



Auswirkungen der Perfluoroktansulfonsäure (PFOS) auf Regenbogenforellen

Abschlussbericht zum F&E-Vorhaben 76c 040100 94



analytik



Auswirkungen der Perfluoroktansulfonsäure (PFOS) auf Regenbogenforellen

Abschlussbericht zum F&E-Vorhaben 76e 040100 94

Impressum

Auswirkungen der Perfluoroktansulfonsäure (PFOS) auf Regenbogenforellen

Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU)

Bürgermeister-Ulrich-Straße 160

86179 Augsburg

Tel.: (08 21) 90 71-0

Fax: (08 21) 90 71-55 56

E-Mail: poststelle@lfu.bayern.de

Internet: www.lfu.bayern.de

Bearbeitung/Text/Konzept:

Referat 78/ Dr. Julia Schwaiger, Hermann Ferling, Dr. Michael Gerst, Constanze Römer

Redaktion:

Referat 78

Bildnachweis:

Bayerisches Landesamt für Umwelt

Stand:

März 2011

Diese Druckschrift wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Sofern in dieser Druckschrift auf Internetangebote Dritter hingewiesen wird, sind wir für deren Inhalte nicht verantwortlich.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	6
3	Literaturübersicht	7
3.1	Substanzcharakterisierung PFOS	7
3.2	Vorkommen und Verhalten in der Umwelt	8
3.3	Vorkommen in Organismen	10
3.4	Toxikokinetik	13
3.5	Toxische Wirkungen von PFOS bei Säugetieren	15
3.6	Toxikologie bei aquatischen Organismen	16
4	Material und Methoden	21
4.1	Versuch I: Untersuchungen zur toxischen Wirkung von PFOS	21
4.1.1	Versuchsdurchführung	21
4.1.2	Untersuchungsmethoden	24
4.1.2.1	Hämatologische Untersuchungen	24
4.1.2.2	Klinisch-chemische Untersuchungen	25
4.1.2.3	Histopathologische Untersuchungen	25
4.1.2.4	Rückstandsanalysen	26
4.1.3	Statistische Auswertung	26
4.2	Versuch II: Untersuchungen zur endokrinen Wirkung von PFOS	27
4.2.1	Versuchsdurchführung	27
4.2.2	Untersuchungsmethoden	28
4.2.2.1	Histologische Geschlechtsbestimmung und Untersuchungen zum gonadalen Reifegrad	28
4.2.2.2	Analyse von Sexualhormonen, Vitellogenin und Schilddrüsenhormonen	29
4.2.2.3	Statistische Auswertung	30
5	Ergebnisse	31
5.1	Versuch I: Untersuchungsergebnisse zur toxischen Wirkung von PFOS	31
5.1.1	Hämatologische Untersuchungsergebnisse	31
5.1.2	Klinisch-chemische Untersuchungsergebnisse	35
5.1.3	Histopathologische Untersuchungsergebnisse	42

5.1.4	Ergebnisse der Rückstandsanalysen	48
5.2	Versuch II: Untersuchungsergebnisse zur endokrinen Wirkung von PFOS	49
5.2.1	Histologische Geschlechtsbestimmung und Untersuchungen zum gonadalen Reifegrad	49
5.2.2	Ergebnisse der Analyse von Sexualhormonen, Vitellogenin und Schilddrüsenhormonen	50
6	Diskussion	60
7	Literaturverzeichnis	68

1 Zusammenfassung

Das Bayerische Landesamt für Umwelt (LfU) führte in den Jahren 2007 bis 2009 im Auftrag des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt und Gesundheit ein umfangreiches Untersuchungsprogramm zu möglichen Auswirkungen der Perfluoroktansulfonsäure (PFOS) auf Fische durch. Ziel war eine Erarbeitung chronischer Toxizitätsdaten bei Fischen um eine fundierte Risikoabschätzung und damit eine Festlegung ökotoxikologisch begründeter Grenzwerte für Oberflächengewässer zu ermöglichen.

Im ersten Abschnitt der Studie kamen zur Erfassung PFOS-induzierter toxischer Wirkungen klassische, medizinisch-toxikologische Untersuchungsmethoden wie Hämatologie, klinische Chemie und Histopathologie zum Einsatz. Darüber hinaus wurden chemische Analysen zum Nachweis von PFOS-Rückständen in verschiedenen Fischorganen durchgeführt. Der zweite Untersuchungsabschnitt diente der Ermittlung potentieller endokriner Wirkungen von PFOS. Diese Untersuchungen beinhalteten eine histologische Bestimmung von Geschlecht und gonadalem Reifegrad, die Analyse von Sexual- und Schilddrüsenhormonen sowie die Bestimmung von Vitellogenin. Zur Bearbeitung der beiden unterschiedlichen Fragestellungen wurde je ein 28-tägiger Expositionsversuch mit Regenbogenforellen unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Die Expositionskonzentrationen betragen jeweils 0,5, 1, 5, 10, 25 und 50 µg PFOS/L.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigen das Akkumulationspotential von PFOS und weisen auf eine Beeinflussung der Fischgesundheit durch die Substanz hin. Akut toxische Wirkungen oder schwerwiegende histopathologische Organveränderungen wurden in den geprüften Konzentrationsbereichen nicht beobachtet. Erste hämatologische und histopathologische Veränderungen traten in relativ hohen PFOS-Konzentrationen auf, denen keine Umweltrelevanz zukommt. Jedoch wurden bereits in niedrigen Testkonzentrationen Veränderungen beobachtet, die auf eine Beeinflussung hormoneller Regelkreise durch PFOS hinweisen. Von den Veränderungen waren in erster Linie weibliche Individuen betroffen. Ab einer Expositionskonzentration von 0,5 µg PFOS/L waren deutliche Veränderungen sowohl der Geschlechts- als auch der Schilddrüsenhormonspiegel nachweisbar. Darüber hinaus wurden in diesem Konzentrationsbereich Veränderungen einzelner klinisch-chemischer Parameter diagnostiziert, die auf eine Beeinflussung des Kohlenhydrat- bzw. des Proteinstoffwechsels hindeuten. Da in der niedrigsten getesteten Konzentration noch Effekte zu beobachten waren, ist von einer NOEC (no observed effect concentration) für PFOS von < 0,5 µg/L auszugehen.

Aufgrund der aktuellen Ergebnisse bietet die vorläufig für PFOS abgeleitete PNEC von 2 µg/L keinen ausreichenden Schutz für aquatische Organismen. Vor dem Hintergrund, dass neueste epidemiologische Untersuchungen auf eine Beeinflussung der Fruchtbarkeit beim Menschen durch PFOS hindeuten, erscheint es angezeigt, die vorliegenden Untersuchungen um Studien zur Reproduktionstoxizität zu ergänzen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen hormonellen Effekten und potentiellen Störungen reproduktionsbiologischer Parameter zu erfassen.

2 Einleitung

Die in jüngerer Zeit stetig wachsende Zahl an Veröffentlichungen zum Thema „Perfluorierte Tenside“ belegt das wissenschaftliche und öffentliche Interesse an dieser Stoffgruppe. Neben einer Vielzahl von Belegen zu deren weltweiter Verbreitung in der belebten und unbelebten Umwelt findet sich auch eine Reihe von Untersuchungen zur Toxizität. Dabei stand bislang die Bedeutung der Perfluoroktansulfonsäure (PFOS) als Hauptkontaminante bei verschiedenen Tierarten und auch beim Menschen im Vordergrund. Die Kontaminationspfade sind aufgrund der ubiquitären Verbreitung vielfältig. Als Haupteintragsweg in die Umwelt werden derzeit Einleitungen aus Kläranlagen angesehen.

Mit der Richtlinie 2006/122/EG (des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Dezember 2006) wurden das Inverkehrbringen und die Verwendung von PFOS stark eingeschränkt. Seit dem 27. Juni 2008 darf PFOS aufgrund der Einstufung als PBT-Stoff (Stoff mit den Eigenschaften: persistent, bioakkumulativ und toxisch) nur noch in definierten Ausnahmen in Verkehr gebracht und verwendet werden. PFOS wurde mittlerweile in die Liste der POPs (Persistent Organic Pollutants) nach der Stockholmer Konvention aufgenommen. Nach der Novellierung des Chemikalienrechts in der EU (REACH - VO (EG) Nr. 1907/ 2006) ist PFOS zulassungspflichtig. Die dort geforderten Nachweise verlangen aber für PFOS aufgrund des geringen Produktionsvolumens der Substanz keine Informationen zur Toxikokinetik und zur Reproduktionstoxizität. Eine umfassende Risikobeurteilung des Stoffes ist damit auch nach der neuen Chemikalien-Gesetzgebung nicht gewährleistet. Am Beispiel der PFOS lässt sich deshalb zeigen, dass zusätzlich zu der in REACH geforderten Vorgehensweise bei der Bewertung von umweltrelevanten Chemikalien in Einzelfällen zusätzliche Untersuchungen sinnvoll sein können, um eine sichere Risikobeurteilung zu erlangen.

Während zu den Wirkungen von PFOS auf warmblütige Wirbeltiere umfangreiche Literaturdaten verfügbar sind, finden sich zu Effekten auf aquatische Organismen relativ wenige Hinweise. Die in der Literatur angegebenen Daten beschränken sich auf die akute Toxizität bei aquatischen Organismen verschiedener Trophiestufen oder auf chronische Toxizitätsdaten, denen Endpunkte wie Mortalität oder Reproduktionserfolg zugrunde liegen. Experimentelle Studien an Fischen ergaben darüber hinaus Hinweise auf eine endokrine Wirksamkeit, eine Hepatotoxizität, eine Entwicklungstoxizität sowie ein kanzerogenes Potential von PFOS. Aussagekräftige Daten zu langfristigen Wirkungen umweltrelevanter Konzentrationen auf Fische liegen nicht vor.

Am Bayerischen Landesamt für Umwelt wurden deshalb in den Jahren 2007 bis 2009 umfangreiche Untersuchungen zur Erfassung toxischer Effekte von PFOS auf Fische durchgeführt. Neben hämatologischen, klinisch-chemischen und histopathologischen Untersuchungen erfolgten auch Studien zum Akkumulationsverhalten der Substanz. Zur Erfassung endokriner Wirkungen wurden Analysen der Sexual- und Schilddrüsenhormonspiegel sowie des Biomarkers Vitellogenin durchgeführt.

3 Literaturübersicht

3.1 Substanzcharakterisierung PFOS

Die Perfluoroktansulfonsäure (CAS-Nr. 1763-23-1, C₈-H-F₁₇-O₃-S) ist ein perfluoriertes Tensid aus der Gruppe der perfluorierten Alkylsulfonate. Der molekulare Aufbau ist charakterisiert durch ein perfluoriertes Kohlenstoffgerüst das endständig eine Sulfonat-Gruppe trägt (Abbildung 1).

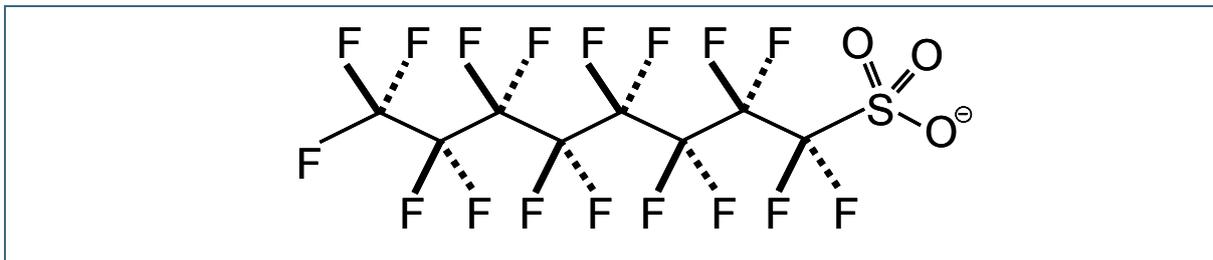


Abb. 1: Strukturformel von PFOS

Der amphiphile Charakter von PFOS ergibt sich einerseits aus der hydrophoben Eigenschaft des Kohlenstoffgerüsts, dessen Wasserstoffatome vollständig durch Fluoratome ersetzt sind und andererseits aus der hydrophilen Eigenschaft der Sulfonat-Gruppe. Die Stabilität der Kohlenstoff-Fluor-Bindung bedingt darüber hinaus die hohe thermische und chemische Stabilität der PFOS sowie deren Beständigkeit gegenüber UV-Strahlung und Verwitterung. Das Molekül weist ein Gewicht von 500,13 g mol⁻¹ auf. Der Oktanol/ Wasserkoeffizient (log K_{OW}) ist auf Grund der Tensideigenschaft der Verbindung nicht messbar (OECD, 2002). PFOS liegt unter Umweltbedingungen als freies Säureanion vor (3M, 2001) und weist infolgedessen eine gute Wasserlöslichkeit (570 mg/L) auf. Darüber hinaus besitzt sie einen sehr niedrigen Dampfdruck (3,31 x 10⁻⁴ Pa bei 20 °C) und weist wegen der ausgeprägten Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen einen sehr geringen Wasser-Luft-Verteilungskoeffizienten auf. Die Tensidstruktur des Moleküls bewirkt eine Anreicherung an der Phasengrenze oder die Bildung von Mizellen, wobei der unpolare, perfluorierte Rest die Affinität zur hydrophoben Matrix bedingt. Die negative Ladung des Säureanions bewirkt dagegen starke Wechselwirkungen in biologischen Matrices mit Proteinen, aber auch mit positiv geladenen mineralischen Oberflächen von Böden und Sedimenten. Dies äußert sich einerseits in gegenüber den perfluorierten Carbonsäuren erhöhten Sorptionskoeffizienten (PFOA: 0,21; PFOS: 35,1) und damit einer Anreicherung im Bodensediment von Gewässern (Becker et al., 2008a), andererseits aber auch in höheren Biokonzentrationen in Organismen (Martin et al., 2003a; Morikawa et al., 2006).

Die Gesamtproduktion von PFOS wurde von 3M, dem früher wichtigsten Hersteller, für die Jahre 1985 bis 2002 auf 13670 t geschätzt (UNEP, 2006). Die größte Jahresproduktion wird mit 3665 t für das Jahr 2000 angegeben (3M, 2000). Aufgrund ihrer Stabilität und der schmutz-, farb-, fett-, öl- und was-

serabweisenden Eigenschaften fand PFOS Anwendung in einer Vielzahl von Industrie- und Konsumprodukten (RPA, 2004), so beispielsweise in der Oberflächenbehandlung von Textilien, Teppichen, Leder- und Papierwaren, als Tensid in Oberflächenreinigungsmitteln, in Farben und Lacken, in Feuerlöschschäumen, in der Fotoindustrie, speziellen Hydraulikölen, in der Galvanotechnik und in geringem Umfang darüber hinaus auch in Medizinprodukten (OECD, 2005). Im Jahr 2000 kündigte 3M den schrittweisen Ausstieg aus der PFOS-Produktion an (3M, 2000) und vollzog diesen bis Anfang 2003 (UNEP, 2006). Der weltweite Verbrauch hat sich einerseits durch die Substitution durch andere Perfluoralkylverbindungen (z.B. Perfluorbutansulfonat) und andererseits durch den Ersatz durch völlig andere Stoffe stark gewandelt. Dennoch ist von einer Restproduktion auszugehen (UNEP, 2006). Für die Jahre 2000 bis 2004 wird von einer Verminderung der EU-weiten Emissionen von PFOS und PFOS-artigen Verbindungen von 175 t auf ca. 10 t ausgegangen (EU-SCHER, 2004). Mit der Richtlinie 2006/122/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Dezember 2006 wurden das Inverkehrbringen und die Verwendung von PFOS stark reglementiert. Seit dem 27. Juni 2008 darf PFOS aufgrund der Einstufung als PBT-Stoff (Stoff mit den Eigenschaften: persistent, bioakkumulativ und toxisch (UNEP, 2006) nicht mehr in Verkehr gebracht und verwendet werden. Ausnahmen bestehen noch für Spezialanwendungen wie Fototechnik, Galvanotechnik und Hydraulikflüssigkeiten in Luft- und Raumfahrt. PFOS-haltige Feuerlöschschäume dürfen bis 27. Juni 2011 aufgebraucht werden (EU, 2006). Somit wird auch künftig zumindest mit geringen Einträgen in die Umwelt zu rechnen sein. Eine Verlagerung der Produktion von PFOS und verwandten Substanzen von den Industrienationen in andere Länder ist jedoch zu beobachten. So wird z.B. für China eine Produktionssteigerung von 50 t PFOS im Jahr 2003 auf mehr als 200 t im Jahr 2006 angegeben (UNEP, 2008a). Die produzierte Menge ist etwa zur Hälfte für den Export nach Japan, Brasilien und in die EU bestimmt und wird dort in der Medizintechnik, in der Halbleiterindustrie, in Insektiziden und für weitere Spezialanwendungen verbraucht. Da für einige Entwicklungsländer und auch für China von einem eingeschränkten PFOS-Risikomanagement bzw. einem Mangel an dazu notwendigen Methoden zu dessen Überwachung ausgegangen werden muss, empfiehlt die Stockholm Convention einen intensiven Informationsaustausch und Technologietransfer der ehemaligen mit den aktuellen Produktionsländern (UNEP, 2008b).

3.2 Vorkommen und Verhalten in der Umwelt

Perfluorierte Alkylsulfonate sind synthetische Chemikalien (Lehmle, 2005). Eine natürliche Quelle für perfluorierte Verbindungen existiert nicht. Sie gelangen auf direktem Weg z.B. mit Löschschäumen (Moody et al., 2002) oder aber indirekt über kommunale oder industrielle Kläranlagen in die Umwelt (Becker et al., 2008b; Boulanger et al., 2005; Hansen et al., 2002). In Tabelle 1 sind Messdaten zur PFOS-Belastung verschiedener Kläranlagenabläufe zusammengefasst.

Tabelle 1: PFOS-Konzentrationen in Kläranlagenabläufen

PFOS-Konzentrationen (ng/L)	Kläranlage	Referenz
9 – 26 ng/L	5 kommunale Kläranlagen in Bayern	(LFU, 2006)
<100 – 49000 ng/L	37 kommunale Kläranlagen in Bayern	(LFU, 2009)
40 – 23500 ng/L	29 kommunale Kläranlagen in Nordrhein-Westfalen	(LAWA, 2009)
<1,5 – 18,1 ng/L	6 kommunale Kläranlagen in Dänemark	(Bossi et al., 2008)
<1,5 – 1115 ng/L	4 Industriekläranlagen in Dänemark	(Bossi et al., 2008)
12,7 ng/L	5 Kläranlagen in N-Europa (Medianwert)	(Berger et al., 2004)
7,0 – 990 ng/L	1 Kläranlage in USA (Kentucky)	(Loganathan et al., 2007)
3 - 68 ng/L	6 Kläranlagen in USA (New York)	(Sinclair & Kannan, 2006)

Darüber hinaus wird eine Reihe von Vorläufersubstanzen im Zuge der Biotransformation in der Umwelt in PFOS als Endmetabolit umgewandelt. Auf der Basis eines Simulationsmodells zur Berechnung mikrobieller Abbauvorgänge erwiesen sich von 171 perfluorierten Substanzen 46 als potentielle PFOS-Vorläufer (Dimitrov et al., 2004). Eine Anreicherung erfolgt dabei in Kläranlagen durch den mikrobiellen Abbau von Vorläufersubstanzen (z.B. N-Ethyl-Perfluoroctan-Sulfonamidethanol) in PFOS (Rhoads et al., 2008). Verschiedene Untersuchungen belegen einen dadurch bedingten Anstieg der PFOS-Mengen in Kläranlagenabläufen gegenüber deren Zuläufen. In Untersuchungen der Universität Bayreuth fand sich eine Verdreifachung der PFOS-Gehalte im Ablaufwasser gegenüber dem Zulauf (Becker et al., 2008b) sowie eine Anreicherung von PFOS im Klärschlamm (LFU, 2010; Schultz et al., 2006). Somit gelten Kläranlagen als wesentliche Eintragsquelle von PFOS in die Gewässer.

PFOS zeigt gegenüber atmosphärischen und biologischen Abbaumechanismen eine hohe Persistenz (Environment Agency, 2004; US-EPA, 2002). Unter Umweltbedingungen erfolgte weder ein hydrolytischer oder photolytischer noch ein biologischer Abbau (OECD, 2002). Unter Laborbedingungen ermittelte Halbwertszeiten betragen für den Abbau in der Atmosphäre 114 Tage. Für aquatische Systeme wurden experimentell Halbwertszeiten von 41 Jahren bei hydrolytischem Abbau und 3,7 Jahre bei Photolyse ermittelt (RIKZ, 2002). Aufgrund ihrer Persistenz in der Umwelt haben perfluorierte Tenside mittlerweile weltweite Verbreitung gefunden. Derzeit werden zwei Mechanismen der Verteilung und des Transports perfluorierter Tenside diskutiert (Prevedouros et al., 2006): Zum einen vermag die Verfrachtung der Tenside mit den Meeresströmungen die Funde dieser Chemikalien in Atlantik, Pazifik, der Südchinesischen See, der Sulu See der Labrador See bis hin zur Tiefsee zu erklären (Yamashita et al., 2005). Zum anderen werden flüchtige Vorläufersubstanzen (z.B. Sulfonamidethanole) auf dem Luftweg verfrachtet und letztendlich an emissionsfernen Orten zu PFOS metabolisiert (D'Eon et al., 2006; Stock et al., 2007; Young et al., 2007). Aufgrund der chemischen Eigenschaften von PFOS (ge-

ringer Dampfdruck, Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen) verbleiben Emissionen in das Kompartiment Wasser dort und werden mit diesem weltweit verfrachtet (LGL, 2006; RIKZ, 2002). Tabelle 2 vermittelt einen Überblick über PFOS-Konzentrationen in Oberflächengewässern.

