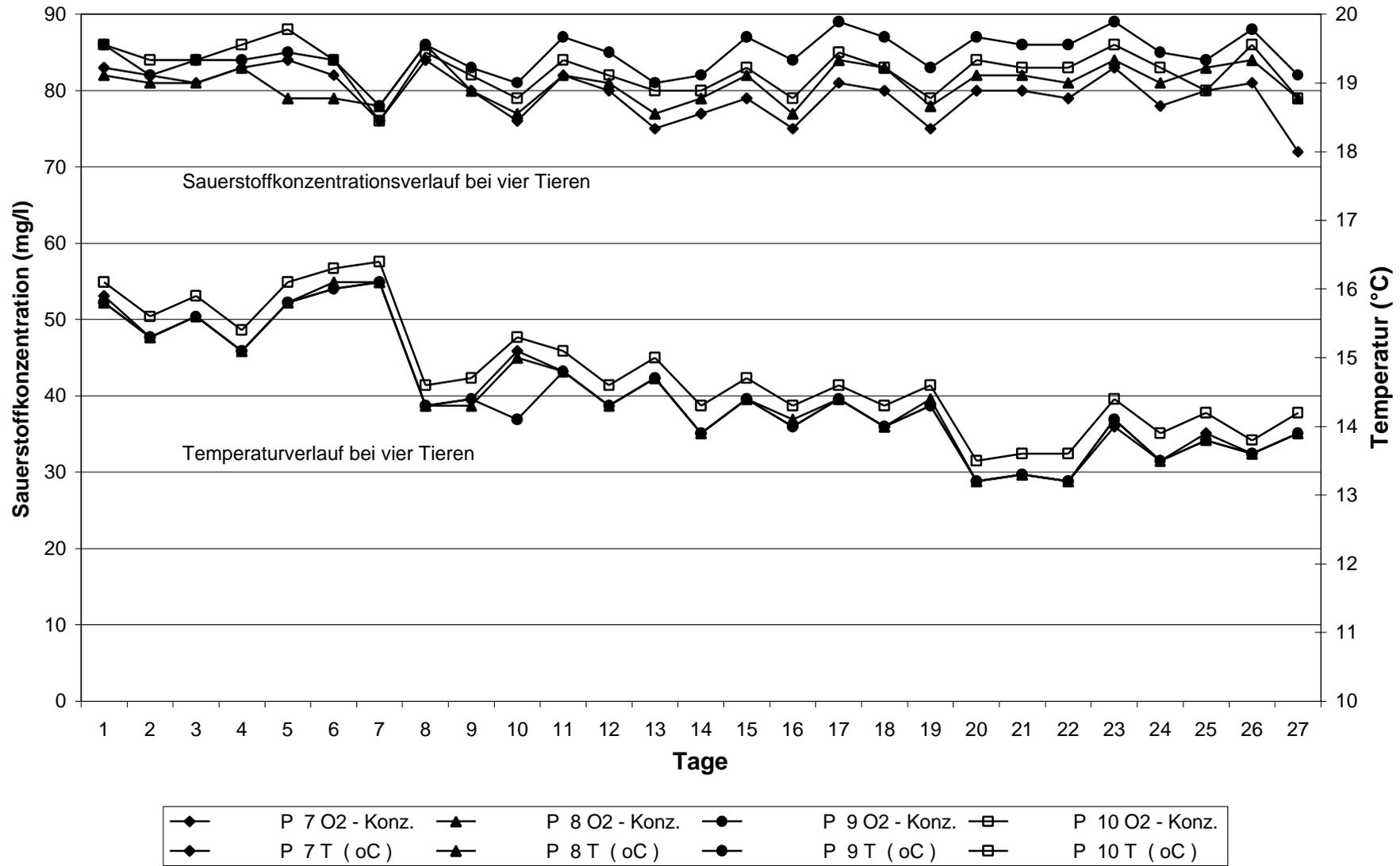
Anlage 3.1.4 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/l) bei den exponierten Tieren P1 – P3



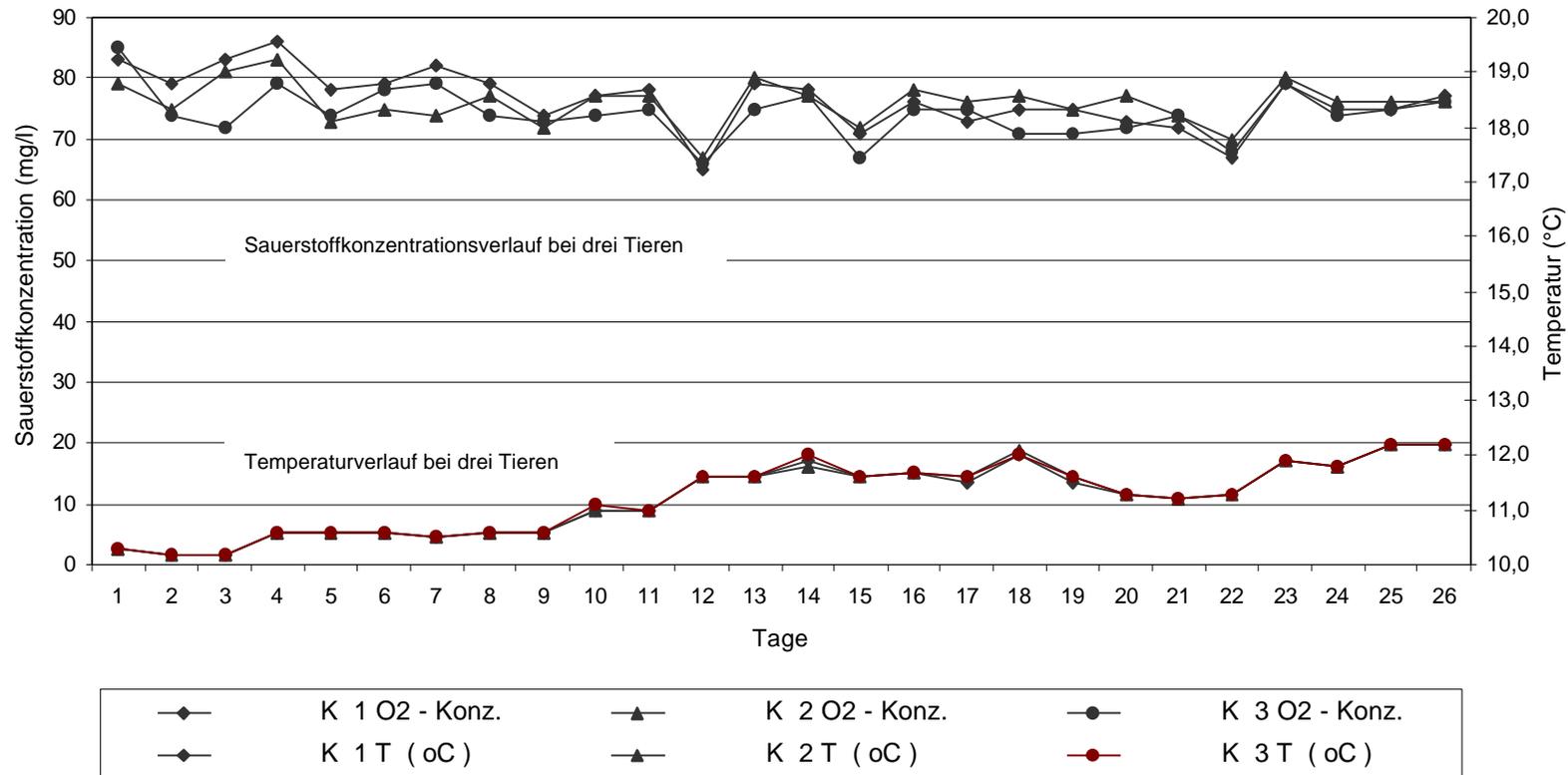
Anlage 3.1.5 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/l) bei den exponierten Tieren P4 – P6



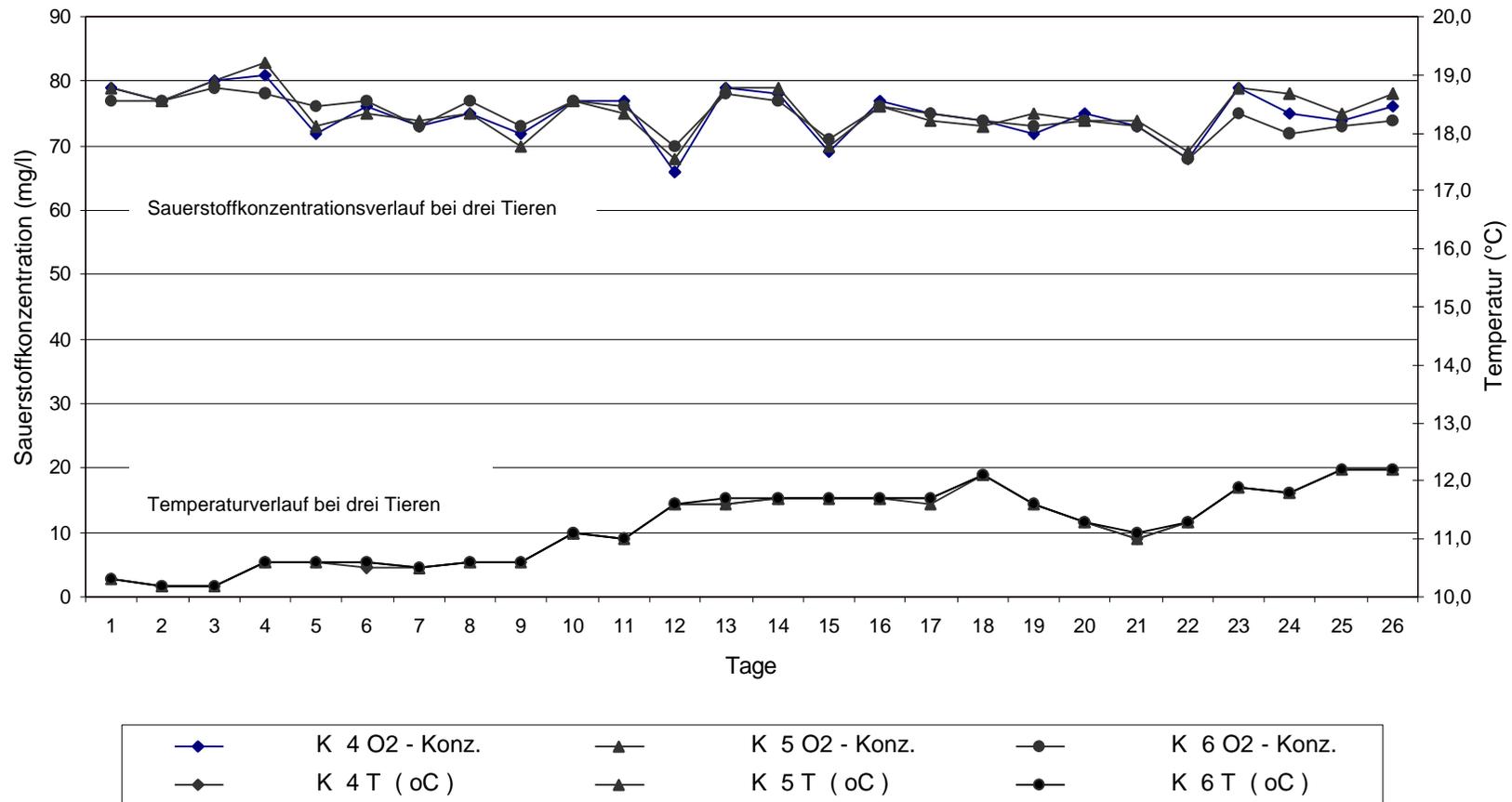
Anlage 3.1.6 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf in Versuch 1 (1 mg 4 CA/l) bei den exponierten Tieren P7 – P10



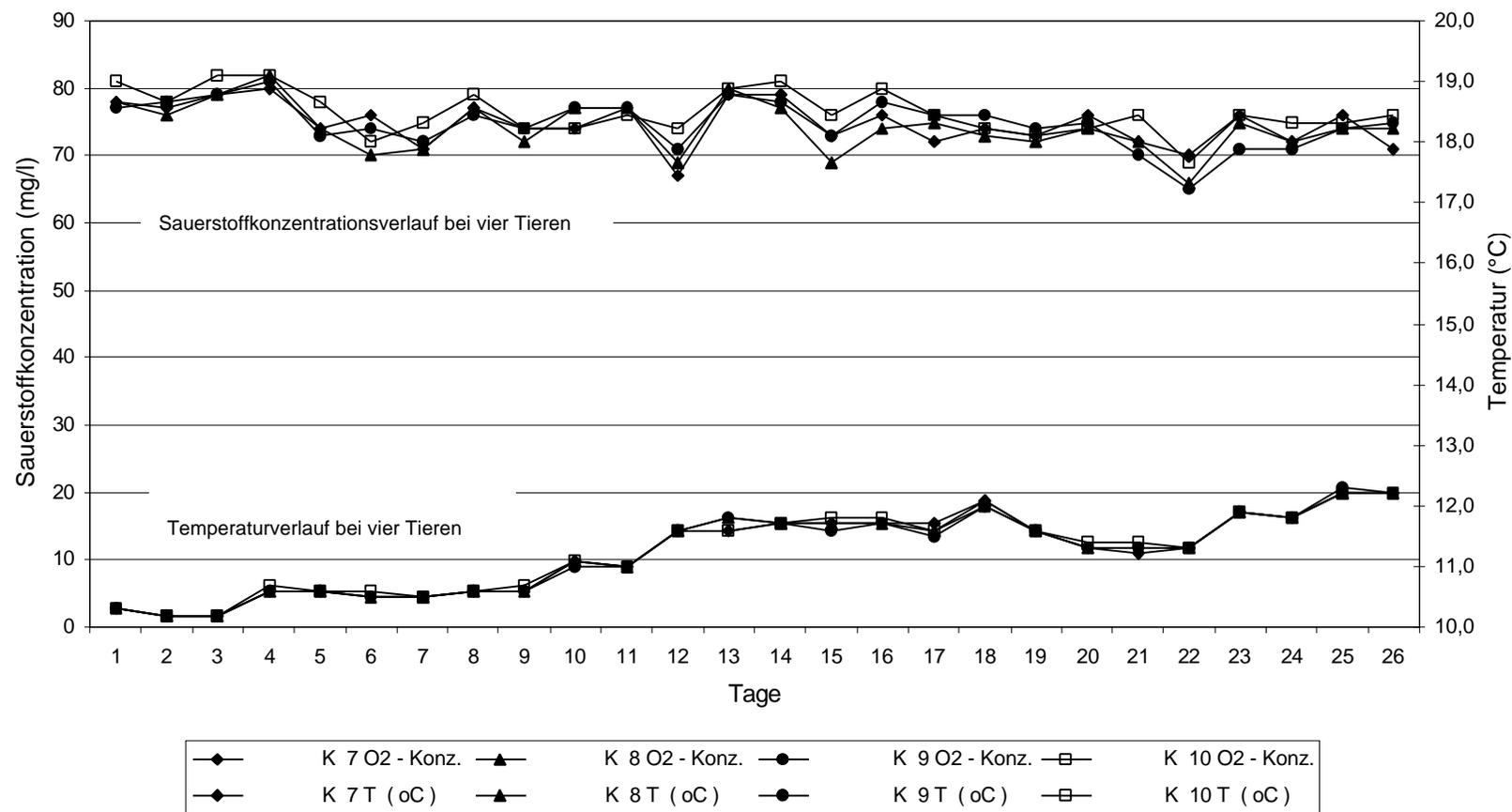
Anlage 3.2.1 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/l) bei den Kontrolltieren K 1 – K 3



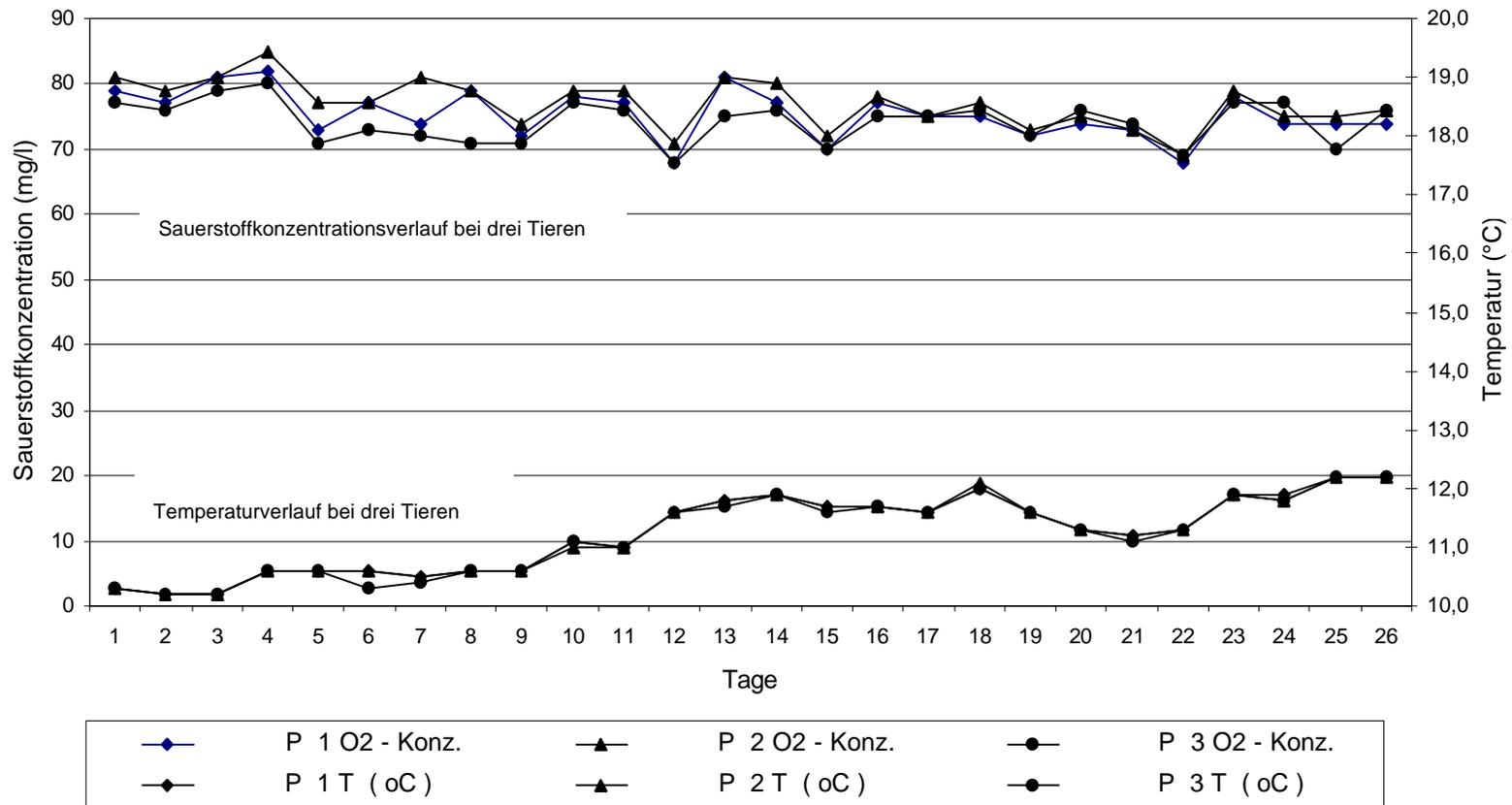
Anlage 3.2.2 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/l) bei den Kontrolltieren K 4 – K 6