Tabelle 2: PFOS-Konzentrationen in Oberflächengewässern

PFOS-Konzentrationen (ng/L)	Gewässer	Referenz
<1 – 39 ng/L	36 Überblicksmessstellen in Bayern	(LFU, 2010)
<2,0 – 192 ng/L	Rhein, Ruhr und Möhne (NRW)	(Skutlarek et al., 2006)
405 ng/L	Möhne	(Skutlarek et al., 2006)
3160 ng/L	Steinbecke (NRW)	(Skutlarek et al., 2006)
0,03 – 7,3 ng/L	Nordsee im Bereich der Elbemündung	(UBA, 2006)
0,01 – 0,09 ng/L	Nordatlantik (Grönland)	
(0,072 – 0,137 ng/L)	Grönland (Schnee)	
0,003 – 0,086 ng/L	Arktis (Schnee)	(Young et al., 2007)
<21,7 ng/L	Nordatlantik (Finnland, Norwegen, Schweden, Faröer Inseln, Island)	(Kallenborn et al., 2004)
16,8 – 54,1 ng/L	Tennessee (USA)	(Hansen et al., 2002)
6 – 121 ng/L	Ontario-See (USA)	(Boulanger et al., 2004)
0,037 – 0,073 ng/L	Mittlerer Atlantik	(Yamashita et al., 2005)
0,0011 – 0,02 ng/L	Zentral-/ Ost-Pazifik	
<2,5 – 59 ng/L	5 marine Probestellen um Japan	(Taniyasu et al., 2003)
0,04 – 730 ng/L	Hong Kong, Südchina, Korea	(So et al., 2004)

3.3 Vorkommen in Organismen

PFOS stellt unter den perfluorierten Verbindungen die vorherrschende Kontaminante in biologischen Proben dar (Giesy & Kannan, 2001b; Martin et al., 2004b; Morikawa et al., 2006). Giesy & Kannan (2001b) berichteten über weltweite Funde von PFOS in Blut- und Leberproben von Wildtieren. Mittlerweile existiert eine Reihe von Übersichtsarbeiten zur Verbreitung von PFOS in Wildtieren, die weltweit Anreicherungen von PFOS insbesondere in aquatischen Nahrungsketten beschreiben (Environment Canada, 2006; Houde et al., 2006b; Kallenborn et al., 2004). Die höchsten Werte wurden in der Regel bei Predatoren an der Spitze der jeweiligen Nahrungsketten gefunden (Bossi et al., 2005a; Bossi et al., 2005b; De Silva & Mabury, 2004; Falandysz et al., 2006; Giesy & Kannan, 2001b; Kannan et al.,

2002a; Kannan et al., 2002b). Auf der Basis einer geschätzten PFOS-Exposition über Tränke- und Nahrungsaufnahme wurde zum Schutz von Wildvögeln (Silbermöwe, Weißkopfschneit, Eisvogel), die sich am Ende aquatischer Nahrungsketten befinden, eine „safe water concentration“ von 0,043 µg/L berechnet (Newsted et al., 2004), zitiert nach (So et al., 2004) und (Nakayama et al., 2007). Eine Zusammenstellung von PFOS-Gehalten in Blut- und Leberproben aquatischer und terrestrischer Wirbeltiere enthält Tabelle 3.

Tabelle 3: Maximalkonzentrationen bzw. Konzentrationsbereiche von PFOS in Blut und Leber von Wirbeltieren

PFOS-Konzentration (µg/L bzw. µg/kg)	Probenmaterial	Tierart	Region	Referenz
<1 µg/kg – 985 µg/kg	Leber	verschd. Fischarten	Bayern	(LFU, 2008)
896 µg/L	Blut	Rotauge	Nordbayern	(LFU, 2008)
4300 µg/kg	Leber	Aal	Nordbayern	(LFU, 2008)
7900 µg/kg	Leber	Fische	Japan	(Taniyasu et al., 2003)
130 – 1100 µg/L	Blut	Robben	Ostsee	(Kannan et al., 2002b)
470 – 178550 µg/kg	Leber	Waldmäuse	Belgien	(Hoff et al., 2004)
11,2 - 9031 µg/kg	Leber	Giebel, Karpfen, Aal	Belgien	(Hoff et al., 2005a)
173 µg/kg	Leber	Königslachs	USA	(Giesy & Kannan, 2001a)
25 – 994 µg/kg	Leber	Fischotter	USA	(Kannan et al., 2002c)
1520 µg/kg	Leber	Delfine	USA	(Kannan et al., 2001)
1400 µg/kg	Leber	Polarfuchs	kanad. Arktis	(Martin et al., 2004a)
>4000 µg/kg	Leber	Polarbär	Grönland	(Martin et al., 2004a)
0,08 – 3,52 µg/L	Blut	See-Elefant	Antarktis	(Tao et al., 2006)

Laborstudien haben gezeigt, dass bei Fischen für die Bioakkumulation sowohl die Aufnahme über die Kiemen aus dem Wasser als auch über die Nahrung von Bedeutung sind (Martin et al., 2003a; Martin et al., 2003b). In Untersuchungen der Nahrungskette des Ontariosees wurde für Namaycush-Saiblinge ein Bioakkumulationsfaktor von 34000 und ein Biomagnifikationsfaktor (Namaycush-Saibling: Zooplankton) von 60 für lineares PFOS ermittelt (Houde et al., 2008). Für verzweigt-kettige PFOS-Isomere lagen die Werte niedriger. Bezüglich des Anreicherungsverhaltens ergaben Rück-

standsanalysen an Dickkopfelritzen nach 21-tägiger PFOS-Exposition die höchste Anreicherung im Blut, gefolgt von Leber und Gonadengewebe (Ankley et al., 2005). Die Biokonzentrationsfaktoren in der Leber lagen bei einer Expositionskonzentration von 0,1 mg/L bei weiblichen Tieren bei 830, bei männlichen Individuen hingegen bei 210. Generell waren die weiblichen Fische höher belastet als die männlichen Tiere. Als Ursache hierfür wurden geschlechtsspezifische Unterschiede in der Elimination von PFOS bei Fischen vermutet. Neben den genannten Organen wurde PFOS auch in Fischeiern gefunden. Hieraus wurde ein aktiver Transfer von PFOS von adulten weiblichen Tieren in die Eier abgeleitet (Sinclair & Taniyasu, 2004). Bei Regenbogenforelle wurde folgende Organverteilung von PFOS ermittelt. Die höchste Belastung wurde im Blut der Tier nachgewiesen, gefolgt von Niere, Leber und Gallenblase. Die niedrigsten PFOS-Konzentrationen fanden sich in Gonadengewebe, Körperfett und Muskulatur (Martin et al., 2003b). Die Biokonzentrationsfaktoren für Blut und Leber wurden mit 4300 bzw. 5400 angegeben. Ein Vergleich von experimentell ermittelten Bioakkumulationsdaten mit Rückstandswerten bei freilebenden Fischpopulationen ergab deutlich niedrigere Konzentrationen bei Fischen aus dem Freiland (Ankley et al., 2005). Im Gegensatz dazu ist nach Becker et al. (2010) bei Fischen aus dem Freiland von einer höheren Anreicherung von PFOS in der Leber auszugehen.

Auch in menschlichen Blutproben stellte PFOS den am häufigsten nachgewiesenen Vertreter perfluorierter Verbindungen dar (Houde et al., 2006b). Messdaten zufolge lagen die PFOS-Gehalte im Blut der allgemeinen Bevölkerung in der Regel eine Größenordnung unter denen von Menschen mit berufsbedingter Exposition (Lau et al., 2007). Darüber hinaus liegen Untersuchungsergebnisse vor, die einen Übergang von PFOS in die Muttermilch (Kärman et al., 2006; Kuklenyik et al., 2004; Suchenwirth et al., 2006), ein Auftreten von PFOS im Nabelschnurblut (Apelberg et al., 2007; Inoue et al., 2004) und damit die Fähigkeit zur Überwindung der Plazentarschranke (Midasch et al., 2007) sowie ein Auftreten in menschlichem Lebergewebe (Olsen et al., 2003b) belegen. Tabelle 4 vermittelt einen Überblick über in Humanblutproben nachgewiesene PFOS-Konzentrationen.

Literaturangaben zufolge wurden als wichtige menschliche Expositionsquelle PFOS-Vorläufersubstanzen (z.B. Perfluorooctansulfonamide), die aus Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen, wie z.B. Nahrungsmittelverpackungen, Teppichböden usw. emittiert werden, angesehen. Diese Verbindungen, die zu PFOS metabolisiert werden können (Tomy et al., 2004; Xu et al., 2004), wurden in erhöhten Konzentrationen in der Raumluft und in Hausstaub gefunden (Fromme et al., 2008; Moriwaki et al., 2003; Shoeib et al., 2008; Strynar & Lindstrom, 2008). Demgegenüber kommt der menschlichen Exposition mit direkt emittiertem PFOS aufgrund der Tatsache, dass die Substanz in nur wenigen kommerziellen Produkten wie z.B. Feuerlöschschäumen Anwendung findet, eine untergeordnete Bedeutung zu (Olsen et al., 2003a). Von anderer Seite wurde die Bedeutung der Aufnahme von PFOS mit Nahrungsmitteln und Trinkwasser hervorgehoben (Fromme et al., 2008; Skutlarek et al., 2006; Tittlemier et al., 2007; Trudel et al., 2008). Eine besondere Rolle spielen dabei regionale Verzehrsgewohnheiten von Verbrauchern. So können beispielsweise Fische aus besonders belasteten Gewässern eine Belastungsquelle für bestimmte Bevölkerungsgruppen darstellen. In einer vom Umweltministerium des Landes Nordrhein-Westfalen (2008) an die Ruhr-Universität Bochum in Auftrag gegebenen Studie wiesen Angler mit regelmäßigem Verzehr belasteter Fische aus dem Mönesees höhere PFOS-

Konzentrationen im Blut auf als die allgemeine Bevölkerung. Falandysz et al. (2006) fand in einer baltischen Bevölkerungsgruppe, die sich von anderen Bevölkerungsgruppen durch eine hohe Verzehrsmenge von regionalem Fisch unterschied, signifikant erhöhte PFOS-Konzentrationen im Blut.

Tabelle 4: PFOS-Konzentrationen in menschlichem Blut

PFOS-Konzentration (in µg/L)	Region	Referenz
Allgemeine Bevölkerung		
6,2 - 131 µg/L	Nordbayern	(Midasch et al., 2006)
2,1 – 55,0 µg/L	Südbayern	(Fromme et al., 2007)
32 – 45,6 µg/L	Deutschland	(OECD, 2002)
16 - 116 µg/L	Polen	(Kannan et al., 2004)
19 - -41 µg/L	Japan	(Taniyasu et al., 2003)
32 - 310 µg/L	China	(Yeung et al., 2006)
12,7 – 29,5 µg/L	Australien	(Kärroman et al., 2006)
<4,3 - 1656 µg/L	USA (6 Städte)	(Olsen et al., 2003a)
Menschen mit beruflich bedingter Exposition:		
40 - 9930 µg/L	Antwerpen/ Niederlande	zitiert in (LGL, 2006)
n.n. - 114100 µg/L	Cottage Grove/ USA	zitiert in (LGL, 2006)
Menschen mit besonderen Expositionen:		
1 – 695 µg/L	Studie an Anglern mit erhöhtem Verzehr von Fisch aus dem Mönnesee (NRW)	(Umweltministerium NRW, 2008)

n.n.: nicht nachweisbar

3.4 Toxikokinetik

Perfluorierte Tenside werden nach oraler Aufnahme nahezu vollständig resorbiert (Lau et al., 2004; OECD, 2002). Nach der Aufnahme in den Organismus erfolgt nicht, wie bei vielen anderen persistenten organischen Schadstoffen, eine Umverteilung in das Fettgewebe, sondern aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften eine Bindung an Proteine (Albumin und andere Proteine) (Jones et al., 2003). Sie akkumulieren in der Leber, den Nieren, der Lunge, aber auch in den Gonaden und im Ge-

hirn und unterliegen keinem endogenen Metabolismus (Vanden Heuvel et al., 1991). Für Ratten wurde eine Rückresorption nach der Exkretion mit dem Gallensaft im Sinne eines enterohepatischen Kreislaufes beschrieben (Johnson et al., 1984). Die Ausscheidung von PFOS erfolgt langsam und beim Säugerorganismus überwiegend renal. Daneben wird eine Ausscheidung über die Faeces beschrieben. Die Halbwertszeiten weichen je nach Spezies und Geschlecht deutlich voneinander ab (Harada et al., 2005). Tabelle 5 vermittelt einen Überblick über die Halbwertszeiten von PFOS bei verschiedenen Spezies und die renale Elimination von PFOS beim Menschen.

Im Vergleich zu Säugetieren wurden bei Fischen relativ kurze Halbwertszeiten beschrieben. Nach einer Studie von Martin et al. (2003b), in der juvenilen Regenbogenforellen für 34 Tage 0,54 µg PFOS/g über die Nahrung verabreicht wurde, lag die Halbwertszeit in der Leber bei 20 Tagen. Gleichzeitig wurde eine äußerst effiziente Absorption von PFOS aus dem aufgenommenen Futter beobachtet und als Indiz für eine enterohepatische Rezirkulation gewertet. Im Blut der Fische, dem am höchsten belasteten Probenmaterial, waren 94 – 99% des PFOS Plasma-assoziiert und nur geringe Menge an zelluläre Blutbestandteile gebunden. Auch in den Kiemen wurde PFOS nachgewiesen, denen somit ebenfalls eine Bedeutung bei der Aufnahme und Abgabe von PFOS zukommt.

Die geschilderten Besonderheiten bezüglich der Aufnahme, der Verteilung, des Metabolismus und der Ausscheidung bedingen die hohen Bioakkumulationsfaktoren, die in aquatischen (Houde et al., 2008) und terrestrischen (Hoff et al., 2004; Houde et al., 2006b) Organismen ermittelt wurden. Darüber hinaus wurde eine Umwandlung von PFOS-Vorläufersubstanzen im Organismus zu PFOS beobachtet. Xu et al. (2004) und Tomy et al. (2004) beschrieben die biotische Bildung von PFOS aus N-Et-FOSE in Lebermikrosomen von Ratten bzw. Regenbogenforellen. Somit stellen Vorläufersubstanzen eine zusätzliche Expositionsquelle für Organismen dar.

Tabelle 5: Halbwertszeiten und renale Clearance von PFOS (nach Pabel et al. (2008))

Spezies	Probenmaterial	Halbwertszeit	renale Clearance	Referenz
Regenbogenforelle	Leber	20 Tage	k.D.*	(Martin et al., 2003b)
Ratte (männlich)	Serum/Plasma	>89 Tage	k.D.*	(Johnson et al., 1979)
Cynomolgus-Affen (weiblich)	Serum/Plasma	110 Tage	k.D.*	(Noker & Gorman, 2003)
Cynomolgus-Affen (männlich)	Serum/Plasma	132 Tage	k.D.*	(Noker & Gorman, 2003)
Mensch (weiblich)	Serum/Plasma	k.D.*	0,019 ml/kgKG/ Tag	(Harada et al., 2005)
Mensch (männlich)	Serum/Plasma	5,4 Jahre	0,012 ml/kgKG/ Tag	(Olsen et al., 2007)/ (Harada et al., 2005)

*k.D.: keine Literaturdaten vorhanden;

3.5 Toxische Wirkungen von PFOS bei Säugetieren

Die an Laborsäugetieren ermittelten Toxizitätsdaten sprechen für eine relativ geringe akute Toxizität von PFOS. So wurde in Versuchen an Ratten eine LD_{50} von 251 mg/kg bestimmt (Dean et al., 1978).

In Untersuchungen zur subchronischen Toxizität bei warmblütigen Wirbeltieren erwies sich die Leber als das Hauptzielorgan für eine toxische Wirkung von PFOS (Seacat et al., 2003). PFOS stellt einen Agonist des Peroxisome Proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α) dar. Der Aktivierung dieses Komplexes kommt eine wesentliche Bedeutung im Zusammenhang mit der Entwicklung lebertoxischer Wirkungen im Sinne von Hypertrophie und Vakuolisierung von Leberzellen sowie der Induktion von Lebertumoren zu (Lau et al., 2007). Die Effekte beruhen dabei auf einer Aktivierung der Expression von Genen, die zu einer Peroxisomen-Proliferation, Veränderungen im Zellzyklus sowie Apoptose führen (Klaunig et al., 2003). Der Tumorgenese liegt kein genotoxischer Effekt zugrunde (Andersen et al., 2008; OECD, 2002), da PFOS nicht in der Lage ist, direkt auf die DNA einzuwirken. Neben den genannten Mechanismen wird zudem ein Tumor-Promotor-Effekt vermutet, der darauf beruht, dass PFOS die Durchlässigkeit der Zellmembranen für Stoffe mit primär genotoxischem Potential erhöht (Jernbro et al., 2007). Die niedrigste Dosis, bei der histopathologische Leberveränderungen bei männlichen Ratten beobachtet wurden, lag bei 0,37 mg/kg KG/Tag nach täglicher oraler Applikation über 14 Wochen (Seacat et al., 2003). Nach einer Studie von Thomford et al. (2002) wurde bei weiblichen Ratten durch PFOS die Entstehung hepatozellulärer Adenome induziert.

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass neben der Leber auch die Schilddrüse und deren hormonelle Regelkreise durch eine PFOS-Exposition beeinflusst werden. So ergab eine Studie an männlichen Ratten ein Auftreten von Schilddrüsenadenomen als Folge einer Einwirkung von PFOS (Thomford, 2002). In anderen, ebenfalls an Ratten durchgeführten Untersuchungen wurde eine Abnahme der Serumspiegel der Schilddrüsenhormone T3 (Trijodthyronin) und T4 (Thyroxin) nachgewiesen, wobei ein eigentlich aufgrund einer Feedback-Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse zu erwartender Anstieg von TSH ausblieb (Lau et al., 2003; Luebker et al., 2005b; Thibodeaux et al., 2003). Als Ursache dafür wurden eine Verdrängung der Schilddrüsenhormone von ihren Transportproteinen (Gutshall et al., 1989) oder eine Veränderung des Schilddrüsenhormonmetabolismus (Martin et al., 2007) genannt. Im Gegensatz zu Ratten zeigten Cynomolgus-Affen nach 26-wöchiger oraler Exposition mit 0,15 mg/kg KG/Tag eine Abnahme von T3 und eine Zunahme von TSH (Thyreoidea stimulierendes Hormon). Diese Veränderungen waren ab einer Konzentration von 0,75 mg/kg KG/Tag von einer Beeinträchtigung der Gewichtszunahme sowie einem Anstieg der Mortalität begleitet (Seacat et al., 2002). Diese somit für PFOS gegebene steile Dosis-Wirkungskurve weist auf eine gesundheitliche Gefährdung insbesondere bei wiederholter Aufnahme hin.

Neben den genannten Veränderungen werden in der Literatur auch PFOS-bedingte reproduktionstoxische Effekte und Entwicklungsstörungen beschrieben. So ergab eine Zwei-Generationenstudie an Ratten bereits bei Elterntieren der F0-Generation ab einer Dosis von 1,6 mg/kg KG/Tag eine deutliche

Verminderung der Zahl lebensfähiger Nachkommen (Luebker et al., 2005a). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass die Sterblichkeit bei den Nachkommen in erster Linie durch die pränatale Exposition im Uterus verursacht wurde (Luebker et al., 2005b). Untersuchungen an Mäusen und Hühnerembryonen lieferten ebenfalls Hinweise darauf, dass eine PFOS-Exposition zu Störungen während der Embryonalentwicklung und dadurch bedingten Missbildungen bzw. verminderten Schlupfraten führen kann (Era et al., 2009) (Molina et al., 2006). Auch bei Menschen belegen Nachweise von PFOS im Nabelschnurblut neugeborener Kinder (Apelberg et al., 2007; Midasch et al., 2007) eine Passagefähigkeit der Plazentarschranke und damit eine PFOS-Exposition Neugeborener bereits im Mutterleib. Nach Untersuchungen von Apelberg et al. (2007) konnte eine negative Korrelation zwischen dem PFOS-Gehalt im mütterlichen Blut und Veränderungen des Geburtsgewichtes und verschiedener Größenparameter Neugeborener festgestellt werden. In einer neueren Studie wurden darüber hinaus Störungen der Fruchtbarkeitsparameter durch PFOS bei Frauen nachgewiesen. Fei et al. (2009) fanden eine positive Korrelation zwischen PFOS-Gehalten im Blut von Frauen und einer verlängerten Dauer bis zum Einsetzen einer Schwangerschaft. Die gemessenen PFOS-Gehalte im Blut dieser Frauen bewegten sich dabei im Bereich der bei der allgemeinen Bevölkerung ohne besondere Exposition ermittelten Werte (Mittelwert der untersuchten Gruppe: 33,7 ng PFOS/ml).