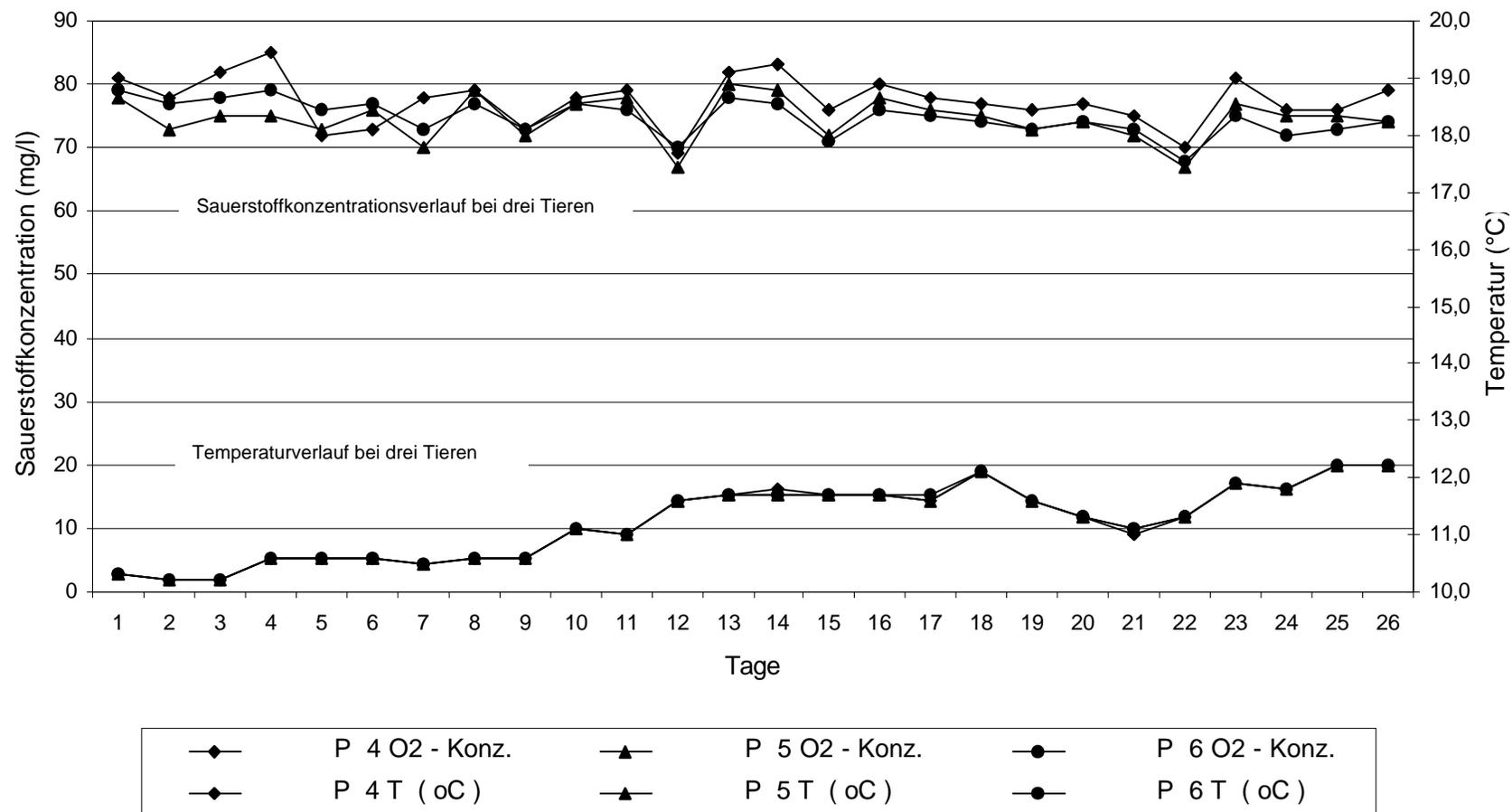
Anlage 3.2.3 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/l) bei den Kontrolltieren K 7 – K 10



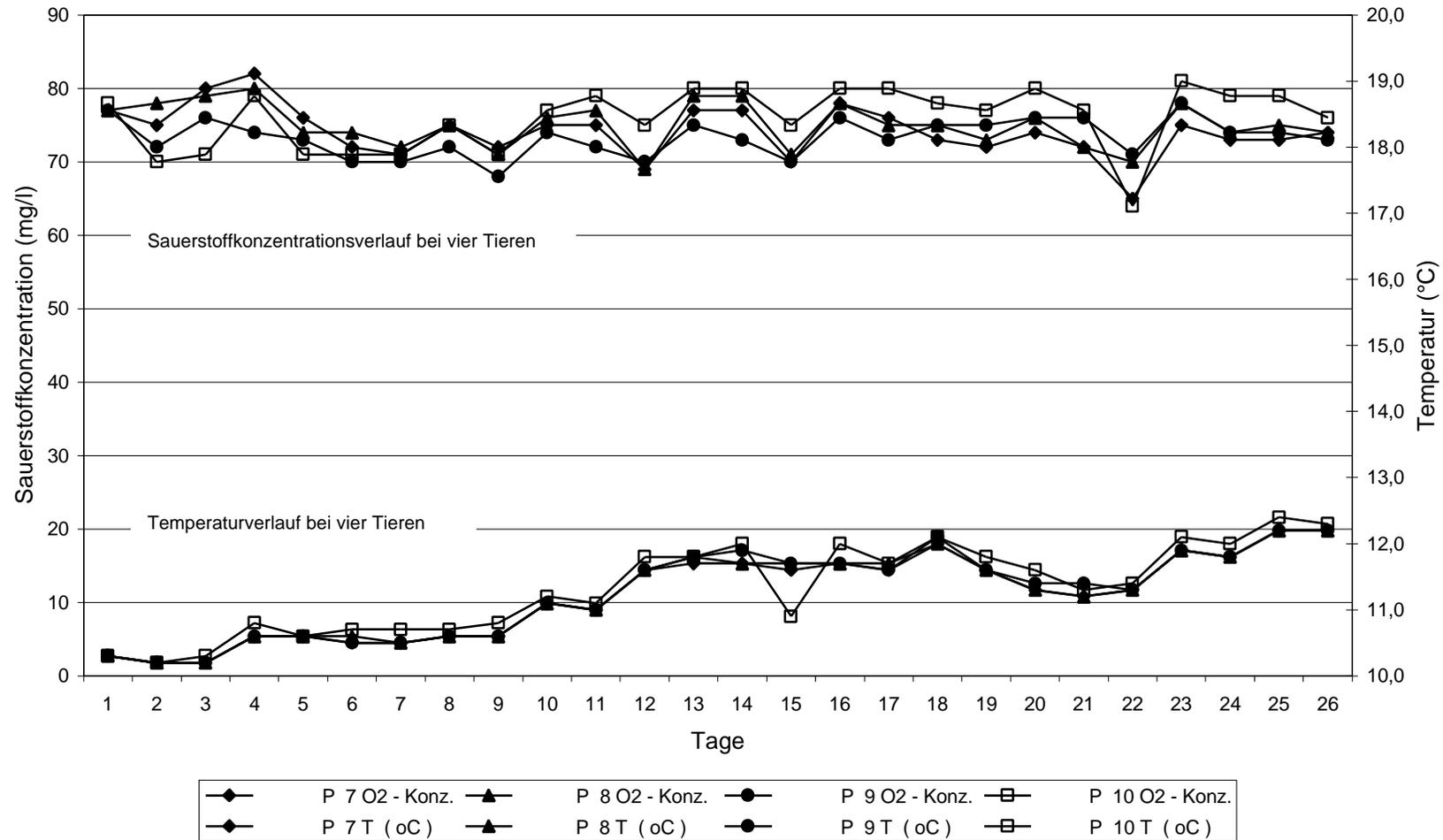
Anlage 3.2.4 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/l) bei exponierten Tieren P 1 – P 3



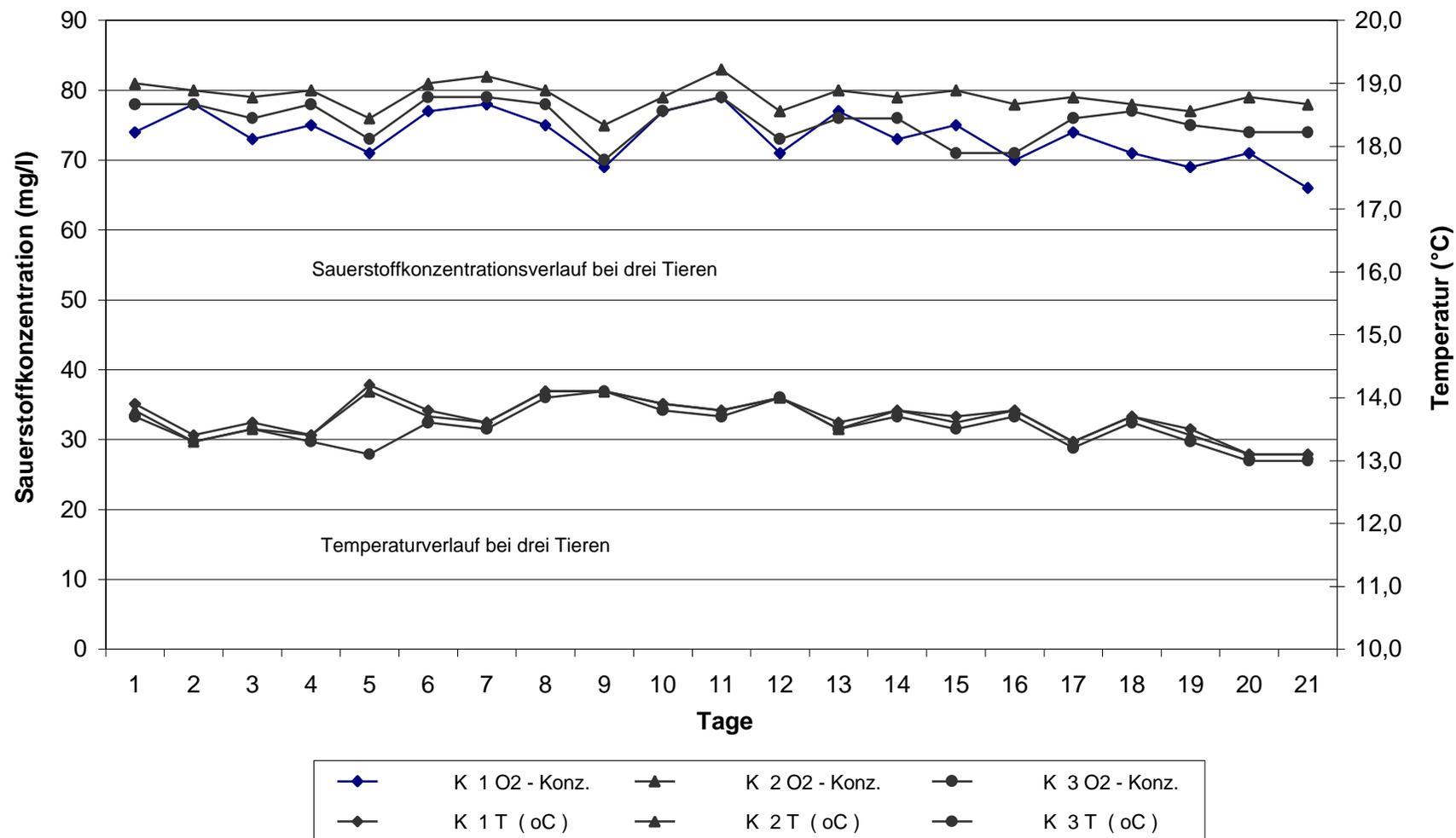
Anlage 3.2.5 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/l) bei exponierten Tieren P 4 – P 6