3.6 Toxikologie bei aquatischen Organismen

In Studien zur akuten Toxizität von PFOS konnten deutliche Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeit aquatischer Organismen verschiedener Trophiestufen gegenüber der Substanz festgestellt werden. Eine Übersicht zu akuten Toxizitätsdaten für PFOS findet sich in Tabelle 6A. Die niedrigste $LC_{50}/96h$ für PFOS bei Fischen wurde an Dickkopfritzen (*Pimephales promelas*) ermittelt und liegt bei 4,7 mg PFOS/L (OECD, 2002). An anderer Stelle wurde eine $LC_{50}/96h$ von 9,1 mg/L angegeben (Drottar & Krueger, 2000a). Zudem wurde an Dickkopfritzen eine NOEC in Höhe von 3,3 mg/L etabliert (OECD, 2002). Für Regenbogenforellen wurde eine $LC_{50}/96h$ von 7,8 mg/L angegeben. Bei Wasserflöhen (*Daphnia magna*) liegt die $LC_{50}/48h$ mit 67 mg/L (Robertson, 1986) bzw. 130 mg/L (Boudreau et al., 2003) deutlich höher. Zudem wurde auf der Basis des Parameters Mobilität bei Wasserflöhen eine $EC_{50}/48h$ von 27 mg/L etabliert (OECD, 2002). Kurzzeittests an Grünalgen (*Selenastrum capricornutum*) ergaben für den Endpunkt Zelldichte eine $EC_{50}/96h$ von 71 mg/L; hinsichtlich des Parameters Wachstumsrate lag die $EC_{50}/96h$ bei 126 mg/L (OECD, 2002).

Tabelle 6A: Zusammenfassung akuter Toxizitätsdaten für PFOS bei Süßwasserorganismen

Spezies	Dauer	Endpunkt	Konzentration	Referenz
Dickkopfelritze (<i>Pimephales promelas</i>)	96 h	LC ₅₀ - Mortalität	4,7 mg/L	(OECD, 2002)
Dickkopfelritze (<i>Pimephales promelas</i>)	96 h	LC ₅₀ - Mortalität	9,1 mg/L	(Drottar & Krueger, 2000a)
Dickkopfelritze (<i>Pimephales promelas</i>)	96 h	NOEC	3,3 mg/L	(OECD, 2002)
Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	96 h	LC ₅₀ - Mortalität	7,8 mg/L	(Robertson, 1986)
Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	96 h	LC ₅₀ - Mortalität	9,9 mg/L	(Robertson, 1986)
Wasserfloh (<i>Daphnia magna</i>)	48 h	LC ₅₀ - Mortalität	130 mg/L	(Boudreau et al., 2003)
Wasserfloh (<i>Daphnia magna</i>)	48 h	LC ₅₀ - Mortalität	67 mg/L	(Robertson, 1986)
Wasserfloh (<i>Daphnia magna</i>)	48 h	EC ₅₀ - Mobilität	27 mg/L	(OECD, 2002)
Grünalge (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	96 h	EC ₅₀ - Wachstum	126 mg/L	(OECD, 2002)
Grünalge (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	96 h	EC ₅₀ - Zelldichte	71 mg/L	(OECD, 2002)

LC₅₀: Konzentration, die über einen definierten Zeitraum bei 50 % der Organismen letal wirkt;

EC₅₀: Konzentration, die über einen definierten Zeitraum bei 50 % der Organismen einen bestimmten Effekt bewirkt

NOEC: no observed effect concentration; höchste getestete Konzentration bei der keine Effekte mehr auftreten

Daten zu längerfristigen bzw. chronischen Toxizität von PFOS, die auf der Basis ökotoxikologischer Standardtests erarbeitet wurden, sind in Tabelle 6B zusammengefasst. Für Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*) wurde eine LC₅₀/28d von 7,2 mg/L ermittelt (Oakes et al., 2005). Im Rahmen eines 42-tägigen Early-life-stage Test mit Dickkopfelritzen wurde - basierend auf den Endpunkten Mortalität und Wachstum - eine NOEC von 0,3 mg PFOS/L etabliert (OECD, 2002). Drottar & Krüger (2000b) ermittelten in einem weiteren 47-tägigen Early-life-stage Test eine vergleichbare NOEC von 0,29 mg/L. Die ebenfalls an Dickkopfelritzen nach 5-tägiger Exposition ermittelte NOEC bezüglich einer Beeinflussung der Schlupfrate lag bei 4,6 mg/L (OECD, 2002). Die mit Abstand niedrigste NOEC wurde für Zuckmückenlarven (*Chironomus tentans*) erarbeitet. Diese liegt unter Berücksichtigung des Endpunktes Wachstum nach 20-tägiger PFOS-Exposition bei 21,7 µg/L (MacDonald et al., 2004). Ein Reproduktionstest mit Wasserflöhen (*Daphnia magna*) über 21 Tage ergab eine NOEC von 7 mg PFOS/L (OECD, 2002). Hinsichtlich des Endpunktes Mortalität wurde eine NOEC von 5,3 mg/L ange-

geben (Boudreau et al., 2003). Grünalgen erwiesen sich als relativ unempfindlich gegenüber längerfristigen toxischen Wirkungen von PFOS. Für die Grünalge *Selenastrum capricornutum* wurde nach 14-tägiger Exposition eine NOEC von < 26 mg/L ermittelt (OECD, 2002).

Tabelle 6B: Zusammenfassung chronischer Toxizitätsdaten für PFOS bei Süßwasserorganismen

Spezies	Dauer	Endpunkt	Konzentration	Referenz
Dickkopfelritze (<i>Pimephales promelas</i>)	28d d	LC ₅₀ - Mortalität	7,2 mg/L	Oakes et al. (2005)
Dickkopfelritze (<i>Pimephales promelas</i>)	42 d	NOEC – Mortalität und Wachstum	0,3 mg/L	(OECD, 2002)
Dickkopfelritze (<i>Pimephales promelas</i>)	5 d	NOEC – Schlupfrate	4,6 mg/L	(OECD, 2002)
Dickkopfelritze (<i>Pimephales promelas</i>)	47 d	NOEC – Early life stage	0,29 mg/L	(Drottar & Krueger, 2000b)
Zuckmücke (<i>Chironomus tentans</i>)	20 d	NOEC - Wachstum	21,7 µg/L	(MacDonald et al., 2004)
Wasserfloh (<i>Daphnia magna</i>)	28 d	NOEC - Reproduktion	7 mg/L	(OECD, 2002)
Wasserfloh (<i>Daphnia magna</i>)	21 d	NOEC - Mortalität	5,3 mg/L	(Boudreau et al., 2003)
Grünalge (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	14 d	NOEC - Zelldichte	<26 mg/L	(OECD, 2002)

LC₅₀: Konzentration, die über einen definierten Zeitraum bei 50 % der Organismen letal wirkt;

NOEC: no observed effect concentration; höchste getestete Konzentration bei der keine Effekte mehr auftreten

Neben den genannten klassischen Toxizitätsdaten liegen Untersuchungsergebnisse zu möglichen Auswirkungen von PFOS auf Wachstum, reproduktionsrelevante Parameter, pathologische Organveränderungen sowie endokrine Wirkungen vor.

Nach Oakes et al. (2005) führt PFOS bei zu keiner eindeutigen Beeinträchtigung der somatischen Fitness bei verschiedenen Fischarten. Eine Studie von Ankley et al. (2005) in der adulte Dickkopfelritzen für 21 Tage, deren Nachkommen für 24 Tage PFOS-Konzentrationen von 0,03, 0,1, 0,3 und 1 mg/L ausgesetzt wurden, ergaben eine Verminderung der Eiablage. Bezüglich der Fekundität wurde eine EC₅₀/21d von 0,23 mg PFOS/L ermittelt. Allerdings hatte PFOS keinen konzentrationsabhängigen Effekt auf den Schlupf, das Überleben sowie die Gewichtsentwicklung der Fischbrut (Ankley et al., 2005). Nach Oakes et al. (2005) führte eine PFOS-Exposition von adulten Dickkopfelritzen zu keinen Veränderungen im Hinblick auf die Eiablage. Andere an Zebraabräblingen ermittelte Untersuchungsergebnisse weisen auf eine Beeinflussung der Eireife in Form eines PFOS-bedingten verminderten gonadosomatischen Indexes (GSI) hin. Eine PFOS-Exposition während der Embryo-Larval-Phase führte

zu keiner Verschiebung des Geschlechterverhältnisses bei dieser Fischart (Du et al., 2009).

Lichtmikroskopische Untersuchungen an Dickkopfelritzen ergaben ausschließlich bei adulten weiblichen Individuen histologische Organveränderungen (Ankley et al., 2005). Im Bereich der Ovarien war bei PFOS-exponierten Tieren ein Fehlen postovulatorischer Follikel sowie eine erhöhte Inzidenz präovulatorischer atretischer und später vitellogener Follikel zu beobachten. Dies deutete auf eine Verspätung der Eireife hin und lieferte damit eine Erklärung für die in dieser Studie ebenfalls nachgewiesene verminderte Eiablage. Weiter histopathologische Veränderungen nach PFOS-Exposition beschränkten sich auf eine vermehrte Vakuolisierung von Leberzellen und ein erhöhtes Auftreten von Melanomakrophagen. Generell waren die Fettdepots in der Körperhöhle reduziert. Im Gegensatz dazu führte eine PFOS-Exposition von Zebraablingen nach einer Studie von Du et al. (2009) ausschließlich bei männlichen Tiere zu histologischen Leberveränderungen. Diese bestanden in einer Vakuolisierung von Leberzellen, welche auf eine Akkumulation von Fett zurückgeführt wurde. Die histopathologische Untersuchung des Hodengewebes der Tiere ergab nach 70-tägiger Exposition in 250 µg/L Veränderungen, die im Sinne einer verzögerten Gonadenreife interpretiert wurden.

Wie unter 3.5 für Laborsäugetiere ausgeführt wurde, wird PFOS eine peroxisomen-proliferierende Wirkung und damit eine Bedeutung bei der Entstehung lebertoxischer Effekte zugeschrieben (Lau et al., 2007; Seacat et al., 2003). Für Fische liegen diesbezüglich uneinheitliche Untersuchungsergebnisse vor. Bei Karpfen induzierte die Substanz nach Hoff et al. (2003) nur eine geringe peroxisomale Aktivität. Untersuchungen an Dickkopfelritzen, Regenbogenforellen und anderen Fischarten ergaben hingegen übereinstimmend eine Induktion der Aktivität der FAO (fatty acyl-CoA oxidase) und damit Hinweise auf eine mäßige Zunahme der Peroxisomenproliferation in der Leber. Darüber hinaus wurden in Abhängigkeit von der Fischart, dem Geschlecht und dem untersuchten Gewebe Anzeichen für einen erhöhten oxidativen Stress beobachtet (Oakes et al., 2005).

Des Weiteren liegen für Fische experimentelle Daten zu möglichen endokrinen Wirkungen von PFOS vor. Die nachgewiesenen Effekte betreffen sowohl Regelkreise der Geschlechtshormone als auch der Schilddrüsenhormone.

Nach einer Studie von Oakes et al. (2005) variierten die Blutspiegel von Testosteron, 11-Ketotestosteron sowie 17β-Estradiol nach PFOS-Exposition je nach eingesetzter PFOS-Konzentration und -Dauer, Geschlecht und Fischart sowie innerhalb einer Spezies in Abhängigkeit von Alter bzw. Entwicklungsstadium der Testtiere. Die Untersuchungen, bei denen Dickkopfelritzen PFOS-Konzentrationen von 0,3, 3, 10 und 30 mg/L entweder 28 Tage (adulte Tiere) oder 12 Tage (juvenile Tiere) ausgesetzt wurden, ergaben kein einheitliches Bild. So war bei adulten weiblichen Dickkopfelritzen nach Exposition in 3 mg PFOS/L ein signifikanter Abfall von Testosteron nachweisbar. Bei juvenilen weiblichen Dickkopfelritzen führte die gleiche PFOS-Konzentration zu einem signifikanten Anstieg der Testosteron-Spiegel. Bei männlichen adulten Dickkopfelritzen führten 0,3 mg/L, bei männlichen juvenilen Individuen hingegen erst 3 mg/L zu einem Anstieg der Testosteron-Spiegel. Die Blutspiegel von 11-Ketotestosteron waren bei adulten Fischen beiderlei Geschlechts insbesondere im

niedrigen Konzentrationsbereich von 0,3 mg/L deutlich erhöht. Bei juvenilen Weibchen war ein Anstieg von 11-Ketotestosteron ab 3 mg/L nachweisbar, während bei männlichen Tieren gleichen Alters keine Veränderungen zu beobachten waren. Hinsichtlich der Blutspiegel von 17 β -Estradiol wiesen weibliche adulte Individuen einen Anstieg ab einer PFOS-Konzentration von 0,3 mg/L auf während bei juvenilen Tieren beiderlei Geschlechts erst ab einer Konzentration von 3 mg/L eine Zunahme zu verzeichnen war. Die Vitellogeninspiegel waren bei juvenilen Dickkopflritzen beider Geschlechter nach Exposition in 3 mg/L erhöht. Ebenfalls an adulten Dickkopflritzen durchgeführte Untersuchungen von Ankley et al. (2005) ergaben bei männlichen Individuen nach 21-tägiger Exposition in 0,3 mg PFOS/L erhöhte Konzentrationen von Testosteron und 11-Ketotestosteron im Blut sowie eine verminderte Aromatase-Aktivität im Gehirn. Bei weiblichen Tieren traten keine Veränderungen der Geschlechtshormonspiegel sowie der Aromataseaktivität auf. Die Konzentration von Vitellogenin im Blut wurde bei beiden Geschlechtern nicht beeinflusst. Bei geschlechtsreifen weiblichen Regenbogenforellen, die über einen Zeitraum von 14 Tagen einer PFOS-Konzentration von 1 mg/L ausgesetzt wurden, ergaben sich keine Veränderungen der Blutspiegel von Testosteron, 17 β -Estradiol und Vitellogenin, während 11-Ketotestosteron signifikant vermindert war (Oakes et al., 2005). Untersuchungen an Zebrabärblingen wiesen auf eine erhöhte Vitellogenin-Genexpression in der Leber sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Individuen hin (Du et al., 2009). *In vitro* führte PFOS an primären Leberzellkulturen männlicher Tilapien (*Oreochromis niloticus*) zu einer Induktion von Vitellogenin. Ein in diesem Zusammenhang durchgeführter Estrogenrezeptor-Inhibitionstest lieferte Hinweise für einen Rezeptor-vermittelten estrogenen Effekt (Liu et al., 2007).

Neben einer Beeinflussung der Geschlechtshormone wurden auch Effekte auf den thyreotropen Regelkreis bei Fischen durch PFOS beobachtet. Untersuchungen von Shi et al. (2009) an Embryonen des Zebrabärblings ergaben Veränderungen der Expression bestimmter Gene der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse. So wurde beispielsweise eine Hochregulation der Gentranskription von Dio1 (mikrosomale Typ I Iodothyronin Deiodinase), einem Enzym, welches die Umwandlung von T4 (Thyroxin) zu T3 (Trijodthyronin) katalysiert, beobachtet. Die Analyse von Ganzkörperextrakten der Zebrabärblinge ergaben z.T. eine Zunahme von T3, während die Werte für T4 unverändert blieben. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass PFOS zu einer Störung des Gleichgewichtes der Schilddrüsenhormone führt, ohne dass eine Adaption und Autoregulation über die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse erfolgt. In ebenfalls an Zebrabärblingen durchgeführten Untersuchungen von Du et al. (2009) wurde keine Beeinflussung von T3 beobachtet.

4 Material und Methoden

4.1 Versuch I: Untersuchungen zur toxischen Wirkung von PFOS

4.1.1 Versuchsdurchführung

Um mögliche toxische Wirkungen umweltrelevanter Konzentrationen von PFOS zu erfassen, wurde in Anlehnung an die OECD Guideline 204 (OECD, 1984) ein 28-tägiger Expositionsversuch durchgeführt (Versuchszeitraum: 11.06.-09.07.2007). Als Versuchsfische kamen 1,5 Jahre alte Regenbogenforellen aus dem institutseigenen Bestand zum Einsatz. Die Tiere wiesen ein durchschnittliches Körpergewicht von $196,9 \pm 23,1$ g und eine durchschnittliche Körperlänge von $27,5 \pm 0,94$ cm auf und zeigten bei der Erhebung des allgemeinen Gesundheitszustandes vor Versuchsbeginn keinerlei Krankheitszeichen.

Die Exposition der Fische wurde in kontinuierlich durchströmten 150 l-Aquarien vorgenommen. Dabei wurde für jede untersuchte Konzentration ein Doppelansatz mit je 16 Tieren durchgeführt (Becken A und Becken B). Als Testsubstanz fand das Kaliumsalz der PFOS Verwendung. Die nominalen Expositionskonzentrationen betragen 0,5, 1, 5, 10, 25 und 50 µg PFOS/L. Die Kontrollgruppe wurde in unbehandeltem Quellwasser gehalten. Die Fische wurden jeden zweiten Tag mit handelsüblichem Fertigfutter für Forellen (Biomar EcoLife 3.0) von Hand gefüttert. Die Futtermenge entsprach etwa 1 % des Körpergewichtes. Über eine Lichtanlage wurde ein 12-Stunden-Tag mit zusätzlichen Dämmerungsphasen am Morgen und am Abend simuliert.

Die Aquarien wurden mit Quellwasser, welches vor der Verwendung zum Zweck der Entgasung über eine Kaskade aus Lochblechen geleitet wurde, versorgt. Das Wasser wurde zudem mit Hilfe einer UV-Entkeimungsanlage (Thyssen Wassertechnik GmbH) entkeimt und mit Hilfe eines Aktivkohlefilters von möglichen chemischen Verunreinigungen befreit. Die chemisch-physikalischen Wasserparameter wurden während des gesamten Versuchszeitraumes kontinuierlich überprüft. Die Durchschnittswerte sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Durchschnittliche chemisch-physikalische Parameter des Wielenbacher Quellwassers

Parameter		Parameter	
Temperatur	10,3 °C	Kalium	3,5 mg/L
Elektrische Leitfähigkeit	730 µS/cm	Magnesium	27,2 mg/L
pH-Wert	7,4	Kalzium	105,8 mg/L
Säurekapazität 4.3 (SBV)	6,5 mmol/L	Nitrat	29,1 mg/L
Gesamthärte	21,2 dGH	BSB ₅	0,9 mg/L
Natrium	8,2 mg/L	CSB	6,5 mg/L

Die Exposition erfolgte im Durchflussverfahren. Um die jeweils notwendigen Testkonzentrationen her-

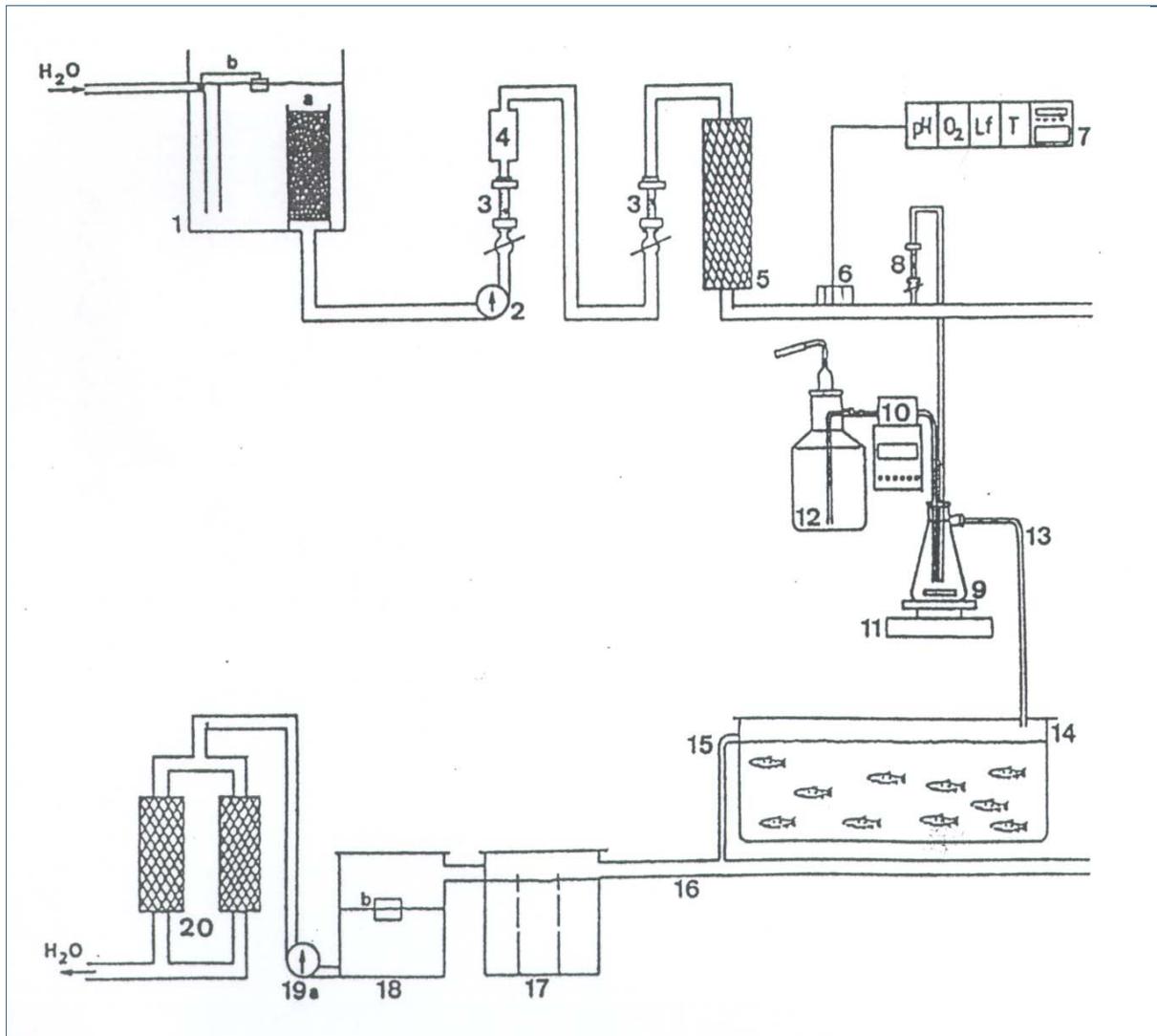
zustellen, wurde zunächst eine Stammlösung angesetzt. Die für jeden Testansatz errechneten Mengen an Stammlösung förderte eine Präzisionsschlauchpumpe in ein Mischgefäß mit Magnetrührer, wo sie mit Quellwasser vermischt und von dort aus in dem gewünschten Mischungsverhältnis in das jeweilige Aquarium gefördert wurde. Der Ablauf aus den Aquarien erfolgte über ein Sammelrohr und über dieses zunächst zur mechanischen Reinigung in ein Klärbecken und von dort aus zur Elimination von PFOS durch einen Aktivkohlefilter. Abbildung zwei stellt schematisch die Wasserführung bei toxikologischen Fischtests im Durchflussverfahren dar.

Die realen Konzentrationen von PFOS in den Testbecken wurden einmal wöchentlich durch das Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung IVV bestimmt. Da für jede Konzentration ein Doppelansatz vorhanden war, wurden die Proben im wöchentlichen Wechsel entweder aus Becken A oder aus Becken B entnommen. Die chromatographische Trennung erfolgte durch Festphasenanreicherung (SPE) auf einer Mercury Trennsäule (Phenomenex) mit Synergi Fusion-RP Packmaterial. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus wässriger Ammoniumacetatlösung und Methanol. Die anschließende Messung erfolgte nach Elektrospray-Ionisierung im negativ-Ionen-Modus mittels massenspektrometrischer Detektion (LC-MS/MS). Als interner Standard wurde ^{13}C -PFOS verwendet. Die Bestimmungsgrenze für PFOS betrug 10 ng/L. In Tabelle 8 sind die Nominal- den Realkonzentrationen von PFOS in den einzelnen Testbecken gegenübergestellt. Abbildung 3 zeigt die Versuchseinrichtungen im fischtoxikologischen Labor des LfU in Wielenbach.

Tabelle 8: Vergleich der Nominal- und Realkonzentrationen in den Testbecken

Nominalkonzentration (in µg/L)							
	Kontrolle	0,5 µg/L	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L
Realkonzentration (in µg/L)							
1. Woche (Becken A)	0,05	0,47	0,93	4,23	8,57	22,53	47,62
2. Woche (Becken B)	0,00	0,43	0,97	4,44	8,48	20,50	47,85
3. Woche (Becken A)	0,00	0,54	1,13	4,56	10,90	25,47	48,79
4. Woche (Becken B)	0,02	0,66	1,13	5,25	9,59	26,65	54,79
Mittelwert	0,02	0,53	1,04	4,62	9,38	23,78	49,76
SD*	0,02	0,09	0,09	0,38	0,98	2,42	2,93
Abweichung in % [#]	0	5,3	3,9	7,6	6,2	4,9	0,5

*SD: Standardabweichung; [#]Abweichung der Real- von der Nominalkonzentration in %



1-7 Wasserführung bis zu den Prüfansätzen:

- 1 Hochbehälter
- a) Ablaufrohr mit Kunststoffgeflechten
- b) Schwimmventil
- 2 Förderpumpe
- 3 Wasserdurchflussmesser mit Kugelventil
- 4 UV-Entkeimungsanlage
- 5 Aktivkohlefilter
- 6 Messkette für O₂, pH, Temperatur und Leitfähigkeit
- 7 Meßstation mit Prozeßschreiber

8-14 Prüfansätze:

- 8 Rotameter mit Kugelventil
- 9 Mischgefäß
- 10 Präzisionsschlauchpumpe
- 11 Magnetrührer
- 12 Stammlösungsbehälter
- 13 PTFE-Zuleitungsschlauch
- 14 Prüfgefäß mit Abdeckung

15-20 Ablauf und Reinigung des Testwassers:

- | | |
|---------------------|---------------------------------|
| 15 Ablaufschlauch | 18 Pumpbecken |
| 16 Sammelrohr | 19a) Förderpumpe |
| 17 Klärbecken | 19b) Schwimmerschaltung für 19a |
| 20 Aktivkohlefilter | |

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wasserführung bei toxikologischen Fischtests im Durchflussverfahren



Abbildung. 3: Testanlage zur Exposition von Regenbogenforellen

4.1.2 Untersuchungsmethoden

4.1.2.1 Hämatologische Untersuchungen

Im Anschluss an die Expositionen wurden jeweils 10 Tiere pro Testgruppe aus den jeweiligen Becken A einer hämatologischen Untersuchung unterzogen. Die Blutentnahme erfolgte unmittelbar nach Betäubung in Ethylenglycolmonophenylether (Konzentration: 1:1000; Merck, Darmstadt) mit heparinisierten Einmalinjektionskanülen und -spritzen durch Punktion der Vena caudalis. Die Hämatokritbestimmung wurde mit heparinisierten Hämatokrit-Kapillaren^R für Hämatokritzentrifugen (75 mm, Außendurchmesser 1,3 – 1,4 mm; Hettich) unter Verwendung einer Hämatokritzentrifuge (Haematokrit 210, Hettich) durchgeführt. Zur Absicherung der Messgenauigkeit erfolgten jeweils Doppelmessungen. Die Bestimmung des Hämoglobingehaltes (Hb) wurde mit Hilfe der standardisierten Hämoglobin-Zyanid-Methode (Dr. Lange Küvettentest LKM 143[®], Dr. Lange, Berlin) durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit einem Dr. Lange Miniphotometer LP2 (Dr. Lange, Berlin) bei 546 nm. Zur Anfertigung von Differentialblutbildern wurden weiße Blutkörperchen anhand von nach *Pappenheim* gefärbten Blutaussstrichen bei 1000facher Vergrößerung differenziert. Zur Ermittlung der Gesamtzahl der Leukozyten und Erythrozyten wurde Blut in spezielle Mischpipetten aufgezogen und mit der Färbelösung nach Natt und Herrick (1952) verdünnt. Die Auszählung erfolgte mikroskopisch bei 250facher Vergrößerung in einer Zählkammer nach *Neubauer* (*Neubauer improved brightline*). Aus den ermittelten Blutwerten wurden folgende Erythrozytenindices berechnet:

- Das mittlere Erythrozytenvolumen, MCV (mean corpuscular volume)
- Der mittlere Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten, MCH (mean corpuscular hemoglobin)
- Die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten, MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration)

4.1.2.2 Klinisch-chemische Untersuchungen

Bei 10 Fischen pro Ansatz (Becken A) wurden klinisch-chemische Analysen durchgeführt. Dafür wurden etwa 1,5 ml Blut in 2 ml Li-Heparinröhrchen (Sarstedt, Nürnberg) überführt und bei 3500 U/min und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert (Kühlzentrifuge 320R, Hettich). Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und zur Aktivitätsmessung der Enzyme Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Alkalische Phosphatase (AP), γ -Glutamat-Transaminase (γ -GT) sowie der Laktat-Dehydrogenase (LDH) verwendet. Zudem wurden die Gehalte an Gesamteiweiß, Harnstoff, Kreatinin, Bilirubin, Triglyzeriden, Cholesterin, Kalzium und Glukose im Plasma bestimmt. Die Analyse der genannten Parameter erfolgte im Nasschemieverfahren (Dr. Lange Küvettentest) durch photometrische Bestimmung (Photometer: Dr. Lange, LP 800).

4.1.2.3 Histopathologische Untersuchungen

Im Anschluss an die Blutprobenentnahme für die unter 4.1.2.1. und 4.1.2.2. beschriebenen Untersuchungen wurden jeweils 10 Tiere pro Gruppe in tiefer Narkose per Genickschnitt getötet. Die Fische wurden nach Eröffnung der Leibeshöhle einer vollständigen Sektion unterzogen. Ernährungszustand sowie auftretende pathologisch-anatomische Organveränderungen der Tiere wurden makroskopisch beurteilt. Im Anschluss daran wurden Gewebeproben von Haut und Muskulatur, Kiemen, Herz, Leber, Milz, Gonaden, Magen-Darmtrakt, Pankreas, Niere und Schwimmblase entnommen und in neutral gepuffertem Formalin (4 %) fixiert, im Autotechnicon weiterverarbeitet und in Paraffin eingebettet. Die angefertigten Schnitte (3 μ m) wurden im Wasserbad gestreckt, auf Objektträger überführt und zur mikroskopischen Beurteilung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (Denk et al., 1989). Die qualitative Beurteilung der histopathologischen Befunde erfolgte lichtmikroskopisch bei 400facher Vergrößerung. Zur semiquantitativen Bewertung wurden die Organveränderungen unter Berücksichtigung der Häufigkeit des Auftretens und des Schweregrades der Veränderung in 4 Schädigungskategorien eingeteilt: Grad 0: keine pathologischen Veränderungen; Grad 1: geringgradige pathologische Veränderungen; Grad 2: mittelgradige pathologische Veränderungen; Grad 3: hochgradige pathologische Veränderungen. Aus der Bewertung der pathologischen Einzelbefunde pro Tier und Organ wurde ein Gesamtschädigungsgrad pro Organ und Versuchsgruppe berechnet. Nicht primär als pathologisch einzustufende

Beobachtungen wie z.B. die Menge des Speicherstoffes Glykogen in der Leber oder die Dichte von Melanomakrophagen im Nierengewebe wurden ebenfalls semiquantitativ bewertet. In Anlehnung an die Vorgehensweise für pathologische Befunde wurde folgende Einstufung vorgenommen: Grad 1: kein Glykogen (bzw. Melanomakrophagen); Grad 2: gering- bis mittelgradige Glykogenspeicherung (bzw. Melanomakrophagen); Grad 3: hochgradige Glykogenspeicherung (bzw. Melanomakrophagen). An ausgewählten Schnittpräparaten der Leber wurde der Nachweis des Speicherstoffes Glykogen anhand der Karminfärbung nach *Best* bestätigt (Denk et al., 1989).

Im Rahmen der hämatologischen (4.1.2.1) und klinisch-chemischen (4.1.2.2) Untersuchungen wurde das histologisch ermittelte Geschlecht der Versuchs- und Kontrolltiere berücksichtigt.

4.1.2.4 Rückstandsanalysen

Zur Untersuchung auf PFOS-Rückstände wurden von den jeweils verbliebenen 6 Regenbogenforellen aus den verschiedenen Testgruppen (Becken A) Proben von Blut, Leber, Niere, Kiemen und Muskulatur entnommen, in Aluminiumfolie verpackt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die Untersuchungen wurden am Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung IVV durchgeführt. Nach der Probenaufbereitung und Zugabe des internen Standards (¹³C-PFOS) erfolgte die chromatographische Trennung durch Festphasenanreicherung (SPE) auf einer Mercury Trennsäule (Phenomenex) mit Synergi Fusion-RP Packmaterial. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus wässriger Ammoniumacetatlösung und Methanol. Die anschließende Messung erfolgte nach Elektrospray-Ionisierung im negativ-Ionen-Modus mittels massenspektrometrischer Detektion (LC-MS/MS). Eine detaillierte Beschreibung der Methodik findet sich in Gruber et al. (2007). In gleicher Weise wurde eine Probe der verwendeten Futtermittelcharge auf einen möglichen Gehalt an PFOS untersucht.

4.1.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse aller Versuchsansätze erfolgte mit Hilfe der SPSS Software (Version 15.0). Für die hämatologischen, klinisch-chemischen, semiquantitativen histopathologischen und rückstandsanalytischen Daten wurde zunächst eine explorative Datenanalyse durchgeführt und die Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilk-Tests geprüft. Im Falle einer Normalverteilung der Werte und einer Homogenität der Varianzen wurde zur Überprüfung möglicher Unterschiede zwischen den Gruppen die ANOVA Varianzanalyse, gefolgt vom Dunnett-T-Test, herangezogen. Lag keine Normalverteilung der Werte vor oder waren sie inhomogen wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test sowie der Mann-Whitney U-Test durchgeführt.

4.2 Versuch II: Untersuchungen zur endokrinen Wirkung von PFOS

4.2.1 Versuchsdurchführung

Um mögliche endokrine Wirkungen umweltrelevanter Konzentrationen von PFOS zu erfassen, wurde in Anlehnung an die OECD Guideline 204 (OECD, 1984) ein 28-tägiger Expositionsversuch durchgeführt (Versuchszeitraum: 02.06.- 30.06.2009). Als Versuchsfische kamen 1,5 Jahre alte Regenbogenforellen aus dem institutseigenen Bestand zum Einsatz. Die Tiere wiesen ein durchschnittliches Körpergewicht von $204,7 \pm 23,1$ g und eine durchschnittliche Körperlänge von $28,7 \pm 1$ cm auf und wiesen zu Versuchsbeginn keinerlei Krankheitsanzeichen auf.

Die Exposition der Fische erfolgte unter identischen Versuchsbedingungen wie unter 4.1.1 beschrieben. Als Testsubstanz wurde wiederum das Kaliumsalz von POS eingesetzt. Die realen Konzentrationen von PFOS in den Testaquarien wurden einmal wöchentlich hausintern durch Ref. 75, LfU, bestimmt. Die Bestimmung von PFOS erfolgte entweder direkt aus der mit Methanol im Verhältnis 1:1 verdünnten Probe oder bei Bedarf nach Festphasenextraktion an einem schwachen Anionenaustauscher-Material (OasisWAX, Fa. Waters). Die hochdruckflüssigchromatographische Trennung erfolgte mit der Trennsäule Synergi Polar-RP 80A (4µm Korngröße, 150 x 2,0 mm, Fa. Phenomenex). Als mobile Phase diente ein Gradientengemisch zweier Eluenten (Eluent A: 95% Methanol/5% Wasser/0,05% Ameisensäure - Eluent B: 95% Wasser/5% Methanol/0,05% Ameisensäure). Die Messung erfolgte an einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit negativer Elektrospray-Ionisierung (TSQ Quantum, Fa. ThermoFisher Scientific). Die Bestimmungsgrenze für PFOS lag bei Messung der 1:1 verdünnten Probe bei 2 µg/l, nach Festphasenanreicherung bei 10 ng/l. In Tabelle 8 sind die Nominal- und Realkonzentrationen von PFOS in den einzelnen Testbecken gegenübergestellt.

Tabelle 8: Vergleich der Nominal- und Realkonzentrationen in den Testbecken

Nominalkonzentration (in µg/L)							
	Kontrolle	0,5 µg/L	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L
Realkonzentration (in µg/L)							
1. Woche (Becken A)	n.n.	0,33	0,73	4,90	7,80	22,00	43,00
2. Woche (Becken B)	n.n.	0,19	0,75	8,00	15,00	20,00	41,00
3. Woche (Becken A)	n.n.	0,18	0,35	2,60	4,60	19,00	42,00
4. Woche (Becken B)	n.n.	0,15	0,33	3,60	6,20	17,00	36,00
Mittelwert	n.n.	0,21	0,54	4,78	8,40	19,50	40,50
SD*		0,07	0,20	2,03	3,97	1,80	2,69
Abweichung in % [#]		57,50	46,00	4,50	16,00	22,00	19,00

*SD: Standardabweichung; [#]Abweichung der Real- von der Nominalkonzentration in %

4.2.2 Untersuchungsmethoden

4.2.2.1 Histologische Geschlechtsbestimmung und Untersuchungen zum gonadalen Reifegrad

Alle insgesamt 32 Fische der Becken A und B jeder Testgruppe wurden nach der Blutentnahme für die unter 4.2.2.2 beschriebenen Hormonbestimmungen sowie die Vitellogeninanalysen in tiefer Narkose per Genickstich getötet. Vor der Sektion wurden Körperlänge und -gewicht sowie der Ernährungszustand der Tiere bestimmt. Aufgrund der Tatsache, dass Sexualhormonspiegel und Vitellogeninwerte je nach Geschlecht und Entwicklungsgrad deutlich variieren, war zur Interpretation der Analysenwerte eine eindeutige Geschlechtszuordnung unverzichtbar. Nur so war es möglich, zwischen physiologisch bedingten und PFOS-induzierten Untersuchungsbefunden zu unterscheiden. Da eine ausschließlich makroskopische Geschlechtsbestimmung fehlerbehaftet sein kann, wurde eine histologische Geschlechtsbestimmung durchgeführt. Hierzu wurde Gonadengewebe entnommen und in neutral gepuffertem Formalin (4 %) fixiert. Nach histotechnischer Aufarbeitung (siehe 4.1.2.3) wurden die von Gonadengewebe angefertigten Schnitte zur mikroskopischen Beurteilung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Neben der Bestimmung des Geschlechts wurde eine Einstufung des Reifegrades in Anlehnung an einen Richtlinienentwurf der OECD (Johnson et al., 2009) vorgenommen. Die Bewertungskriterien wurden, angepasst an die Morphologie von Eierstock bzw. Hoden bei Regenbogenforellen, entsprechend modifiziert. In den Tabellen 9 und 10 sind die morphologischen Bewertungskriterien für Gonadengewebe von männlichen bzw. weiblichen Tiere aufgeführt.

Tabelle 9: Morphologische Kriterien zur Beurteilung des gonadalen Reifegrades bei weiblichen Regenbogenforellen, modifiziert nach OECD (Johnson et al., 2009)

Reifestadiums	Bewertungskriterien
0	juvenil, ausschließlich Oogonien
1	unreife Gonaden, Oogonien bis perinukleäre Oozyten (kein kortikal aveoläres Stadium)
2	frühes Entwicklungsstadium, mehrheitlich (> 90%) previtellogene Follikel (v.a. Oozyten im perinukleären bis kortikal alveolären Stadium)
3	mittleres Entwicklungsstadium, mindestens 50% frühe bis mittlere vitellogene Follikel
4	spätes Entwicklungsstadium, mehrheitlich späte vitellogene Follikel
5	spätes Entwicklungsstadium, mehrheitlich späte vitellogene sowie laichreife Follikel (größer als in Stadium 4)
6	postovulatorische Ovarien

Tabelle 10: Morphologische Kriterien zur Beurteilung des gonadalen Reifegrades bei männlichen Regenbogenforellen, modifiziert nach OECD (Johnson et al., 2009)

Reifestadium	Bewertungskriterien
0	juvenil, ausschließlich Spermatogonien
1	unreif, Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden (keine Spermien)
2	frühe spermatogene Phase, überwiegend unreif, jedoch einige Spermien vorhanden
3	mittlere spermatogene Phase, Spermatozyten, Spermatiden und Spermien in etwa in gleichen Verhältnissen vorhanden
4	späte spermatogene Phase, alle Stadien können vorhanden sein, jedoch überwiegend reife Spermien
5	postspermatogene Phase, lockeres Bindegewebe mit wenigen verbleibenden Spermien

4.2.2.2 Analyse von Sexualhormonen, Vitellogenin und Schilddrüsenhormonen

Von insgesamt 32 Fischen der Becken A und B jeder Testgruppe wurden Blutproben von 2,5 – 3 ml für den Nachweis von Sexualhormonen, Schilddrüsenhormonen und Vitellogenin entnommen. Die Plasmagewinnung erfolgte wie unter 4.1.2.2 bereits beschrieben. Das Plasma wurde auf sieben Cryogefäße (Brand) verteilt, auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Bei allen weiblichen und männlichen Fischen jeder Testgruppe erfolgte eine Bestimmung von 17 β -Estradiol, Testosteron, 11-keto-Testosteron, T3 (Trijodthyronin), T4 (Thyroxin), TSH (Thyreoida stimulierendes Hormon) sowie Vitellogenin im Plasma. Die Analysen der genannten Parameter in den Plasmaproben wurden als Triplikate durchgeführt. Die Proben wurden vor der Untersuchung auf Eis aufgetaut, um Verluste durch thermische Einflüsse zu vermeiden. Da globuläre Proteine eine hohe Affinität zu Steroiden haben, wurden diese durch Proteinfällung mittels Diethylether bzw. Ethylacetat/Hexan-Gemisch entfernt. Die steroidhaltige Diethylether- bzw. Ethylacetat/Hexan-Phase wurde in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf Hamburg) bei 30°C getrocknet und der Rückstand zur weiteren Verwendung in ELISA-Puffer gelöst. Zur Analyse von 17 β -Estradiol, Testosteron, 11-keto-Testosteron, T3 und T4 kamen kompetitive ELISA-Tests, die als Fertigtestsets kommerziell erhältlich sind, zur Anwendung (Estradiol EIA Kit, Katalog-Nr.: 582251.1 (Solid Plate), Cayman Chemical; Testosterone EIA Kit; Katalog-Nr. 582701.1 (Solid Plate), Cayman Chemical; 11-keto Testosteron EIA Kit Katalog-Nr. 582751.1 (Solid Plate), Cayman Chemical; T3 EIA Kit, Katalog-Nr. RE55251, IBL GmbH; T4 EIA Kit, Katalog-Nr. RE55261, IBL GmbH). Aus den ermittelten Estradiol- und Testosteronwerten wurde für jeden Einzelfisch der Hormonquotient berechnet. Die Analyse der Vitellogenin- und TSH-Gehalte erfolgte mittels Sandwich-ELISA. Zur Verwendung kamen kommerziel-

le Fertigtests (Rainbow trout Vitellogenin ELISA Kit, Biosense, Prod. Nr.: V0 1004402; TSH EIA Kit, Katalog-Nr. RE55111, IBL GmbH). Die photometrische Bestimmung von Vitellogenin bzw. den Steroidhormonen erfolgte an einem Mikrotiterplattenlesegerät (Sunrise, TECAN Deutschland, Crailsheim) bei 405 nm. Die photometrische Messung der Schilddrüsenhormone wurde bei 450 nm durchgeführt.