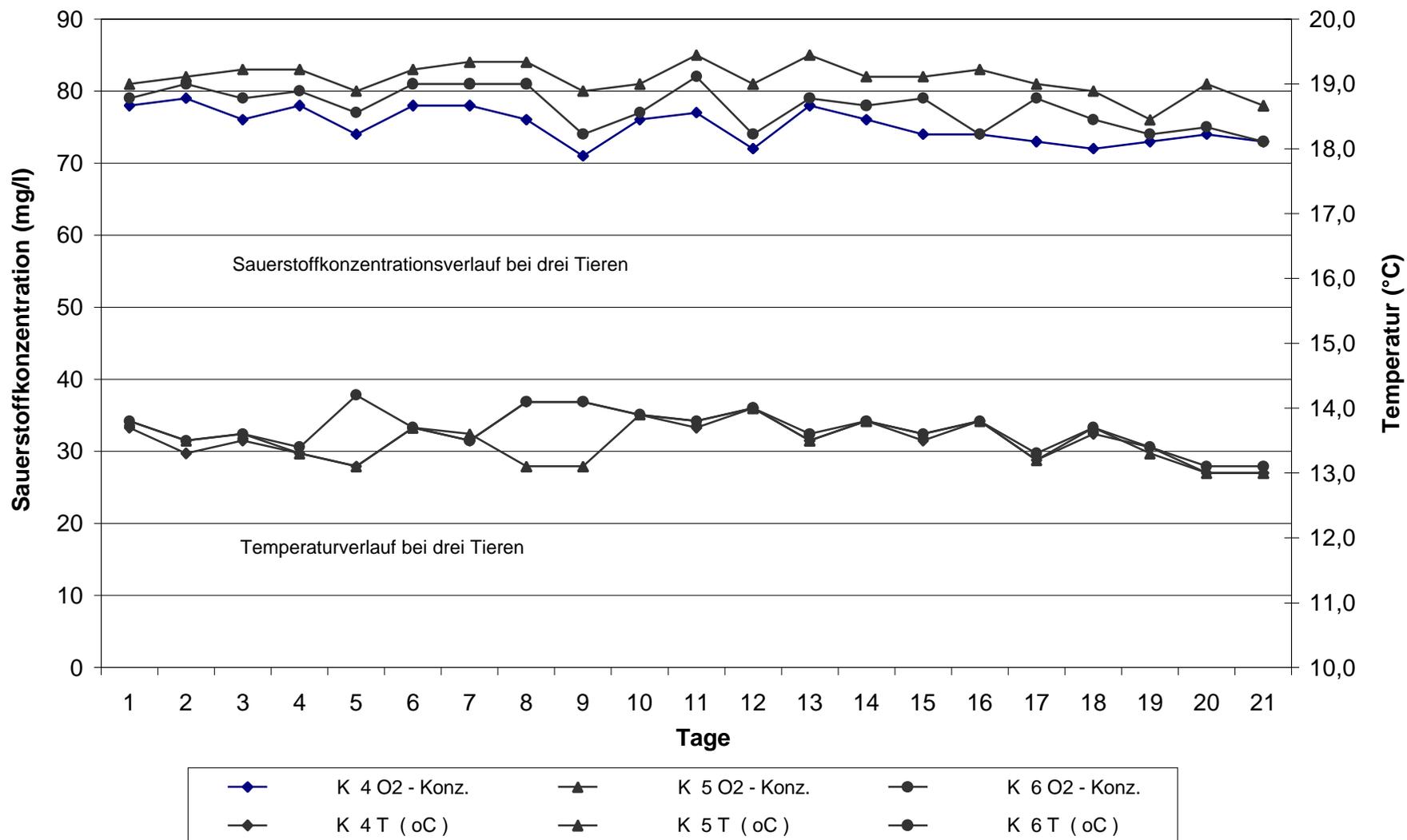
Anlage 3.2.6 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 2 (2 mg 4 CA/l) bei exponierten Tieren P 7 – P 10



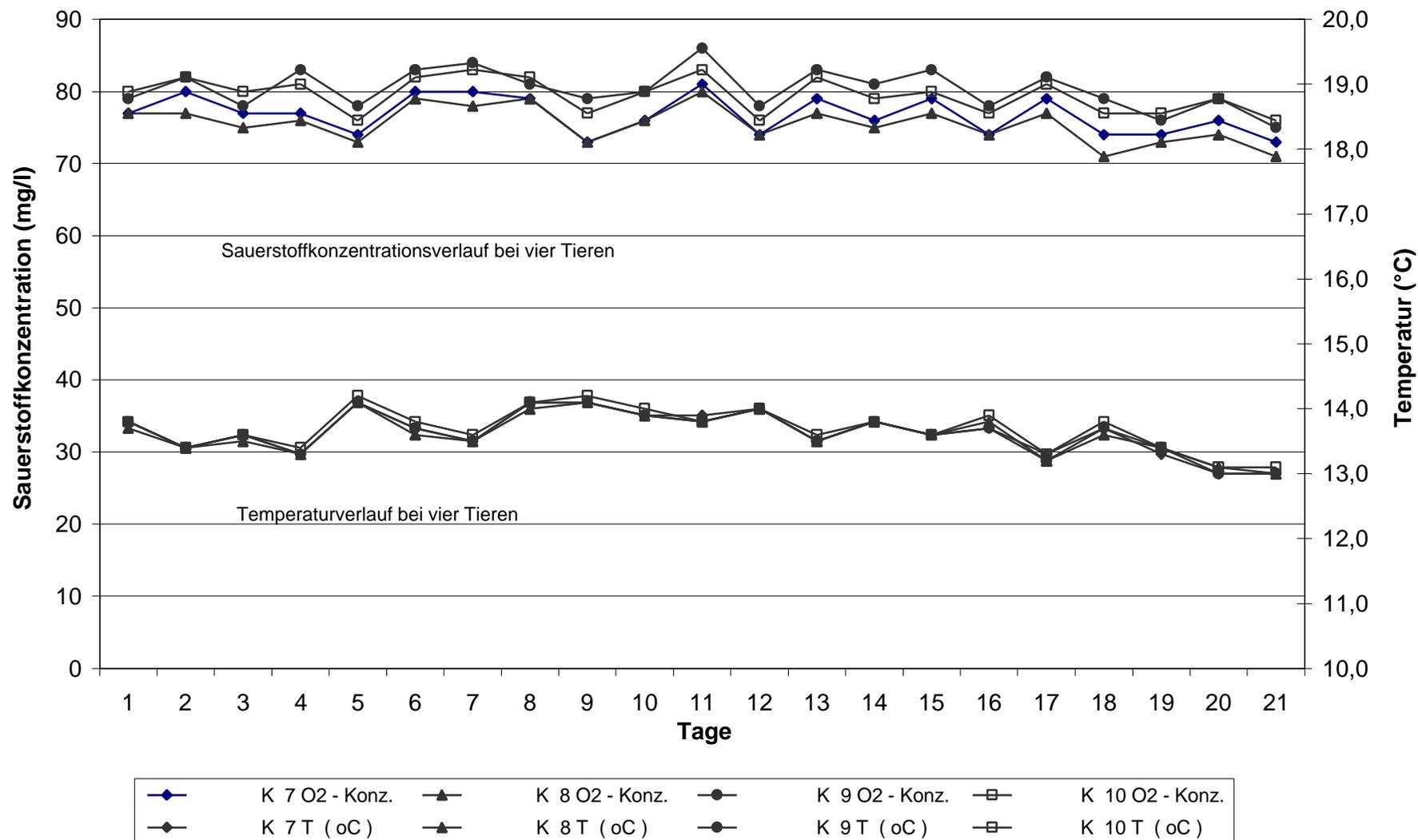
Anlage 3.3.1 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/l) bei den Kontrolltieren K 1 – K 3