4.2.2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse aus den Hormonbestimmungen bzw. dem Vitellogeninnachweis erfolgte mit Hilfe der SPSS Software (Version 15.0) wie unter 4.1.3 beschrieben. Zur Ermittlung möglicher Zusammenhänge zwischen der Höhe der Hormon- bzw. Vitellogeninspiegel im Blut und dem gonadalen Reifegrad wurde eine bivariate Korrelationsberechnung nach Spearman durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Versuch I: Untersuchungsergebnisse zur toxischen Wirkung von PFOS

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse der hämatologischen (5.1.1) und klinisch-chemischen (5.1.2) Untersuchungen wurden nach Geschlechtern differenziert ausgewertet.

In Tabelle 11 ist die Anzahl männlicher und weiblicher Tiere in den verschiedenen Versuchsgruppen sowie innerhalb des Kontrollkollektives wiedergegeben.

Tabelle 11: Ergebnisse der histologischen Geschlechtsbestimmung, absolute Anzahl männlicher und weiblicher Fische

Befunde	Kontrolle	0,5 µg/L	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L
Gesamtanzahl n	10	10	9	10	10	10	10
Anzahl ♂	5	6	5	7	6	8	6
Anzahl ♀	5	4	4	3	4	2	4

5.1.1 Hämatologische Untersuchungsergebnisse

Die hämatologischen Untersuchungen ließen ausschließlich bei PFOS-exponierten weiblichen Tieren Veränderungen gegenüber Kontrolltieren erkennen. So war nach Exposition in 50 µg/L ein Anstieg der Gesamterthrozytenzahl nachweisbar (Abbildung 4). Die Parameter Hämoglobingehalt, Hämatokrit, Gesamtleukozytenzahl sowie das weiße Differentialblutbild wurden durch eine PFOS-Exposition nicht beeinflusst (Abbildungen 5, 6, 7 und 8). Die Berechnung der Erythrozytenindices MCH und MCV ergab bei weiblichen Tieren nach Exposition in 50 µg PFOS/L eine signifikante Abnahme gegenüber Kontrollfischen (Tabelle 12), während MCHC unverändert blieb. Bei männlichen Fischen traten nach PFOS-Exposition keine hämatologischen Veränderungen auf.

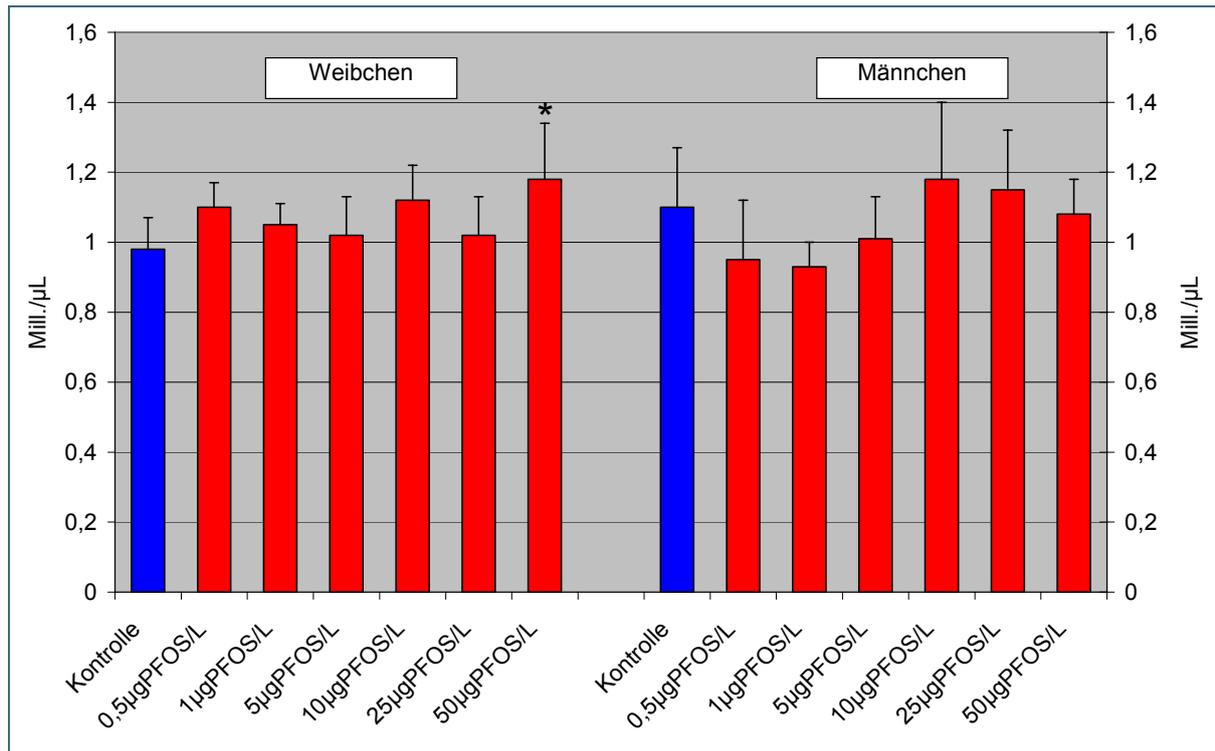


Abbildung 4: Gesamterzythroztenzahl bei Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; *p<0,05

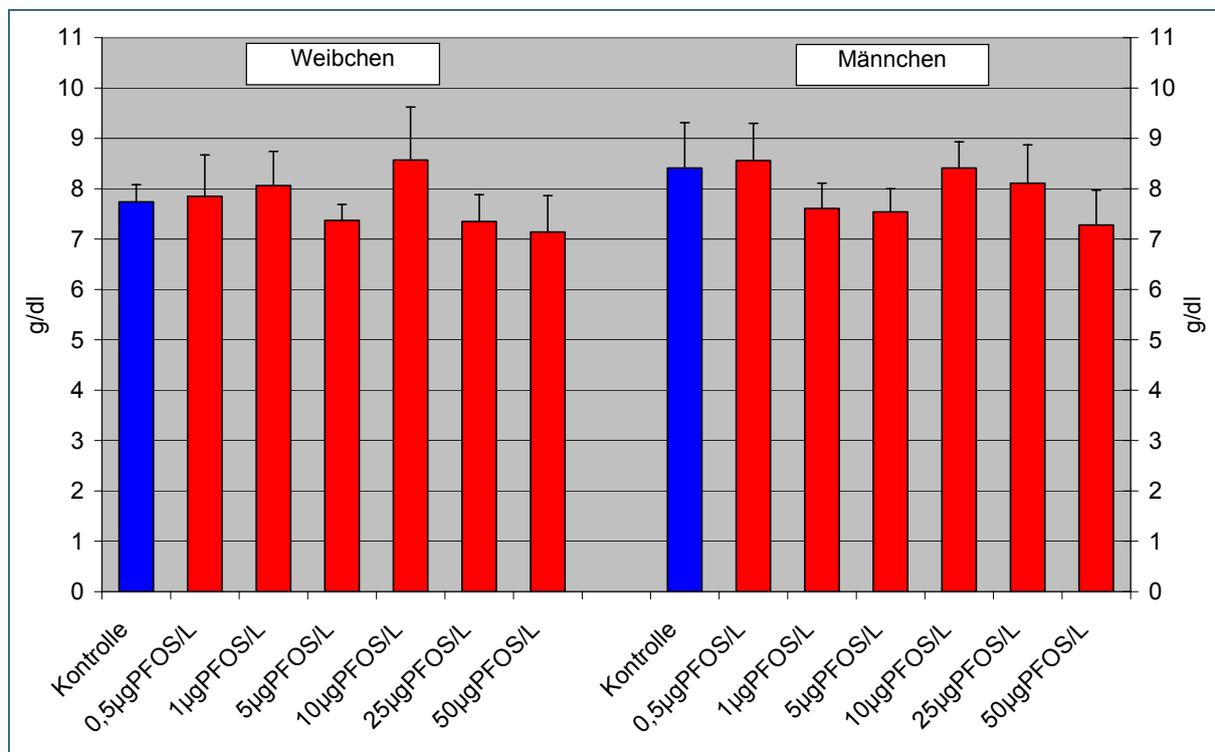


Abbildung 5: Hämoglobingehalt bei Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung)

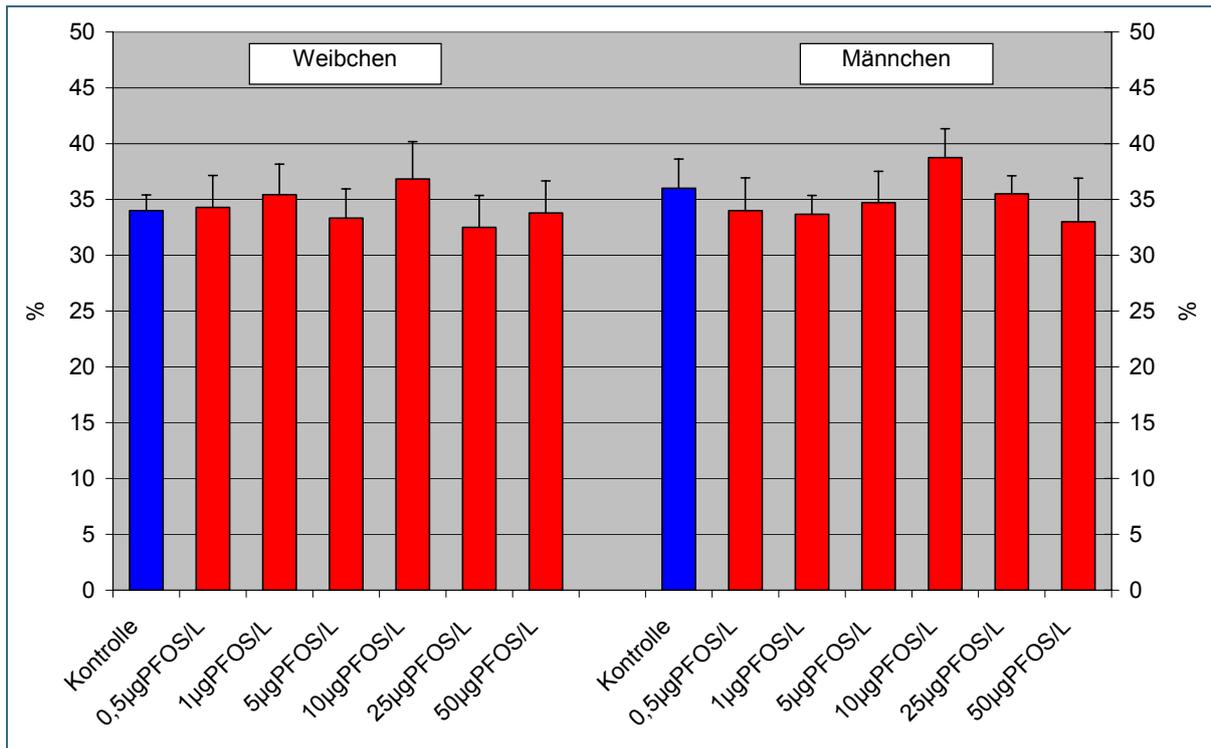


Abbildung 6: Hämatokrit bei Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

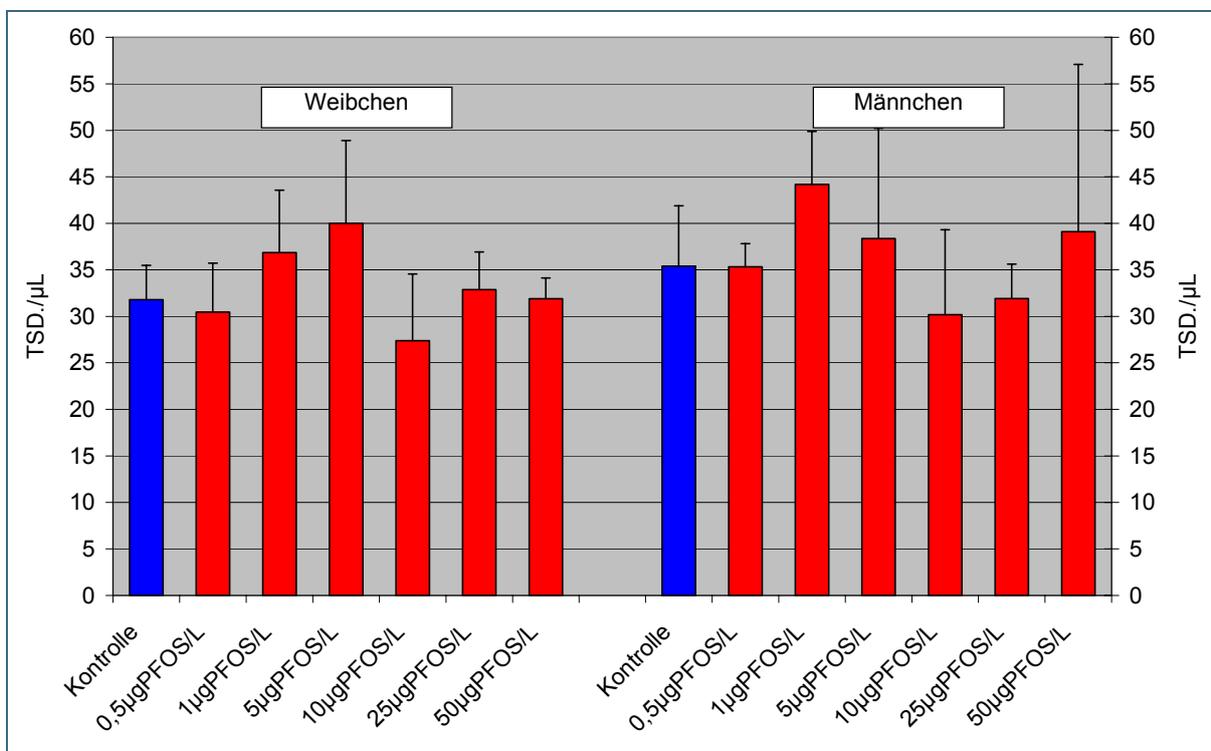


Abbildung 7: Gesamtleukozytenzahl bei Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

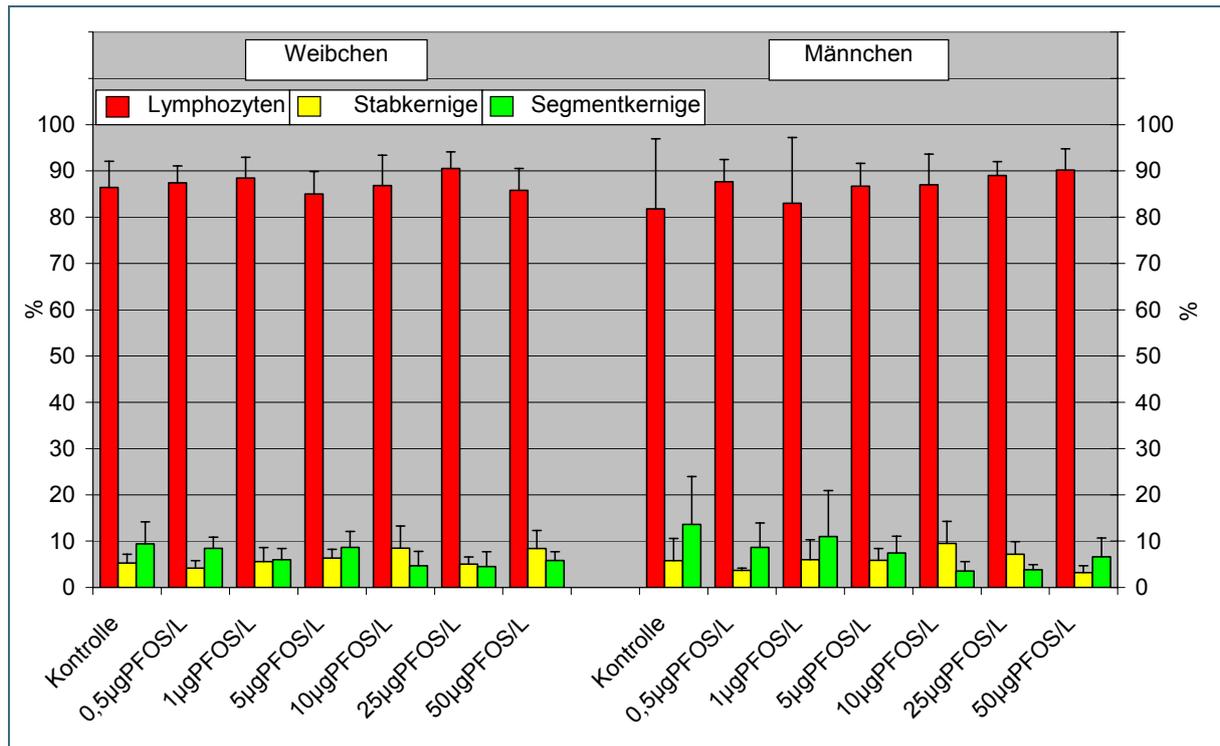


Abbildung 8: Weißes Differentialblutbild (Anteil von Lymphozyten, stabkernigen und segmentkernigen Granulozyten in %) bei Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung)

Tabelle 12: Erythrozytenindices bei Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS

Testgruppe	MCHC (g/ dl)		MCH (pg)		MCV (µm ³)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Kontrolle	23,4 ± 2,1	22,8 ± 0,6	77,8 ± 12,1	79,8 ± 7,6	333,8 ± 49,2	350,8 ± 36,5
0,5 µg/L	25,2 ± 0,2	22,9 ± 1,6	92 ± 11,5	71,5 ± 6,9	365,2 ± 43,3	311,7 ± 18,5
1 µg/L	22,6 ± 0,3	22,8 ± 1,5	82,3 ± 2,7	76,9 ± 9,1	364,3 ± 14,4	337,1x ± 29,8
5 µg/L	21,8 ± 0,8	22,2 ± 0,8	75,6 ± 8,3	72,9 ± 6,5	347,9 ± 43,1	329,3 ± 31,1
10 µg/L	21,8 ± 1,8	23,3 ± 2,2	73,4 ± 10,8	76,9 ± 9,1	342,4x ± 70,9	331,6 ± 37,7
25 µg/L	22,9 ± 1,8	22,7 ± 1,4	71,9 ± 9,1	72,8 ± 4,8	315,4 ± 37,4	321,3 ± 17,9
50 µg/L	22,1 ± 0,9	21,2 ± 2,4	67,4 ± 2,9	61,8* ± 11,7	305,6 ± 22,5	289,3* ± 24,6

MCHC: mittlere Hämoglobinkonzentration der Einzelerythrozyten (mean corpuscular hemoglobin concentration); MCH/Färbekoeffizient Hb_E: mittlerer absoluter Hämoglobingehalt eines Erythrozyten (mean corpuscular hemoglobin); MCV: mittleres Erythrozyteneinzolvolumen (mean corpuscular volume); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; *p < 0,05

5.1.2 Klinisch-chemische Untersuchungsergebnisse

Die Bestimmung der Plasmaenzyme γ -Glutamat-Transaminase (γ -GT), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Alkalische Phosphatase (AP), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) sowie Laktat-Dehydrogenase (LDH) ergab für die einzelnen Enzyme unterschiedliche Reaktionsmuster. Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Versuchstieren wurde nach Exposition in 5, 10 und 50 μg PFOS/L eine signifikante Zunahme der Aktivität der γ -GT im Plasma festgestellt (Abbildung 9). Hingegen war die Enzymaktivität der GOT ausschließlich bei weiblichen Fischen nach Exposition in 5, 10 und 50 μg PFOS/L signifikant vermindert (Abbildung 10). Hinsichtlich der Aktivität der AP wurde nur bei weiblichen Tieren der 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ -Gruppe eine Abnahme gegenüber Kontrollwerten ermittelt (Abbildung 11). Die Werte für GPT waren bei beiden Geschlechtern nach Exposition in 50 μg PFOS/L signifikant vermindert (Abbildung 12). Die Bestimmung der Enzymaktivität der LDH ergab weder bei weiblichen noch bei männlichen PFOS-exponierten Tieren Unterschiede zum Kontrollkollektiv (Abbildung 13).

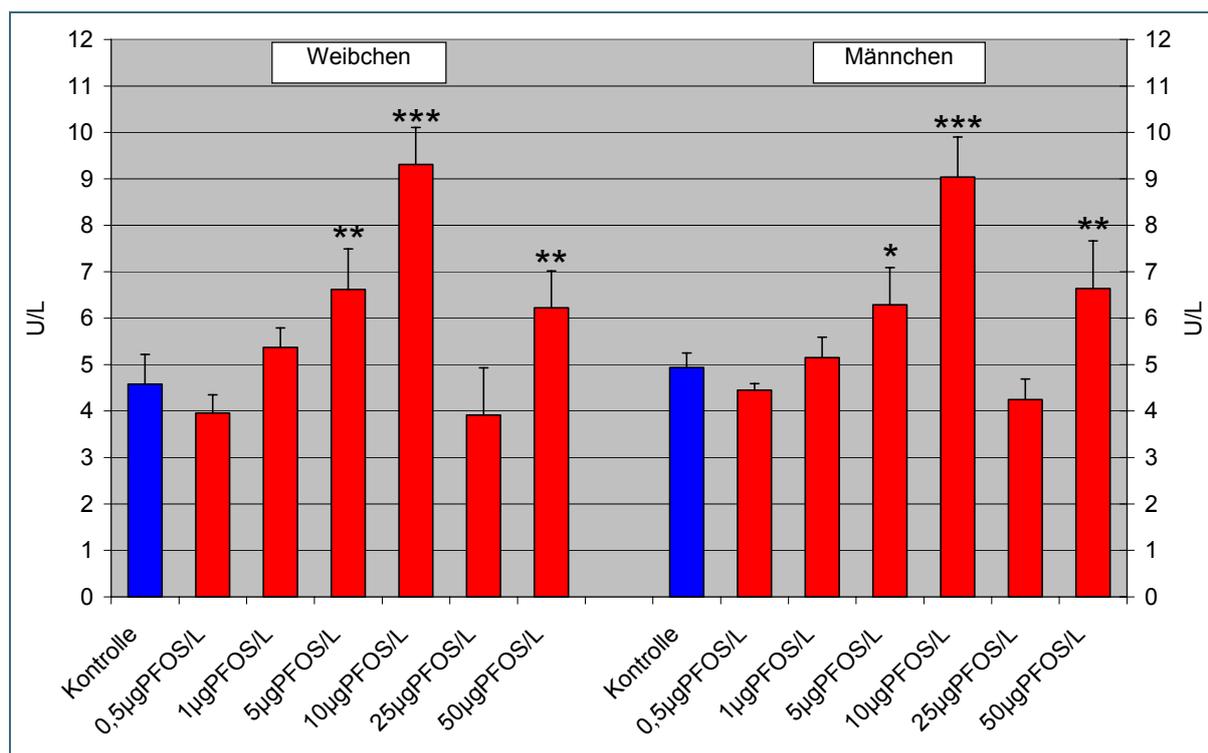


Abbildung 9: Enzymaktivität der γ -GT im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 μg PFOS/L; * $p > 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p < 0,001$

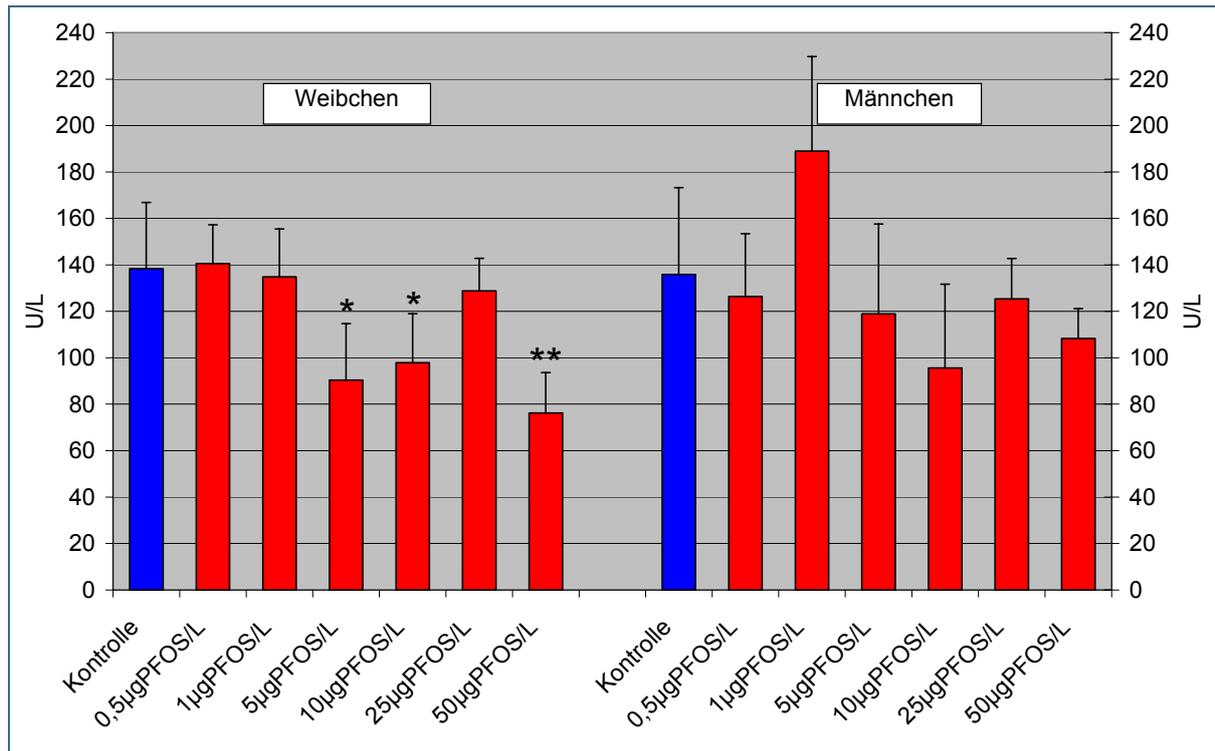


Abbildung 10: Enzymaktivität der GOT im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; *p<0,05, **p<0,01

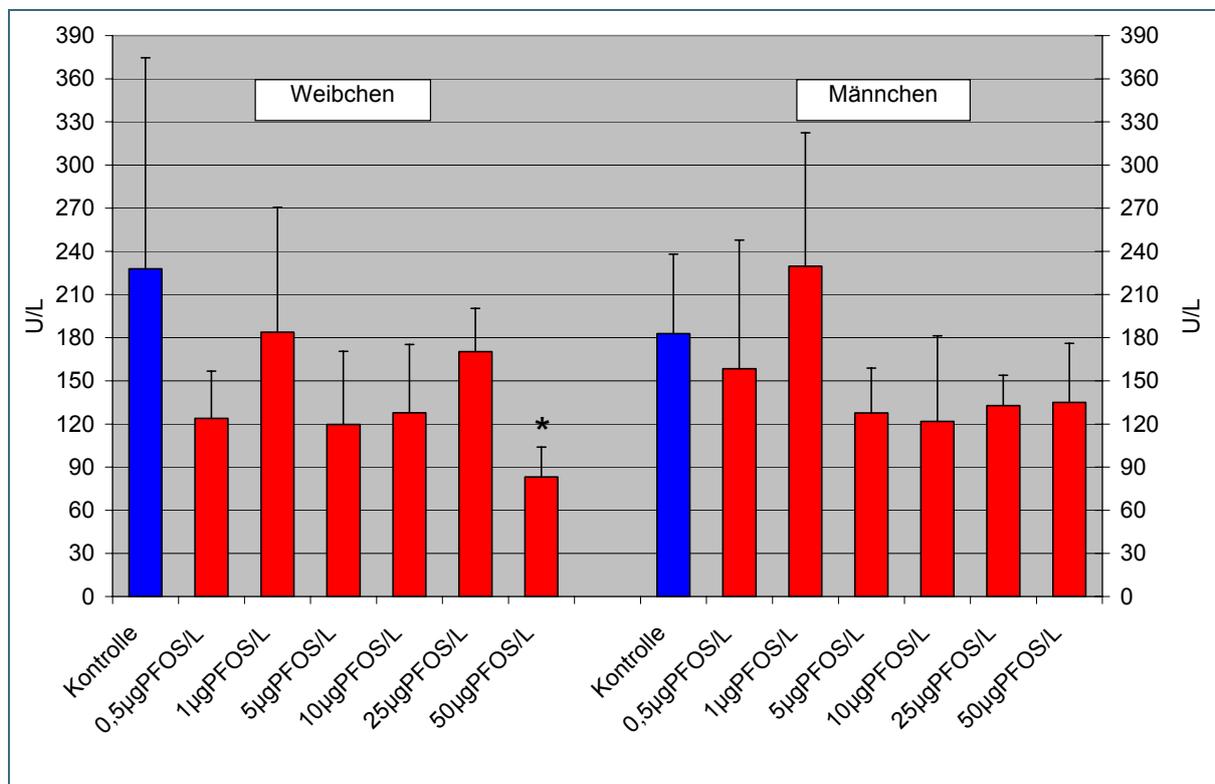


Abbildung 11: Enzymaktivität der AP im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; *p<0,05

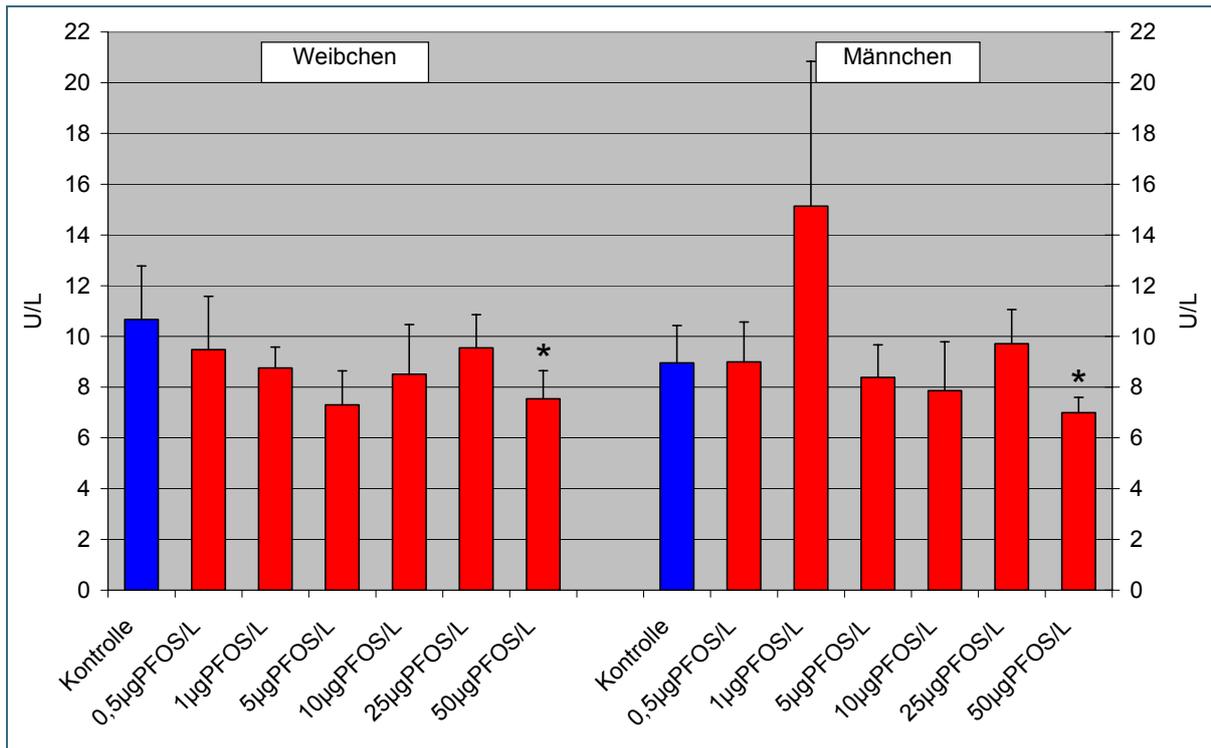


Abbildung 12: Enzymaktivität der GPT im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 μ g PFOS/L; * $p < 0,05$

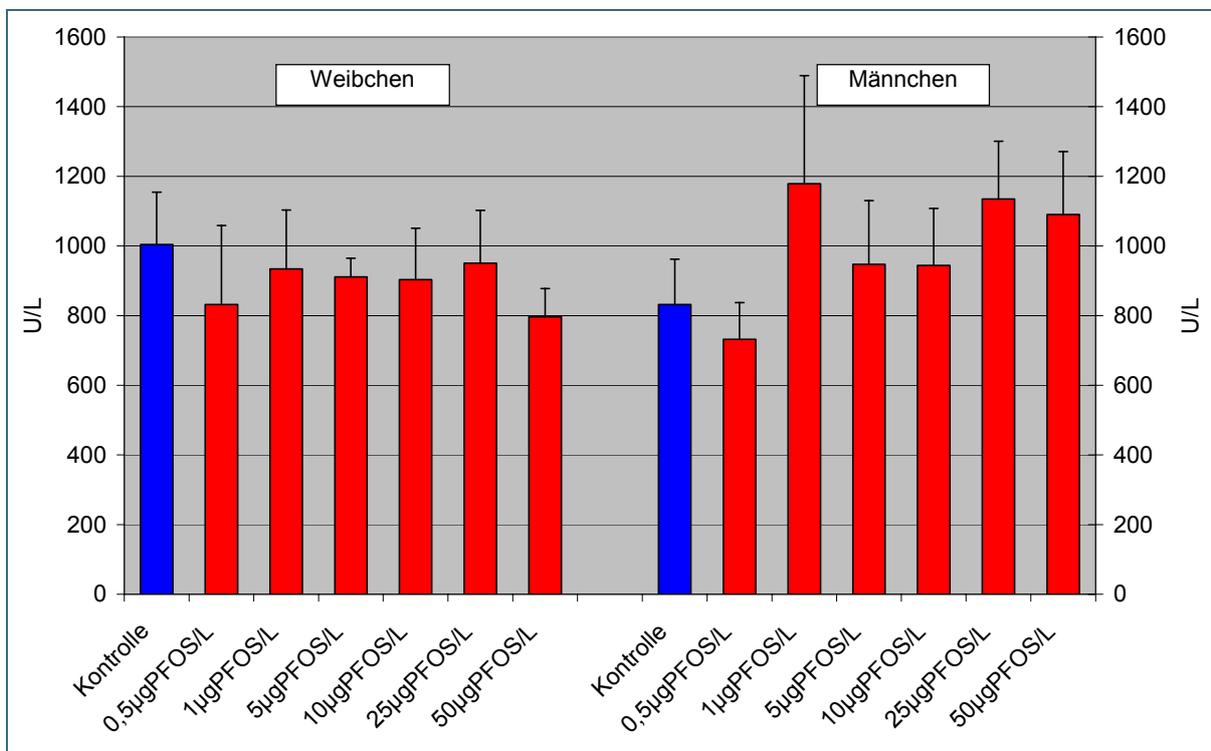


Abbildung 13: Enzymaktivität der LDH im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

Der Glukosegehalt im Blut war ausschließlich bei weiblichen Fischen ab einer Exposition in 0,5 µg PFOS/L signifikant vermindert (Abbildung 14). Eine Ausnahme bildeten die Tiere der 5 µg/L-Gruppe, bei denen die Glukosewerte keine statistisch gesicherten Abweichungen von den Kontrollwerten aufwiesen. Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes ergab nach Exposition in 1 und 25 µg PFOS/L bei Fischen beiderlei Geschlechts, bei männlichen Individuen darüber hinaus auch nach Exposition in 50 µg/L eine signifikante Erhöhung gegenüber Kontrolltieren (Abbildung 15). Der Kreatiningehalt war nur bei männlichen Fischen nach Exposition in 5 µg/L erhöht (Abbildung 16). Eine signifikante Abnahme des Harnstoffgehaltes im Blut ab einer Expositionskonzentration von 0,5 µg/L wurde ausschließlich bei weiblichen Fischen beobachtet (Abbildung 17). Der Gehalt an Triglyzeriden war bei weiblichen Tieren, die 5 bzw. 50 µg PFOS/L ausgesetzt waren, deutlich reduziert, während männliche Fische diesbezüglich keine Abweichungen von den Kontrollwerten aufwiesen (Abbildung 18). Hinsichtlich der Cholesterin- und Bilirubinwerte wurden weder für männliche noch für weibliche PFOS-exponierte Fische Unterschiede zu den Kontrollindividuen ermittelt (Abbildung 19 und 20). Die Kalziumspiegel im Blut waren ausschließlich bei weiblichen Fischen nach Exposition in 0,5, 1, 10 und 50 µg PFOS/L erhöht (Abbildung 21).

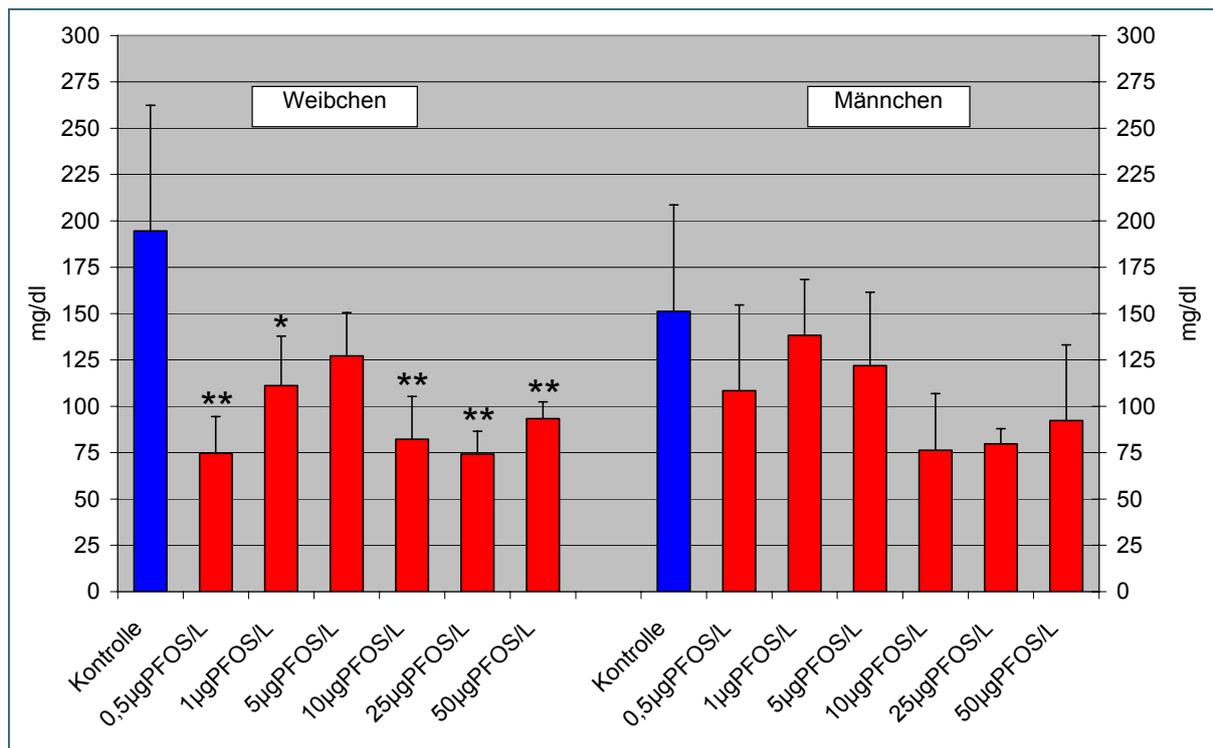


Abbildung 14: Konzentration von Glukose im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

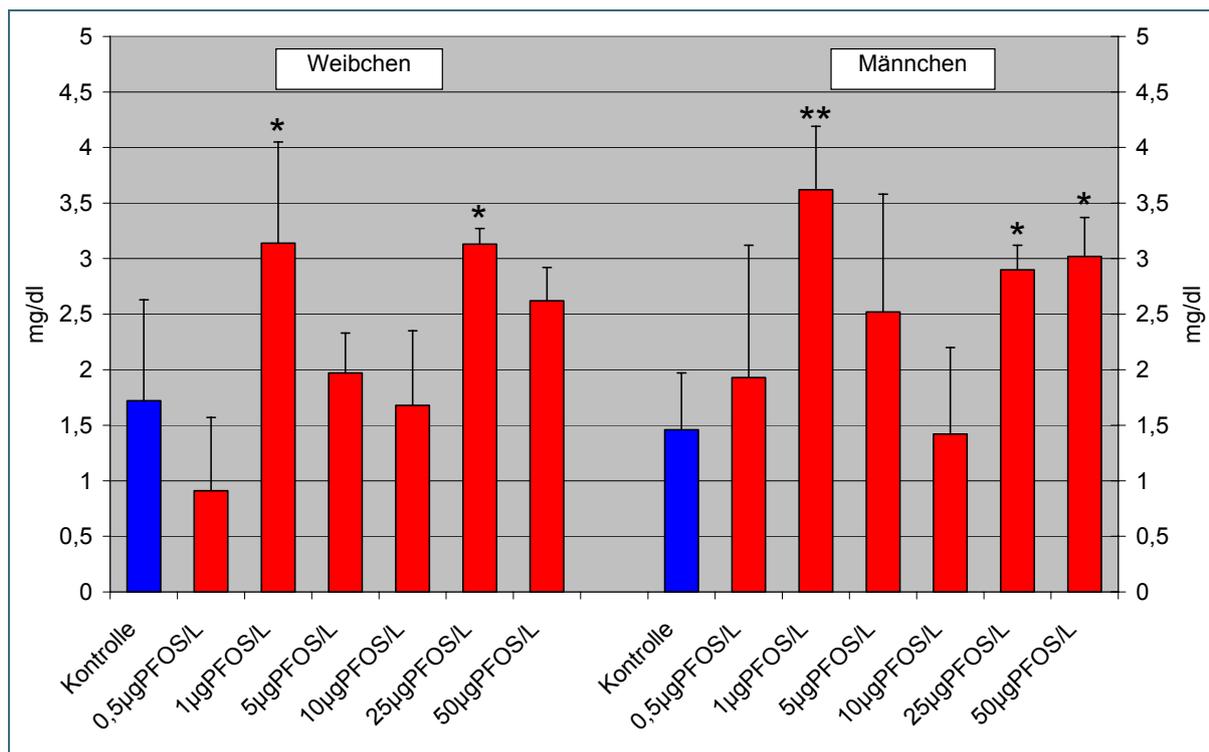


Abbildung 15: Konzentration von Gesamtprotein im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; *p<0,05, **p<0,01