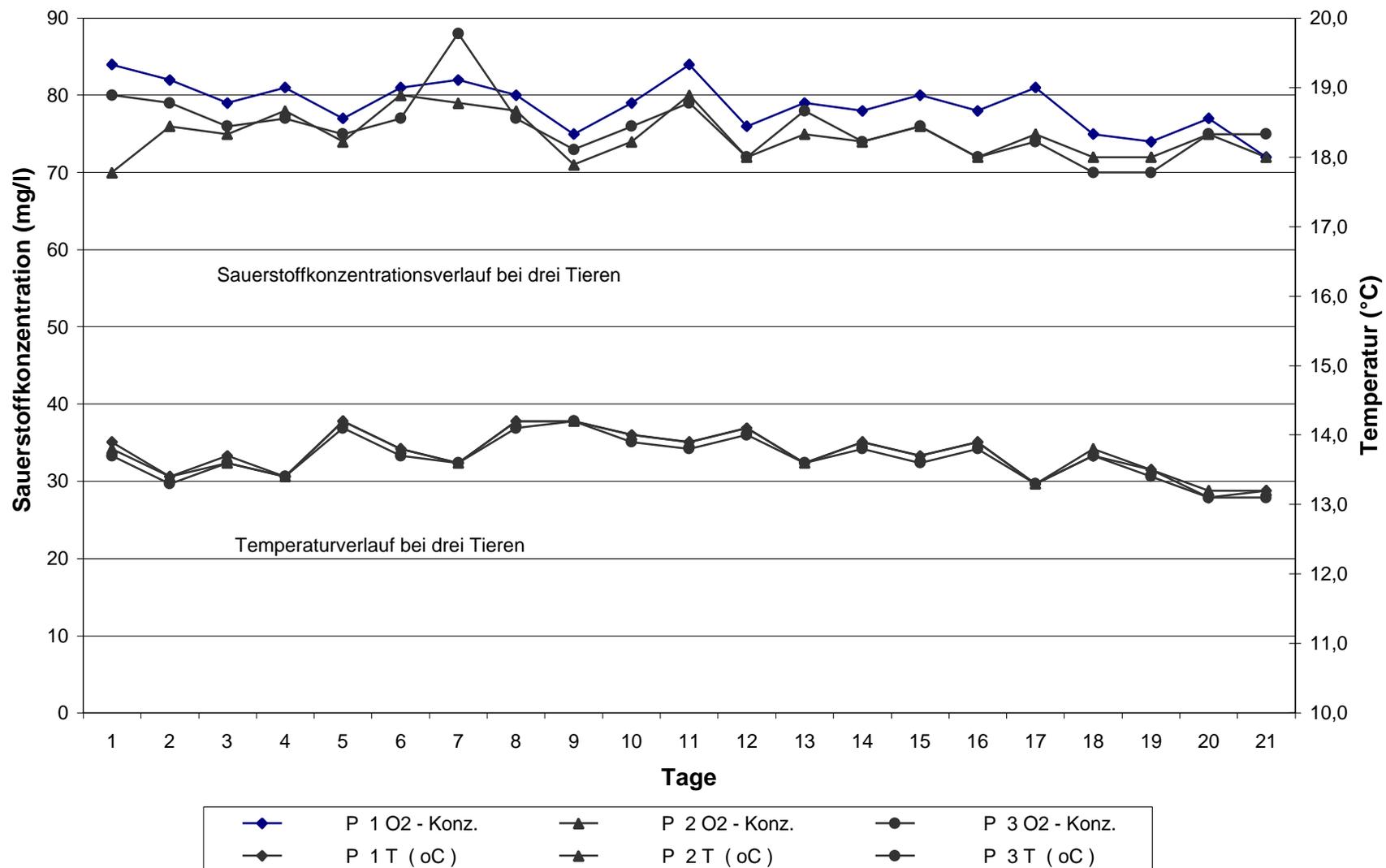
Anlage 3.3.2 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/l) bei den Kontrolltieren K 4 – K 6



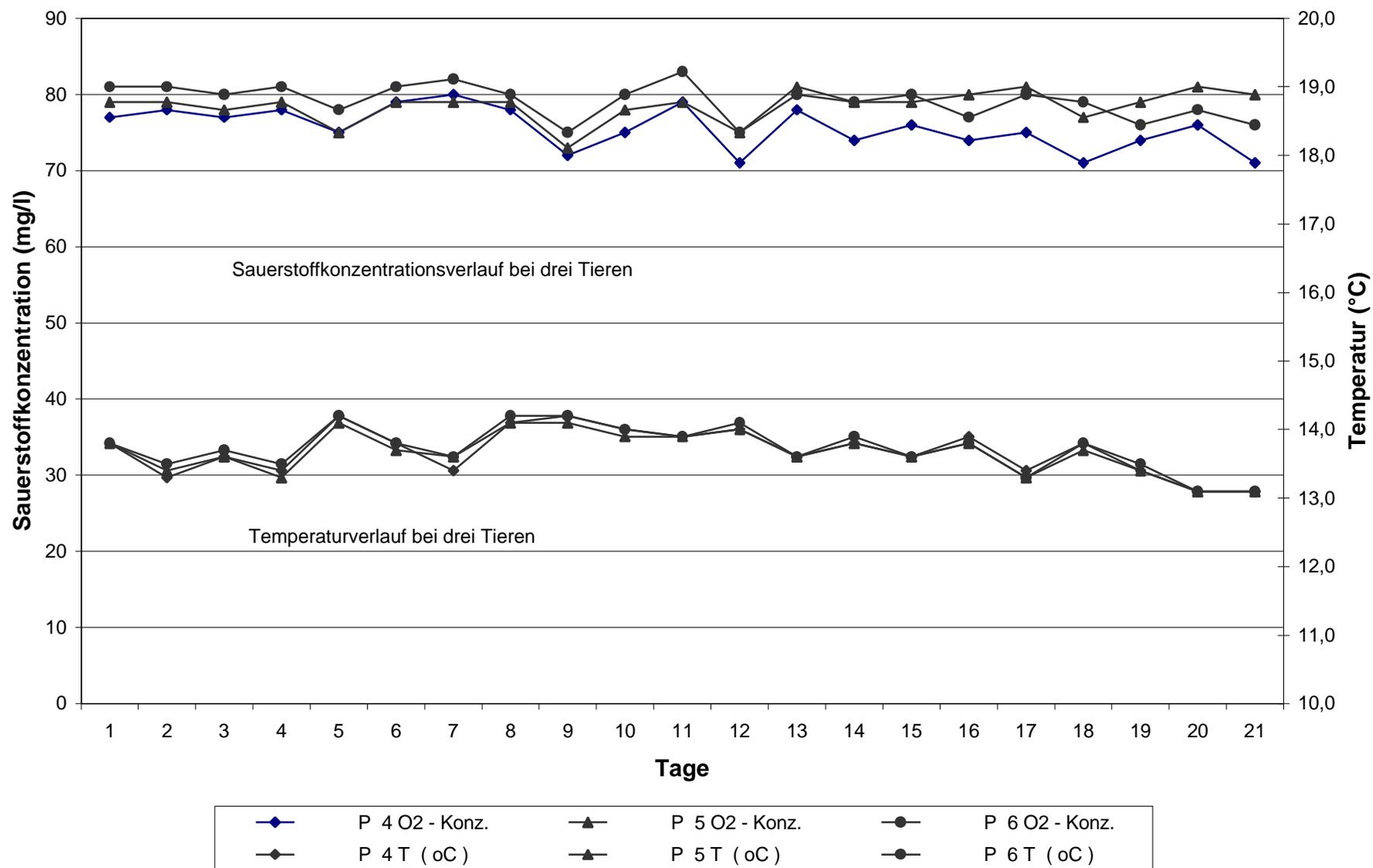
Anlage 3.3.3 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/l) bei den Kontrolltieren K 7 – K 10



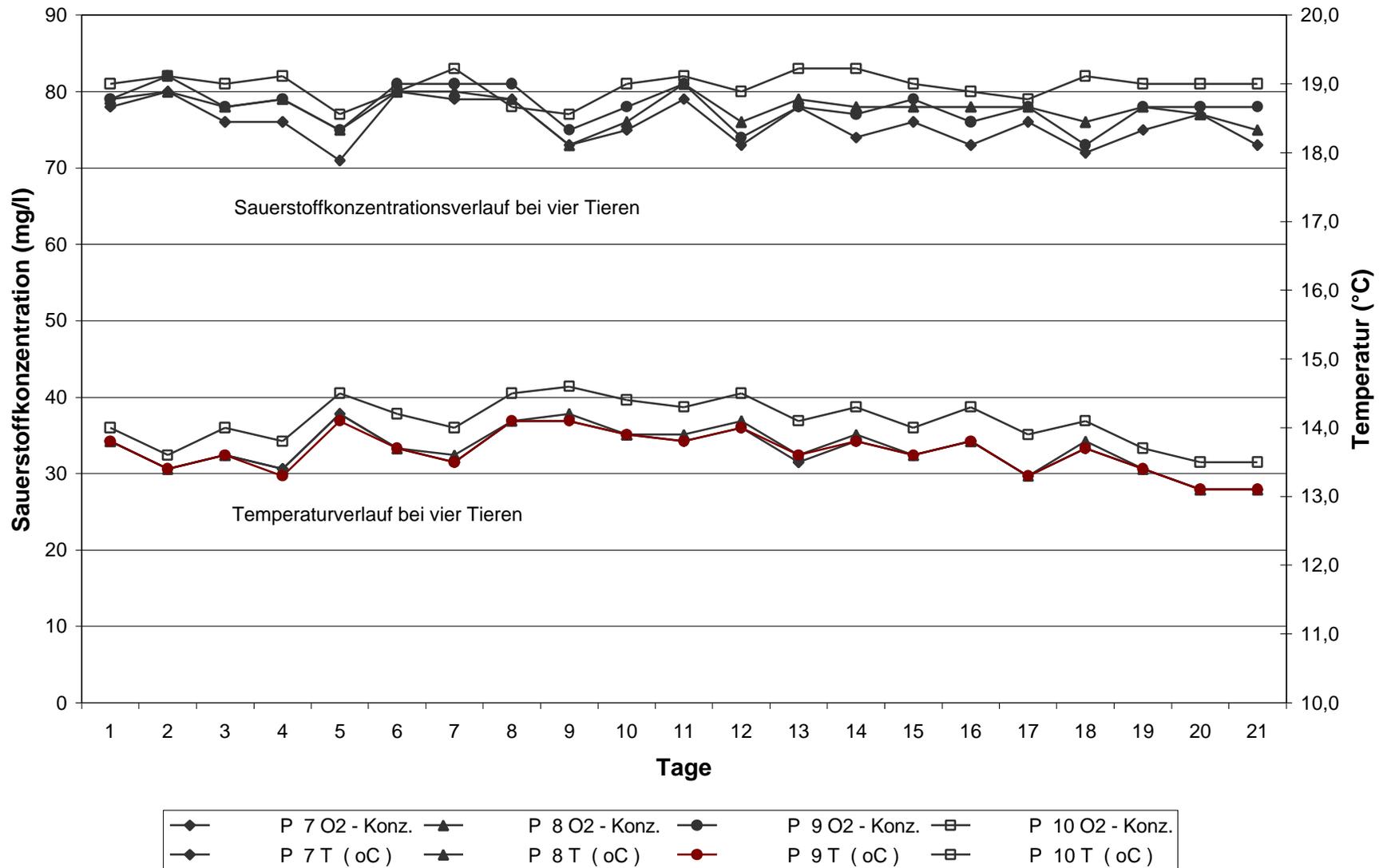
Anlage 3.3.4 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/l) bei den exponierten Tieren P 1 – P 3