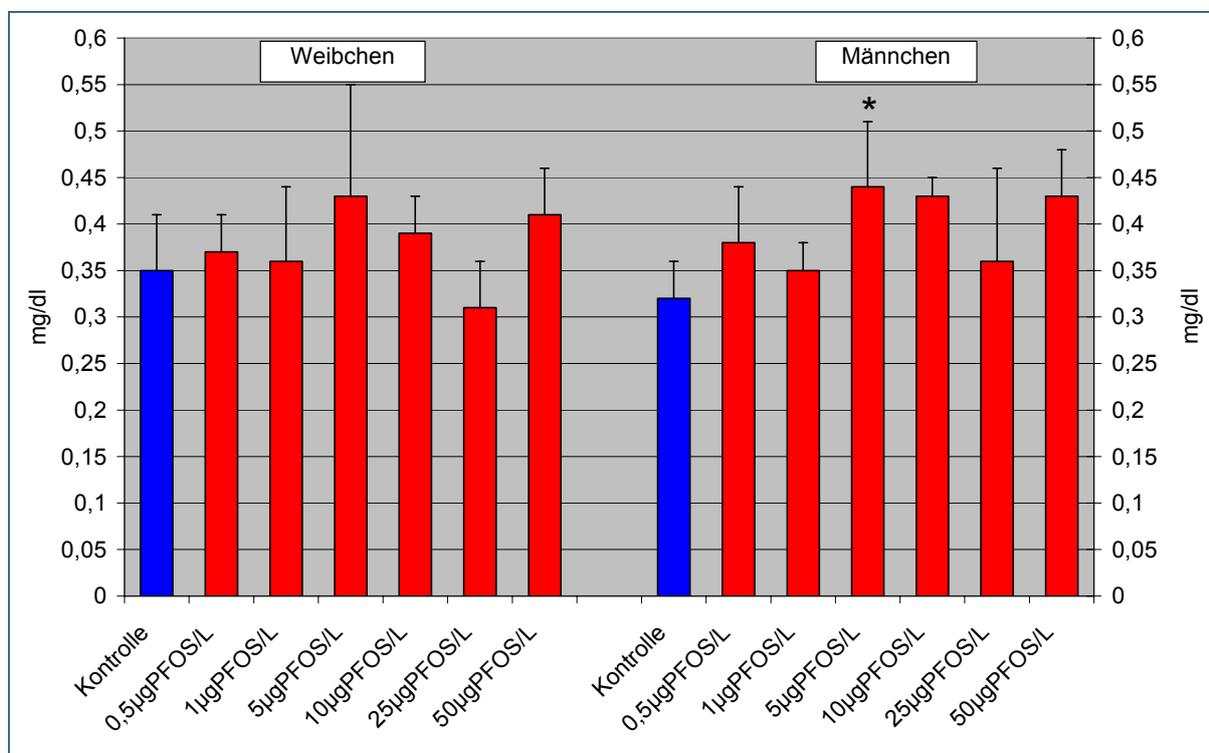


Abbildung 16: Konzentration von Kreatinin im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; *p<0,05

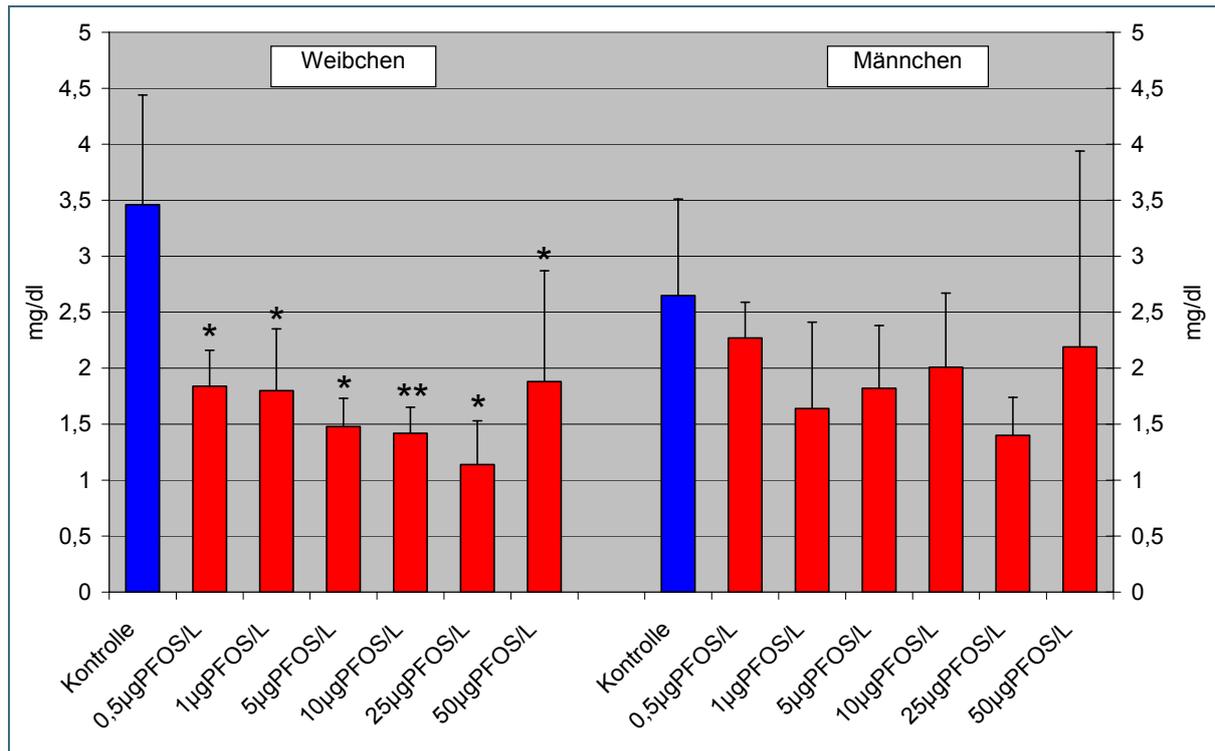


Abbildung 17: Konzentration von Harnstoff im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; *p<0,05, **p<0,01

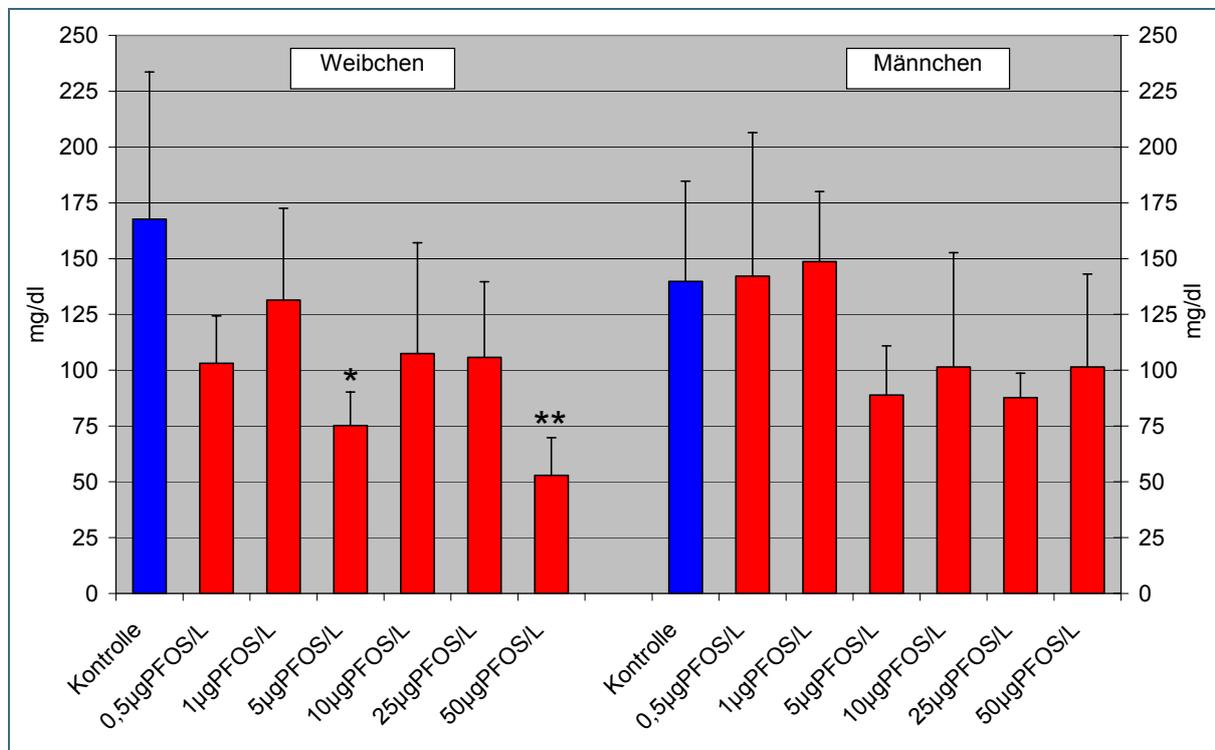


Abbildung 18: Konzentration von Triglyzerid im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; *p<0,05, **p<0,01

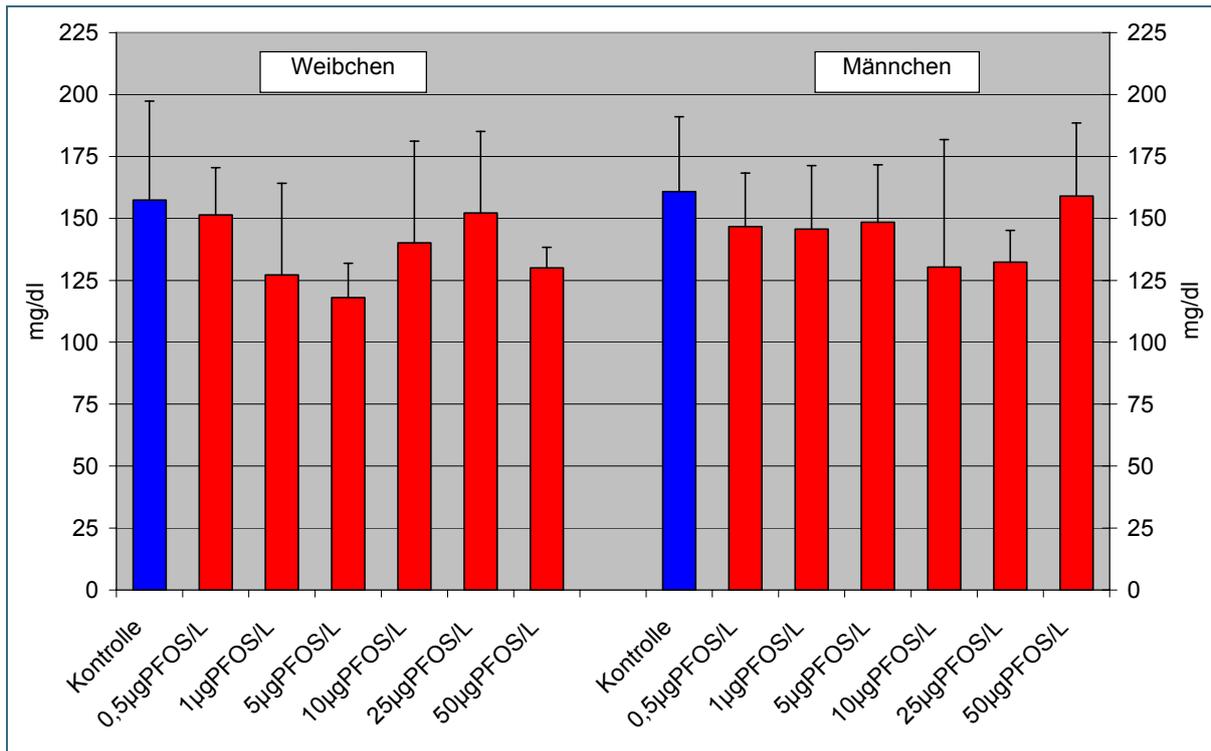


Abbildung 19: Konzentration von Cholesterin im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

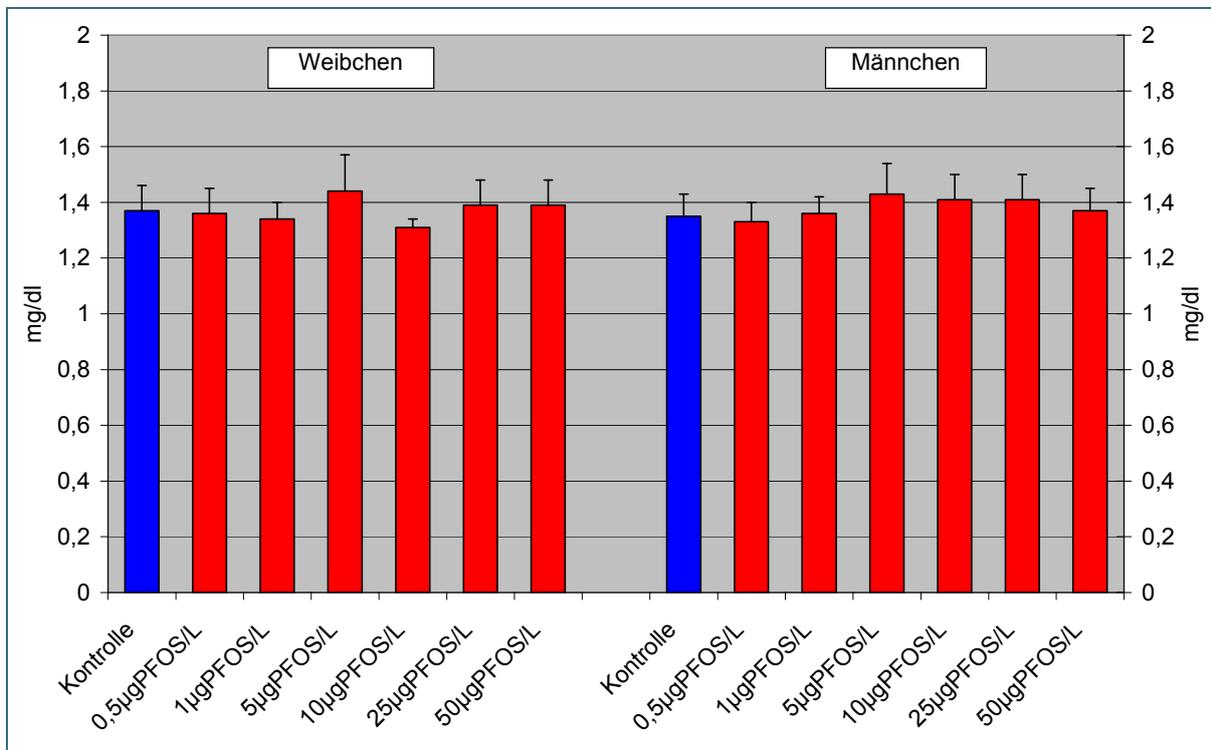


Abbildung 20: Konzentration von Bilirubin im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

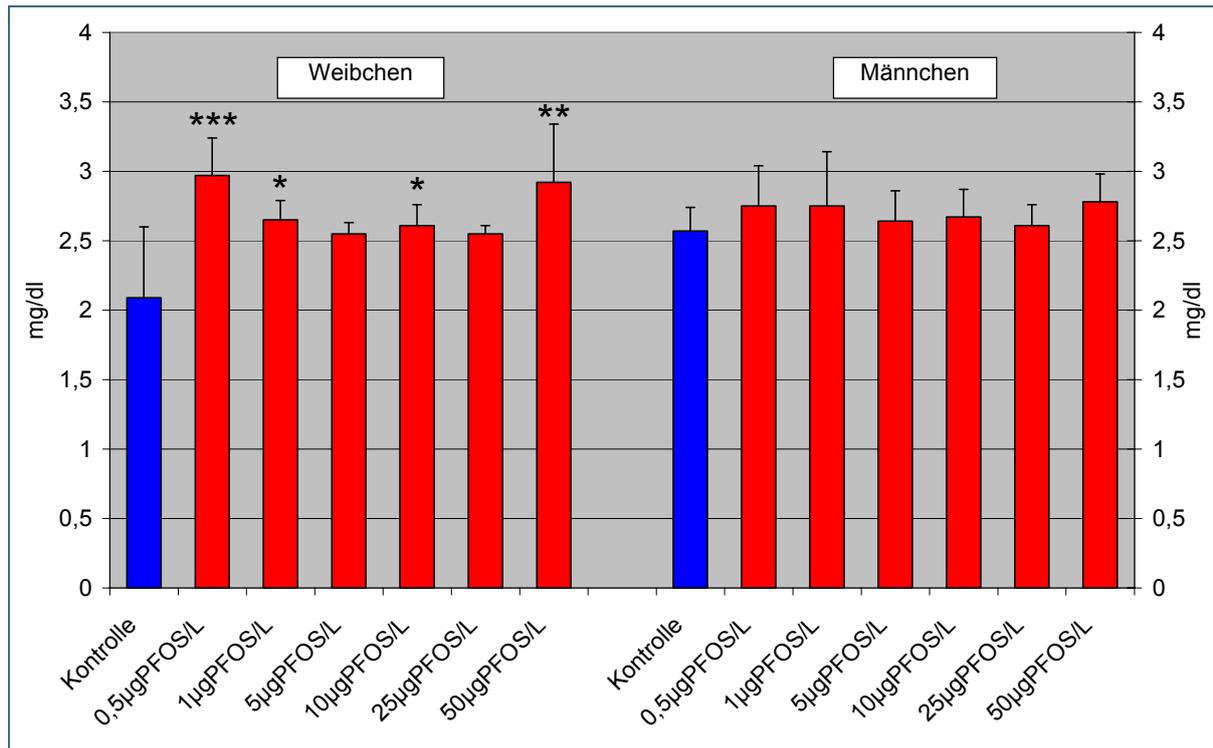


Abbildung 21: Konzentration von Kalzium im Plasma von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 μ g PFOS/L; * p <0,05, ** p <0,01, *** p >0,001

5.1.3 Histopathologische Untersuchungsergebnisse

Die histologischen Untersuchungen ergaben im Bereich von Leber und Niere signifikante Unterschiede zwischen PFOS-exponierten Tieren und Kontrollindividuen.

In der Leber der Fische wurde ab einer Exposition von 10 μ g PFOS/L eine hochsignifikante Abnahme (p <0,001) des Speicherstoffs Glykogen beobachtet (Abbildung 22 und 23). Pathologische Leberveränderungen im engeren Sinne beschränkten sich auf entzündliche Infiltrationen, welche sowohl disseminiert im Leberparenchym als auch in perivaskulärer und peribiliärer Lokalisation zu beobachten waren. Die entzündlichen Veränderungen traten in geringer Ausprägung gleichermaßen bei PFOS-exponierten und Kontrolltieren auf, sodass der Gesamtschädigungsgrad der Leber bei allen Gruppen vergleichbar war (Tabelle 13A).

Im Bereich der Niere wurde bei Tieren, die 50 μ g/L PFOS ausgesetzt waren, ein gegenüber den Kontrolltieren leicht erhöhter Gesamtschädigungsgrad (p <0,05) ermittelt. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass bei dieser Gruppe eine vermehrte hyalintropfige Speicherung in den Tubulusepithelien zu beobachten war (p <0,05) (Abbildung 24 und 25). Andere Nierenbefunde wie das Auftreten von Tubulusregeneraten, gelegentliche Einzelzelluntergänge im Tubulusepithel sowie die durchschnittliche Melanomakrophagendichte im Nierenparenchym waren bei PFOS-exponierten Fischen und Kontrolltieren vergleichbar (Tabelle 13A).