Anlage 3.3.5 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/l) bei den exponierten Tieren P 4 – P 6



Anlage 3.3.6 Sauerstoffkonzentrations- und Temperaturverlauf im Versuch 3 (4 mg 4 CA/l) bei den exponierten Tieren P 7 – P 10



Anlage 4

Anlage 4.1.1 As Versuch 3 (4 mg CAI) : Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und in Prozent) zwischen 1. und 2. Analyse der Kontrolltiere

Plasma	Datum / Zeit	Aminosäure	ASP	GLU	GLN	GLY	THR	HIS	CIT
K 1.1	12:16	nMol/ml	325,62	31,81	852,24	642,68	438,76	418,51	0,00
K 1.2	13:42		347,04	31,93	867,03	685,33	451,59	419,71	37,59
Differenz	2.An.- 1.An.		21,42	0,12	14,80	42,65	12,82	1,20	37,59
Differenz in %			93,83	99,62	98,29	93,78	97,16	99,71	.
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		6,17	0,38	1,71	6,22	2,84	0,29	0,00
K 2.1	10:52	nMol/ml	486,87	33,48	658,35	986,46	325,86	276,71	0,00
K 2.2	18:36		414,79	33,41	658,74	841,04	309,29	277,75	14,31
Differenz	2.An.- 1.An.		-72,07	-0,07	0,39	-145,42	-16,56	1,04	14,31
Differenz in %			85,20	99,80	99,94	85,26	94,92	99,63	0,00
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		14,80	0,20	0,06	14,74	5,08	0,37	0,00

Plasma	Datum / Zeit	Aminosäure	ASP	GLU	GLN	GLY	THR	HIS	CIT
K 3.1	19:56	nMol/ml	431,00	16,89	866,13	897,10	431,88	253,02	13,67
K 3.2	21:16		420,45	0,00	870,82	858,73	429,90	255,05	0,00
Differenz	2.An.- 1.An.		-10,55	-16,89	4,69	-38,37	-1,98	2,03	-13,67
Differenz in %			97,55.		99,46	95,72	99,54	99,20.	
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		2,45	0,00	0,54	4,28	0,46	0,80	0,00
K 4.1	03:57	nMol/ml	432,95	39,17	677,17	777,73	303,79	289,94	16,73
K 4.2	05:17		389,14	39,81	691,42	764,95	308,70	288,41	18,15
Differenz	2.An.- 1.An.		-43,81	0,64	14,25	-12,78	4,90	-1,53	1,42
Differenz in %			89,88	98,40	97,94	98,36	98,41	99,47	92,19
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		10,12	1,60	2,06	1,64	1,59	0,53	7,81
K 5.1	12:12	nMol/ml	395,58	14,71	559,24	839,32	301,27	254,41	14,38
K 5.2	13:32		374,59	14,89	562,15	772,03	305,60	247,44	14,48
Differenz	2.An.- 1.An.		-20,98	0,18	2,91	-67,28	4,33	-6,98	0,10
Differenz in %			94,70	98,77	99,48	91,98	98,58	97,26	99,32
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		5,30	1,23	0,52	8,02	1,42	2,74	0,68

**Anlage 4.1.2 As Versuch 3 (4 mg CAI) : Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und in Prozent)
zwischen 1. und 2. Analyse der Kontrolltiere**

	ALA	TAU	ARG	TYR	VAL	MET	ILE	PHE	LEU	LYS
K 1.1	544,17	355,28	180,29	10,02	600,89	195,92	195,11	143,46	541,01	428,79
K 1.2	536,19	351,76	178,53	10,06	641,23	195,24	196,91	143,95	544,05	411,83
Differenz	-7,98	-3,52	-1,76	0,04	40,34	-0,67	1,80	0,49	3,04	-16,96
Differenz in %	98,53	99,01	99,03	99,63	93,71	99,66	99,09	99,66	99,44	96,04
	1,47	0,99	0,97	0,37	6,29	0,34	0,91	0,34	0,56	3,96
K 2.1	507,84	388,49	218,96	100,11	632,97	58,93	201,54	138,98	387,25	328,68
K 2.2	508,25	378,70	220,14	102,68	627,26	62,91	198,31	138,28	389,08	349,21
Differenz	0,41	-9,78	1,18	2,57	-5,71	3,98	-3,23	-0,70	1,83	20,53
Differenz in %	99,92	97,48	99,46	97,50	99,10	93,67	98,40	99,50	99,53	94,12
	0,08	2,52	0,54	2,50	0,90	6,33	1,60	0,50	0,47	5,88
K 3.1	554,51	251,25	241,31	138,00	711,74	187,75	220,52	143,50	447,50	371,35
K 3.2	565,37	252,10	240,64	141,81	732,79	188,44	224,38	145,36	457,52	403,04
Differenz	10,86	0,84	-0,67	3,81	21,05	0,69	3,86	1,86	10,02	31,70
Differenz in %	98,08	99,67	99,72	97,31	97,13	99,64	98,28	98,72	97,81	92,14
	1,92	0,33	0,28	2,69	2,87	0,36	1,72	1,28	2,19	7,86

	ALA	TAU	ARG	TYR	VAL	MET	ILE	PHE	LEU	LYS
K 4.1	420,15	467,45	131,59	132,27	405,20	130,11	159,70	81,67	228,26	222,81
K 4.2	421,31	478,06	132,13	132,68	408,49	131,53	160,86	81,40	224,45	233,98
Differenz	1,17	10,61	0,54	0,41	3,29	1,41	1,15	-0,27	-3,81	11,16
Differenz in %	99,72	97,78	99,59	99,69	99,19	98,93	99,28	99,67	98,33	95,23
	0,28	2,22	0,41	0,31	0,81	1,07	0,72	0,33	1,67	4,77
K 5.1	376,62	218,08	89,11	38,42	379,76	96,47	124,85	58,65	202,33	195,01
K 5.2	370,27	216,96	89,12	38,05	376,32	95,30	123,27	58,32	200,96	187,91
Differenz	-6,35	-1,13	0,01	-0,37	-3,44	-1,17	-1,58	-0,34	-1,36	-7,10
Differenz in %	98,31	99,48	99,99	99,03	99,09	98,79	98,74	99,43	99,33	96,36
	1,69	0,52	0,01	0,97	0,91	1,21	1,26	0,57	0,67	3,64

**Anlage 4.1.3 As Versuch 3 (4 mg CAI): Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und in Prozent)
zwischen 1. und 2. Analyse der Kontrolltiere**

Plasma	Datum / Zeit	Aminosäure	ASP	GLU	GLN	GLY	THR	HIS	CIT
K 6.1	20:13	nMol/ml	399,17	61,05	1132,23	969,42	537,39	366,62	0,00
K 6.2	21:33		400,74	61,08	1122,95	1002,43	538,34	387,16	0,00
Differenz	2.An.- 1.An.		1,57	0,03	-9,28	33,01	0,95	20,55	0,00
Differenz in %			99,61	99,95	99,18	96,71	99,82	94,69	
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		0,39	0,05	0,82	3,29	0,18	5,31	0,00
K 7.1	22:53	nMol/ml	391,68	30,04	900,03	820,11	301,55	325,76	0,00
K 7.2	00:13		378,48	30,41	916,45	786,88	306,42	340,67	12,05
Differenz	2.An.- 1.An.		-13,20	0,37	16,41	-33,24	4,86	14,90	12,05
Differenz in %			96,63	98,78	98,21	95,95	98,41	95,63	0,00
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		3,37	1,22	1,79	4,05	1,59	4,37	0,00
K 8.1	06:54	nMol/ml	395,40	44,59	713,62	1013,25	416,14	297,31	47,09
K 8.2	08:15		402,65	44,23	721,97	987,62	435,99	299,92	45,76
Differenz	2.An.- 1.An.		7,25	-0,35	8,35	-25,63	19,86	2,61	-1,33
Differenz in %			98,20	99,21	98,84	97,47	95,45	99,13	97,18
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		1,80	0,79	1,16	2,53	4,55	0,87	2,82

Plasma	Datum / Zeit	Aminosäure	ASP	GLU	GLN	GLY	THR	HIS	CIT
K 9.1	09:35	nMol/ml	404,30	21,30	879,56	851,32	387,70	312,50	0,00
K 9.2	10:55		393,15	21,40	886,37	836,98	399,00	306,12	0,00
Differenz	2.An.- 1.An.		-11,15	0,10	6,80	-14,34	11,30	-6,38	0,00
Differenz in %			97,24	99,54	99,23	98,32	97,17	97,96	
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		2,76	0,46	0,77	1,68	2,83	2,04	0,00
K 10.1	21:45	nMol/ml	394,74	23,16	834,50	943,55	394,97	289,67	37,48
K 10.2	23:05		412,73	23,83	826,87	1096,04	391,88	310,41	38,56
Differenz	2.An.- 1.An.		18,00	0,67	-7,64	152,48	-3,09	20,74	1,08
Differenz in %			95,64	97,17	99,08	86,09	99,22	93,32	97,21
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		4,36	2,83	0,92	13,91	0,78	6,68	2,79

**Anlage 4.1.4 As Versuch 3 (4 mg CAI): Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und in Prozent)
zwischen 1. und 2. Analyse der Kontrolltiere**

	ALA	TAU	ARG	TYR	VAL	MET	ILE	PHE	LEU	LYS
K 6.1	547,44	823,54	245,98	80,47	559,95	153,44	184,97	124,41	317,31	535,08
K 6.2	556,70	813,64	244,76	80,62	557,42	152,23	180,83	125,44	316,64	513,90
Differenz	9,26	-9,90	-1,22	0,15	-2,53	-1,20	-4,14	1,03	-0,67	-21,18
Differenz in %	98,34	98,80	99,50	99,81	99,55	99,21	97,76	99,18	99,79	96,04
	1,66	1,20	0,50	0,19	0,45	0,79	2,24	0,82	0,21	3,96
K 7.1	440,40	412,41	156,43	99,75	407,60	148,08	185,86	88,36	238,81	285,74
K 7.2	455,31	410,33	156,47	98,25	406,02	149,48	184,15	89,12	239,36	264,34
Differenz	14,92	-2,08	0,05	-1,51	-1,59	1,40	-1,71	0,76	0,56	-21,40
Differenz in %	96,72	99,50	99,97	98,49	99,61	99,06	99,08	99,15	99,77	92,51
	3,28	0,50	0,03	1,51	0,39	0,94	0,92	0,85	0,23	7,49
K 8.1	405,58	700,40	155,15	72,30	591,50	134,06	171,11	121,87	311,54	370,96
K 8.2	421,36	698,97	155,55	74,35	600,52	135,71	173,81	123,07	314,34	380,62
Differenz	15,78	-1,43	0,40	2,05	9,02	1,65	2,70	1,20	2,80	9,66
Differenz in %	96,25	99,80	99,75	97,24	98,50	98,79	98,45	99,02	99,11	97,46
	3,75	0,20	0,25	2,76	1,50	1,21	1,55	0,98	0,89	2,54

	ALA	TAU	ARG	TYR	VAL	MET	ILE	PHE	LEU	LYS
K 9.1	396,44	255,57	112,35	57,81	464,95	104,94	157,35	84,50	261,59	265,58
K 9.2	407,23	250,86	111,73	57,84	465,21	105,27	157,81	83,59	260,35	253,03
Differenz	10,79	-4,71	-0,62	0,03	0,26	0,33	0,46	-0,91	-1,25	-12,56
Differenz in %	97,35	98,16	99,45	99,95	99,94	99,69	99,71	98,92	99,52	95,27
	2,65	1,84	0,55	0,05	0,06	0,31	0,29	1,08	0,48	4,73
K 10.1	499,05	312,13	170,69	86,23	500,67	144,41	185,35	123,45	297,85	332,11
K 10.2	481,59	317,44	171,46	84,94	505,47	144,74	184,00	125,69	297,45	295,36
Differenz	-17,46	5,31	0,77	-1,29	4,80	0,33	-1,35	2,24	-0,41	-36,75
Differenz in %	96,50	98,33	99,55	98,50	99,05	99,77	99,27	98,22	99,86	88,93
	3,50	1,67	0,45	1,50	0,95	0,23	0,73	1,78	0,14	11,07
	2,03	1,20	0,40	1,28	1,51	1,28	1,19	0,85	0,75	5,59
	1,20	0,78	0,27	1,02	1,75	1,72	0,56	0,43	0,64	2,42

Anlage 4.1.5 As Versuch 3 (4 mg CAI) : Mittelwerte der Mittelwert-Differenzen der prozentualen Abweichungen zwischen der 1. und 2. Analyse

	ASP	GLU	SER	GLN	GLY	THR	HIS	CIT
Mittelwert der Mittelwert-Differenzen in %	5,15	0,82	2,72	1,03	6,04	2,13	2,40	3,53
SD	± 4,12	± 0,83	± 2,68	± 0,61	± 4,55	± 1,58	± 2,19	± 2,64

	ALA	TAU	ARG	TYR	VAL	MET	ILE	PHE
Mittelwert der Mittelwert-Differenzen in %	2,03	1,20	0,40	1,28	1,51	1,28	1,19	0,85
SD	± 1,20	± 0,78	± 0,27	± 1,02	± 1,75	± 1,72	± 0,56	

	LEU	LYS
Mittelwert der Mittelwert-Differenzen in %	0,75	5,59
SD	± 0,64	± 2,42

**Anlage 4.2.1 As Versuch 3 (4 mg CAI): Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und in Prozent)
zwischen 1. und 2. Analyse der exponierten Tiere**

Plasma	Zeit		ASP	GLU	SER	GLN	GLY	THR	HIS	CIT
P 1.1	11:37	nMol/ml	407,94	34,37	299,21	767,88	933,53	443,67	278,18	46,12
P 1.2	12:57		412,58	34,94	294,95	750,44	965,31	449,71	296,73	44,90
Differenz	2.An.- 1.An.		4,64	0,57	-4,26	-17,43	31,79	6,04	18,55	-1,23
Differenz in %			98,88	98,36	98,58	97,73	96,71	98,66	93,75	97,34
D= 100-Diff.%	entspricht Diff. zw. 1.+2. Anal.		1,12	1,64	1,42	2,27	3,29	1,34	6,25	2,66
P 2.1	14:17	nMol/ml	286,99	19,21	264,61	644,66	571,17	375,08	230,58	68,62
P 2.2	15:37		299,43	20,47	280,64	670,51	594,53	390,46	239,45	72,01
Differenz	2.An.- 1.An.		12,45	1,26	16,03	25,84	23,35	15,38	8,88	3,39
Differenz in %			95,84	93,83	94,29	96,15	96,07	96,06	96,29	95,29
D= 100-Diff.%	entspricht Diff. zw. 1.+2. Anal.		4,16	6,17	5,71	3,85	3,93	3,94	3,71	4,71
P 3.1	22:36	nMol/ml	451,31	25,73	149,70	954,23	950,12	216,98	315,90	41,23
P 3.2	23:57		430,81	25,96	154,11	952,31	874,08	265,77	311,85	43,32
Differenz	2.An.- 1.An.		-20,50	0,23	4,41	-1,93	-76,04	48,79	-4,05	2,08
Differenz in %			95,46	99,12	97,14	99,80	92,00	81,64	98,72	95,19
D= 100-Diff.%	entspricht Diff. zw. 1.+2. Anal.		4,54	0,88	2,86	0,20	8,00	18,36	1,28	4,81

Plasma	Zeit		ASP	GLU	SER	GLN	GLY	THR	HIS	CIT
P 4.1	01:17	nMol/ml	418,41	32,40	218,01	912,91	845,85	412,99	305,87	67,52
P 4.2	02:37		426,42	33,47	223,44	910,20	879,76	418,30	302,98	71,90
Differenz	2.An.- 1.An.		8,00	1,08	5,43	-2,71	33,91	5,31	-2,89	4,38
Differenz in %			98,12	96,78	97,57	99,70	96,15	98,73	99,05	93,91
D= 100-Diff.%	entspricht Diff. zw. 1.+2. Anal.		1,88	3,22	2,43	0,30	3,85	1,27	0,95	6,09
P 5.1	14:52	nMol/ml	419,29	13,98	79,03	1283,23	379,98	418,12	180,56	0,00
P 5.2	16:13		440,09	14,52	86,09	1274,52	384,44	420,73	186,63	0,00
Differenz	2.An.- 1.An.		20,80	0,54	7,06	-8,71	4,46	2,61	6,07	0,00
Differenz in %			95,27	96,29	91,80	99,32	98,84	99,38	96,75	
D= 100-Diff.%	entspricht Diff. zw. 1.+2. Anal.		4,73	3,71	8,20	0,68	1,16	0,62	3,25	0,00

**Anlage 4.2.2 As Versuch 3 (4 mg CAI): Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und prozentual)
zwischen 1. und 2. Analyse der exponierten Tiere**

	ALA	TAU	ARG	TYR	VAL	MET	ILE	PHE	LEU	LYS
P 1.1	358,13	226,72	148,64	223,77	645,09	163,78	332,00	142,92	353,72	292,93
P 1.2	343,05	228,66	149,02	222,94	643,78	163,28	328,97	143,14	352,53	275,68
Differenz	-15,08	1,94	0,39	-0,83	-1,31	-0,50	-3,03	0,22	-1,19	-17,25
Differenz in %	95,79	99,15	99,74	99,63	99,80	99,70	99,09	99,85	99,66	94,11
	4,21	0,85	0,26	0,37	0,20	0,30	0,91	0,15	0,34	5,89
P 2.1	316,61	165,63	194,20	170,02	590,58	209,98	360,05	132,29	313,09	367,17
P 2.2	334,08	174,05	204,55	177,38	607,57	213,14	376,64	132,98	335,83	374,99
Differenz	17,46	8,42	10,35	7,36	16,99	3,16	16,58	0,69	22,74	7,82
Differenz in %	94,77	95,16	94,94	95,85	97,20	98,52	95,60	99,48	93,23	97,91
	5,23	4,84	5,06	4,15	2,80	1,48	4,40	0,52	6,77	2,09

	ALA	TAU	ARG	TYR	VAL	MET	ILE	PHE	LEU	LYS
P 3.1	392,55	423,24	104,12	59,83	358,49	98,03	131,83	102,02	192,62	288,65
P 3.2	394,70	422,53	103,23	60,50	350,09	97,22	127,93	103,09	196,64	315,33
Differenz	2,15	-0,72	-0,89	0,66	-8,40	-0,81	-3,89	1,07	4,02	26,68
Differenz in %	99,46	99,83	99,14	98,91	97,66	99,17	97,05	98,96	97,95	91,54
	0,54	0,17	0,86	1,09	2,34	0,83	2,95	1,04	2,05	8,46
P 4.1	339,05	362,95	136,25	116,39	373,75	152,32	212,70	85,23	213,02	236,76
P 4.2	342,67	364,98	135,85	118,81	378,00	150,88	213,30	86,40	213,13	237,30
Differenz	3,62	2,03	-0,41	2,42	4,25	-1,44	0,60	1,18	0,11	0,54
Differenz in %	98,94	99,44	99,70	97,96	98,88	99,06	99,72	98,64	99,95	99,77
	1,06	0,56	0,30	2,04	1,12	0,94	0,28	1,36	0,05	0,23
P 5.1	303,82	251,91	102,66	36,11	498,06	94,78	88,53	142,65	291,78	273,75
P 5.2	313,10	248,65	101,67	36,61	497,89	94,06	87,62	145,42	302,24	275,61
Differenz	9,29	-3,26	-0,99	0,50	-0,18	-0,73	-0,90	2,77	10,46	1,86
Differenz in %	97,03	98,71	99,04	98,62	99,96	99,23	98,98	98,10	96,54	99,33
	2,97	1,29	0,96	1,38	0,04	0,77	1,02	1,90	3,46	0,67

**Anlage 4.2.3 As Versuch 3 (4 mg CAI): Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und prozentual)
zwischen 1. und 2. Analyse der exponierten Tiere**

Plasma	Zeit	Aminosäure	ASP	GLU	SER	GLN	GLY	THR	HIS	CIT
P 6.1	17:33	nMol/ml	426,67	36,29	236,33	894,75	923,71	489,40	399,39	0,00
P 6.2	18:53		409,67	36,62	231,15	883,33	872,91	486,55	415,92	36,93
Differenz	2.An.- 1.An.		-17,01	0,33	-5,18	-11,42	-50,80	-2,86	16,54	36,93
Differenz in %			96,01	99,09	97,81	98,72	94,50	99,42	96,02	0,00
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		3,99	0,91	2,19	1,28	5,50	0,58	3,98	0,00
P 7.1	01:34	nMol/ml	467,43	26,49	352,36	1056,50	1248,78	483,38	332,39	69,10
P 7.2	02:54		435,15	26,79	315,30	1044,76	1188,27	488,26	347,02	66,35
Differenz	2.An.- 1.An.		-32,28	0,30	-37,06	-11,74	-60,51	4,88	14,64	-2,75
Differenz in %			93,09	98,90	89,48	98,89	95,15	99,00	95,78	96,02
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		6,91	1,10	10,52	1,11	4,85	1,00	4,22	3,98
P 8.1	04:14	nMol/ml	437,89	37,22	277,39	884,91	938,95	381,90	258,10	18,79
P 8.2	05:34		409,32	38,09	280,21	877,87	843,50	387,72	256,61	0,00
Differenz	2.An.- 1.An.		-28,57	0,87	2,82	-7,04	-95,45	5,82	-1,49	-18,79
Differenz in %			93,48	97,73	99,00	99,20	89,83	98,50	99,42	0,00
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		6,52	2,27	1,00	0,80	10,17	1,50	0,58	0,00

Plasma	Zeit	Aminosäure	ASP	GLU	SER	GLN	GLY	THR	HIS	CIT
P 9.1	16:24	nMol/ml	424,19	22,41	263,73	1203,23	1016,79	380,20	228,08	0,00
P 9.2	17:44		426,19	22,37	263,40	1152,61	1054,05	370,52	211,29	26,48
Differenz	2.An.- 1.An.		2,01	-0,04	-0,33	-50,63	37,26	-9,68	-16,79	26,48
Differenz in %			99,53	99,81	99,87	95,79	96,46	97,45	92,64	0,00
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		0,47	0,19	0,13	4,21	3,54	2,55	7,36	0,00
P 10.1	19:04	nMol/ml	424,71	14,75	263,83	848,49	975,55	406,38	269,35	0,00
P 10.2 *	20:25		425,85	17,17	260,09	860,15	967,18	401,01	265,67	15,90
Differenz	2.An.- 1.An.		1,13	2,42	-3,73	11,66	-8,36	-5,37	-3,68	15,90
Differenz in %			99,73	85,89	98,58	98,64	99,14	98,68	98,63	0,00
D= 100-Diff.%	entspricht Diff.zw. 1.+2. Anal.		0,27	14,11	1,42	1,36	0,86	1,32	1,37	0,00
MW der MW-Differenzen in %			1,82	1,86	1,53	1,75	4,52	0,70	3,30	0,80
STABWN			2,28	3,94	3,25	1,24	2,70	5,13	2,18	1,12

Anlage 4.2.4 As Versuch 3 (4 mg CA/l): Differenzen der Aminosäure-Konzentrationen (absolut und prozentual)
zwischen 1. und 2. Analyse der exponierten Tiere

	ALA	TAU	ARG	TYR	VAL	MET	ILE	PHE	LEU	LYS
P 6.1	393,10	448,30	154,95	150,04	485,58	153,01	247,67	91,51	251,78	301,45
P 6.2	399,61	441,54	152,15	149,47	486,52	151,47	243,75	91,98	257,53	281,86
Differenz	6,51	-6,77	-2,80	-0,57	0,93	-1,54	-3,92	0,47	5,75	-19,59
Differenz in %	98,37	98,49	98,20	99,62	99,81	98,99	98,42	99,49	97,77	93,50
	1,63	1,51	1,80	0,38	0,19	1,01	1,58	0,51	2,23	6,50
P 7.1	402,53	239,79	203,52	175,52	675,29	190,34	245,45	131,02	377,22	317,78
P 7.2	412,21	233,73	205,37	177,34	674,59	190,33	245,11	132,55	372,44	333,35
Differenz	9,67	-6,06	1,85	1,82	-0,71	-0,01	-0,34	1,54	-4,78	15,57
Differenz in %	97,65	97,47	99,10	98,97	99,90	100,00	99,86	98,84	98,73	95,33
	2,35	2,53	0,90	1,03	0,10	0,00	0,14	1,16	1,27	4,67
P 8.1	435,71	411,79	181,23	297,41	602,87	208,35	450,09	151,16	336,66	335,86
P 8.2	442,75	403,80	181,25	291,48	598,46	207,16	445,00	152,07	331,53	354,06
Differenz	7,04	-7,99	0,03	-5,93	-4,41	-1,19	-5,09	0,91	-5,13	18,20
Differenz in %	98,41	98,06	99,98	98,00	99,27	99,43	98,87	99,40	98,48	94,86
	1,59	1,94	0,02	2,00	0,73	0,57	1,13	0,60	1,52	5,14

	ALA	TAU	ARG	TYR	VAL	MET	ILE	PHE	LEU	LYS
P 9.1	472,57	253,62	185,43	181,78	413,49	156,58	220,21	135,54	258,14	438,78
P 9.2	479,01	252,77	183,34	180,40	410,21	154,29	222,42	131,97	250,99	433,06
Differenz	6,44	-0,85	-2,08	-1,39	-3,28	-2,29	2,20	-3,57	-7,15	-5,73
Differenz in %	98,65	99,67	98,88	99,24	99,21	98,54	99,01	97,37	97,23	98,70
	1,35	0,33	1,12	0,76	0,79	1,46	0,99	2,63	2,77	1,30
P 10.1	529,69	180,83	166,16	186,43	658,49	156,98	227,96	173,81	360,09	341,38
P 10.2	531,33	183,72	163,32	185,65	651,41	157,79	226,60	174,44	358,82	359,94
Differenz	1,65	2,89	-2,84	-0,78	-7,07	0,81	-1,36	0,63	-1,27	18,56
Differenz in %	99,69	98,43	98,29	99,58	98,93	99,48	99,40	99,64	99,65	94,84
	0,31	1,57	1,71	0,42	1,07	0,52	0,60	0,36	0,35	5,16
MW der MW- Differenzen in %	0,72	0,79	0,56	0,46	0,29	0,36	0,44	0,53	0,81	2,28
STABWN	1,51	1,30	1,37	1,10	0,90	0,45	1,25	0,73	1,88	2,63

Lebenslauf

Persönliches

Name: Adolf Rüdiger Powa

Geburt: 15.12.1943 in Eulau, Kreis Tetschen

Eltern: Adolf Powa, Drogist
Aurelia Powa, geb. Lederer, Hausfrau

Familienstand: verheiratet seit dem 26.11.1971 mit Gabriele Powa, geb. Rothfuß,
zwei Töchter, Sabine, geb. 1977 und Kristina, geb. 1980.

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1951 – 1954 Grundschole Daxlanden

1954 – 1955 Helmholtz-Gymnasium Karlsruhe

1955 – 1964 Kant-Gymnasium Karlsruhe

März 1964 Reifeprüfung

Grundwehrdienst

04 / 1964 – 03 / 1966 Ausbildung und Dienst als Fernmelder,
Ausbildung zum Res. Offz.

Studium

SS 1966 Studienbeginn an der Universität Karlsruhe in der
Fachrichtung Biologie und Sport für das höhere Lehramt an
Gymnasien

SS 1968 – SS 1970 Wissenschaftliche Hilfskraft am Zoologischen Institut I der
Universität Karlsruhe

WS 1971 Staatsexamen in Biologie und Sport

SS 1971 / WS 1971/ 72 Lehrauftrag am Zoologischen Institut I der Universität Karlsruhe
zur Durchführung des Morphologischen Praktikums I.

Berufliche Laufbahn

04 / 1971 – 07 / 1972 Referendariat am Goethe-Gymnasium Karlsruhe
Nebenlehrer am Markgrafen-Gymnasium Karlsruhe

07 / 1972 Pädagogische Prüfung (2. Staatsexamen)

09 / 1972 bis heute Lehrer am Helmholtz-Gymnasium Karlsruhe
02 / 1974 Ernennung zum Landesbeamten

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt, nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und die Zitate gekennzeichnet habe.

Karlsruhe, im Januar 2006