Die Untersuchung von Milz, Magen-Darm-Trakt, Pankreas, Gonaden und Haut ergab ebenfalls dezent ausgeprägte histopathologische Veränderungen. Allerdings ergab eine semiquantitative Bewertung der pathologischen Einzelbefunde wie auch des Gesamtschädigungsgrades der genannten Organe keine Unterschiede zwischen PFOS-exponierten Fischen und Kontrolltieren (Tabellen 13A und 13B). Die diagnostizierten Veränderungen umfassten eine lymphozytäre Entspeicherung der Milz, Verkalkungsherde in Lamina propria und Submukosa der Magenwand sowie ein sehr seltenes Auftreten von Einzelzellnekrosen und dezenten entzündlichen Infiltraten im Bereich des exokrinen Pankreas bzw. des Inselapparates. Die Beurteilung des Hodengewebes der männlichen Fische ergab keine pathologischen Veränderungen. Im Bereich der Ovarien war bei einzelnen Tieren fast aller Gruppen eine fokale Degeneration von Oozyten nachweisbar. Die Untersuchung der Haut ergab in seltenen Fällen dezente, subepidermal bzw. subkutan lokalisierte, fokale entzündliche Infiltrate.

Die Kiemen ließen ein breites Spektrum von meist dezent ausgeprägten Veränderungen erkennen. Diese umfassten eine lamelläre Ödematisierung, eine Vakuolisierung respiratorischer Epithelzellen, Einzelzelluntergänge im Sekundärlamellenepithel, eine Hyperplasie des respiratorischen Epithels, eine Proliferation von interlamellaren Zellen und Schleimzellen, fokale entzündliche Infiltrate, Fusionen einzelner Sekundärlamellen sowie gelegentliche Teleangiektasien. Ein statistischer Vergleich bezüglich des Auftretens von Einzelbefunden ergab Unterschiede zwischen Kontroll- und PFOS-exponierten Individuen. So waren bestimmte Veränderungen wie Vakuolisierung und Einzelzellnekrosen im Sekundärlamellenepithel nach Exposition in 0,5, 10, 25 und 50 µg PFOS/L geringer ausgeprägt als bei Kontrolltieren. Eine vermehrte Proliferation interlamellarer Zellen wurde hingegen nach Exposition in 1 und 50 µg PFOS/L beobachtet ($p < 0,05$). Bei der 1 µg/L-Gruppe waren zudem vermehrt entzündliche Infiltrate im Bereich der Kiemenlamellen nachweisbar ($p < 0,05$). Im Hinblick auf den Gesamtschädigungsgrad des Kiemengewebes waren jedoch bis auf eine geringfügige Abnahme nach Exposition in 10 µg PFOS/L keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen PFOS-exponierten und Kontrolltieren nachweisbar. Die genannten pathologischen Einzelbefunde, deren semiquantitative Bewertung sowie die Bewertung des Gesamtschädigungsgrades pro Organ und Versuchsgruppe enthalten die Tabellen 13A und 13B. Auf die Darstellung der Ergebnisse von Herz und Schwimmblase wurde verzichtet, da hier in keinem Fall pathologische Veränderungen diagnostiziert wurden.

Tabelle 13A: Qualität und semiquantitative Beurteilung des Schweregrads histologischer Befunde an Leber, Niere, Milz, Magen-Darm-Trakt, Pankreas, Gonadengewebe (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

Befunde	Kontrolle	0,5 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
Leber							
n	10	10	10	10	9	10	10
Glykogengehalt/ Leber	3,00 \pm 0,00	2,70 \pm 0,46	2,80 \pm 0,40	2,80 \pm 0,40	2,33 \pm 0,66 **	2,20 \pm 0,75 **	1,80 \pm 0,75 ***
Entzündliche Infiltrate disseminiert	0,30 \pm 0,46	0,10 \pm 0,30	0,20 \pm 0,40	0,30 \pm 0,46	0,22 \pm 0,42	0,20 \pm 0,40	0,10 \pm 0,30
Entzündliche Infiltrate perivaskulär	0,50 \pm 0,50	0,10 \pm 0,30	0,50 \pm 0,50	0,40 \pm 0,66	0,44 \pm 0,50	0,30 \pm 0,46	0,60 \pm 0,66
Entzündliche Infiltrate peribiliar	0,3 \pm 0,46	0,20 \pm 0,60	0,10 \pm 0,30	0,30 \pm 0,64	0,44 \pm 0,68	0,10 \pm 0,30	0,30 \pm 0,46
Schädigungsgrad/ Leber	0,37 \pm 0,31	0,13 \pm 0,22	0,27 \pm 0,25	0,33 \pm 0,42	0,37 \pm 0,19	0,20 \pm 0,22	0,33 \pm 0,26
Niere	Kontrolle	0,5 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
n	10	10	10	10	10	10	10
Hyalintropfige Speicherung/ geringgradig	0,40 \pm 0,49	0,30 \pm 0,46	0,30 \pm 0,46	0,40 \pm 0,49	0,60 \pm 0,49	0,50 \pm 0,50	0,20 \pm 0,40
Hyalintropfige Speicherung/ mittel-/hochgradig	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,20 \pm 0,40	0,00 \pm 0,00	0,10 \pm 0,30	0,40 \pm 0,49 *
Melanomakropha- gendichte	1,60 \pm 0,66	1,70 \pm 0,46	1,50 \pm 0,50	1,90 \pm 0,54	2,10 \pm 0,54	1,90 \pm 0,30	2,20 \pm 0,60
Regenerate/ Nierentubuli	0,80 \pm 0,60	0,20 \pm 0,40	0,90 \pm 0,54	0,30 \pm 0,46	0,30 \pm 0,46	0,00 \pm 0,00	0,70 \pm 0,46
Einzelzellnekrosen/ Tubulusepithel	0,10 \pm 0,30	0,10 \pm 0,30	0,00 \pm 0,00	0,30 \pm 0,46	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Schädigungsgrad/ Niere	0,58 \pm 0,17	0,46 \pm 0,16	0,54 \pm 0,18	0,62 \pm 0,27	0,60 \pm 0,18	0,50 \pm 0,10	0,70 \pm 0,18 *
Milz	Kontrolle	0,5 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
n	9	10	10	9	10	9	9
Lymphozytäre Entspeicherung	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,20 \pm 0,60	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,25 \pm 0,66
Schädigungsgrad/ Milz	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,20 \pm 0,60	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,25 \pm 0,66
Magen-Darmtrakt (MDT)	Kontrolle	0,5 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
n	10	9	9	10	10	10	10
Verkalkungsherde in Lamina propria und Submukosa der Magenwand	0,20 \pm 0,40	0,50 \pm 0,67	0,60 \pm 0,80	0,30 \pm 0,46	0,20 \pm 0,60	0,20 \pm 0,40	0,00 \pm 0,00
Schädigungsgrad/ MDT	0,20 \pm 0,40	0,50 \pm 0,67	0,60 \pm 0,80	0,30 \pm 0,46	0,20 \pm 0,60	0,20 \pm 0,40	0,00 \pm 0,00
Pankreas	Kontrolle	0,5 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
n	10	10	10	10	10	10	9
Einzelzellunter- gänge	0,10 \pm 0,30	0,10 \pm 0,30	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,20 \pm 0,40	0,10 \pm 0,30	0,00 \pm 0,00
entzündliche Infiltrate	0,10 \pm 0,30	0,10 \pm 0,30	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,10 \pm 0,30	0,00 \pm 0,00
Schädigungsgrad/ Pankreas	0,10 \pm 0,30	0,10 \pm 0,30	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,10 \pm 0,20	0,10 \pm 0,30	0,00 \pm 0,00

n: Anzahl der untersuchten Organe; *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 μg PFOS/L; * p <0,05, ** p <0,01*** p <0,001

Tabelle 13B: Qualität und semiquantitative Beurteilung des Schweregrads histologischer Befunde an Gonadengewebe, Kiemen und Haut (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

Befunde	Kontrolle	0,5 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
Gonadengewebe							
n	10	10	9	10	10	10	10
Anteil ♀	5/10	4/10	4/9	3/10	4/10	2/10	4/10
Anteil ♂	5/10	6/10	5/9	7/10	6/10	8/10	6/10
Schädigungsgrad/ Ovarien (fokale Oozytende- generation)	0,80 $\pm 0,98$	0,00 $\pm 0,00$	1,00 $\pm 1,00$	0,66 $\pm 0,94$	1,00 $\pm 0,00$	2,00 $\pm 0,00$	0,50 $\pm 0,87$
Schädigungsgrad/ Hoden	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$
Kiemen	Kontrolle	0,5 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
n	10	10	8	9	10	10	10
Lamelläre Ödematisierung	1,00 $\pm 0,45$	0,80 $\pm 0,40$	0,63 $\pm 0,48$	1,11 $\pm 0,31$	0,80 $\pm 0,60$	1,00 $\pm 0,63$	0,90 $\pm 0,54$
Vakuolisierung von Epithelzellen der Sekundärlamellen	1,40 $\pm 0,49$	1,00 $\pm 0,00$ *	1,38 $\pm 0,70$	1,11 $\pm 0,57$	1,00 $\pm 0,00$ *	1,00 $\pm 0,00$ *	0,80 $\pm 0,40$ *
Einzelzellnekrosen im Sekundärlamel- lenepithel	1,50 $\pm 0,50$	1,00 $\pm 0,00$ *	1,13 $\pm 0,60$	1,11 $\pm 0,31$	0,90 $\pm 0,30$ **	1,10 $\pm 0,30$	0,90 $\pm 0,30$ **
Hyperplasie des respiratorischen Epithels	0,90 $\pm 0,54$	0,80 $\pm 0,40$	1,00 $\pm 0,71$	1,00 $\pm 0,00$	0,50 $\pm 5,00$	0,60 $\pm 0,49$	0,80 $\pm 0,75$
Proliferation interlamellarer Zellen	0,00 $\pm 0,00$	0,20 $\pm 0,40$	0,50 $\pm 0,71$ *	0,44 $\pm 0,68$	0,10 $\pm 0,30$	0,20 $\pm 0,40$	0,50 $\pm 0,67$ *
Proliferation von Schleimzellen	1,00 $\pm 0,45$	0,80 $\pm 0,40$	0,88 $\pm 0,33$	1,11 $\pm 0,31$	0,90 $\pm 0,30$	0,80 $\pm 0,40$	0,90 $\pm 0,83$
Entzündliche Infiltrate	0,70 $\pm 0,46$	0,70 $\pm 0,46$	1,25 $\pm 0,43$ *	1,11 $\pm 0,57$	0,80 $\pm 0,60$	1,10 $\pm 0,70$	0,80 $\pm 0,40$
Fusion einzelner Sekundärlamellen	0,40 $\pm 0,66$	0,20 $\pm 0,40$	0,13 $\pm 0,33$	0,33 $\pm 0,66$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$
Teleangiektasien	0,00 $\pm 0,00$	0,10 $\pm 0,30$	0,25 $\pm 0,66$	0,11 $\pm 0,31$	0,20 $\pm 0,40$	0,10 $\pm 0,30$	0,20 $\pm 0,60$
Schädigungsgrad/ Kiemen	0,77 $\pm 0,20$	0,62 $\pm 0,17$	0,79 $\pm 0,39$	0,83 $\pm 0,26$	0,58 $\pm 0,08$ *	0,66 $\pm 0,17$	0,64 $\pm 0,26$
Haut	Kontrolle	0,5 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
n	10	10	10	10	10	10	10
Entzündliche Infiltrate/subepider- mal bzw. subkutan	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	0,10 $\pm 0,30$	0,00 $\pm 0,00$	0,10 $\pm 0,30$	0,00 $\pm 0,00$	0,20 $\pm 0,40$
Schädigungsgrad/ Haut	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	0,10 $\pm 0,30$	0,00 $\pm 0,00$	0,10 $\pm 0,30$	0,00 $\pm 0,00$	0,20 $\pm 0,40$

n: Anzahl der untersuchten Organe;*: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 μg PFOS/L; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

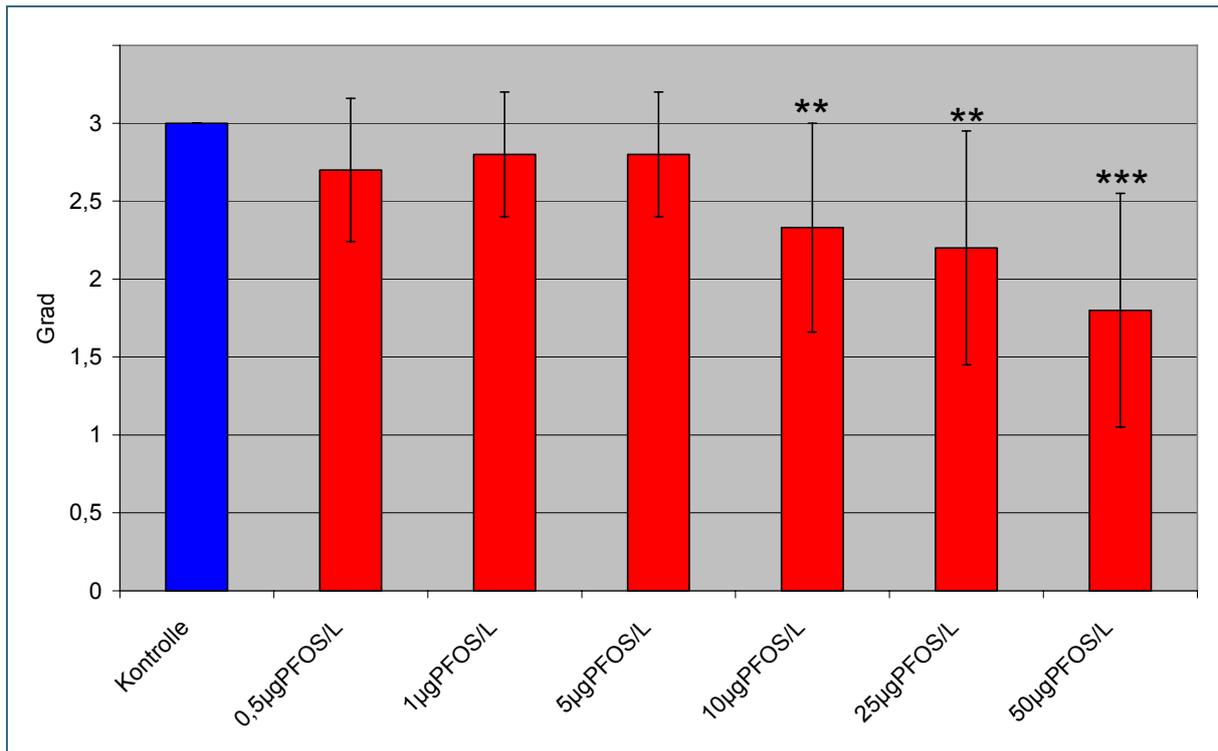


Abbildung 22: Semiquantitative Bewertung des Glykogengehaltes der Leber (Grad 0-3; Mittelwerte \pm Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 μ g PFOS/L; ** p <0,01, *** p <0,001

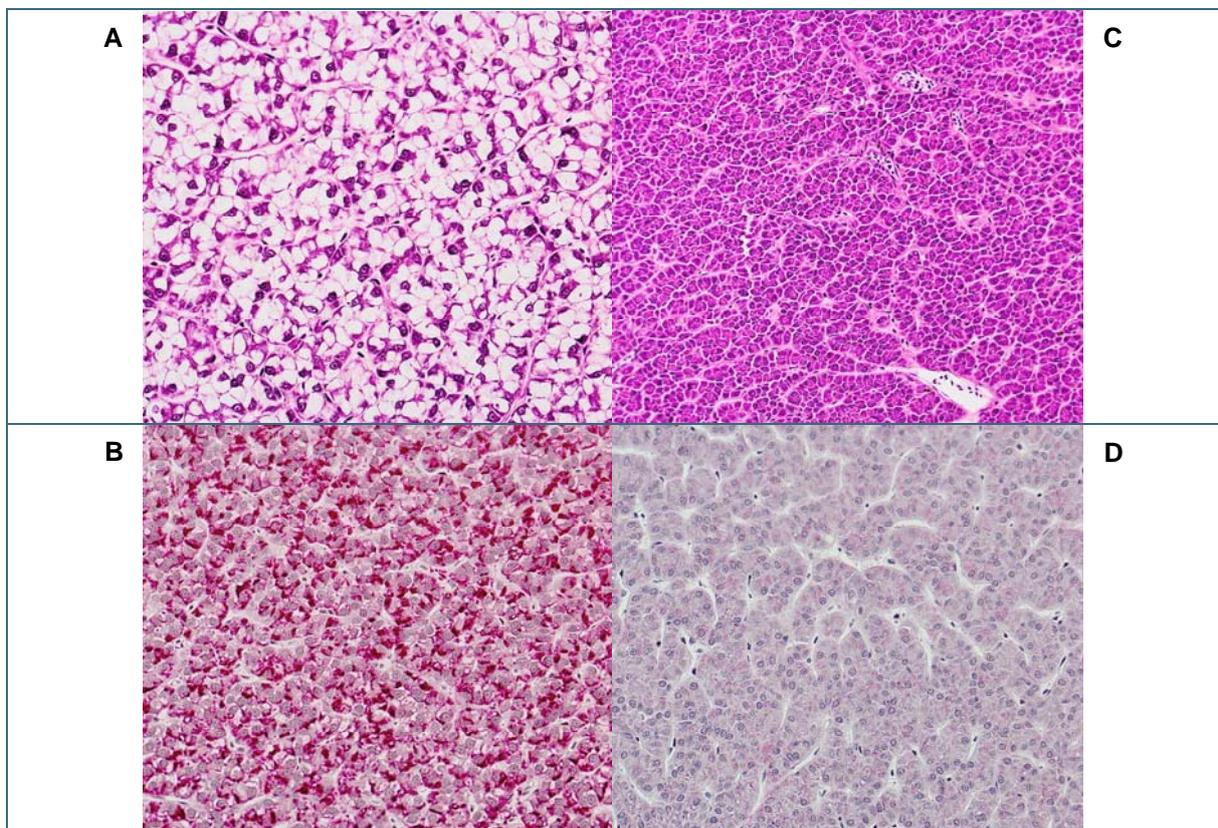


Abbildung 23: Lebergewebe von Regenbogenforellen. (A,B) Kontrolle: Lebergewebe mit hohem Glykogengehalt (C, D) Exposition in 50 μ g PFOS/L: Lebergewebe mit geringem Glykogengehalt; Färbungen (A,C) Hämatoxylin-Eosin; (B,D) Glykogenfärbung (Karminfärbung nach Best); Primärvergrößerung 200 x

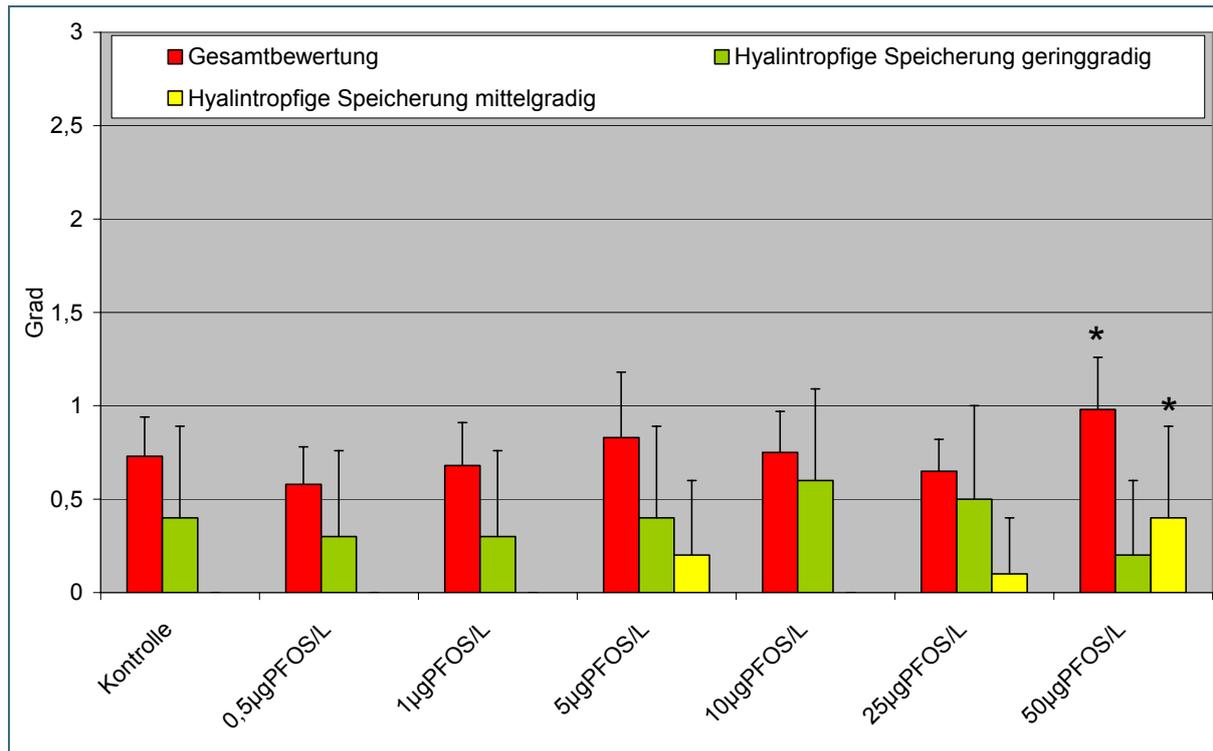


Abbildung 24: Semiquantitative Bewertung des Schädigungsgrades der Niere (Grad 0-3; Mittelwerte \pm Standardabweichung); * Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 μg PFOS/L; * $p < 0,05$

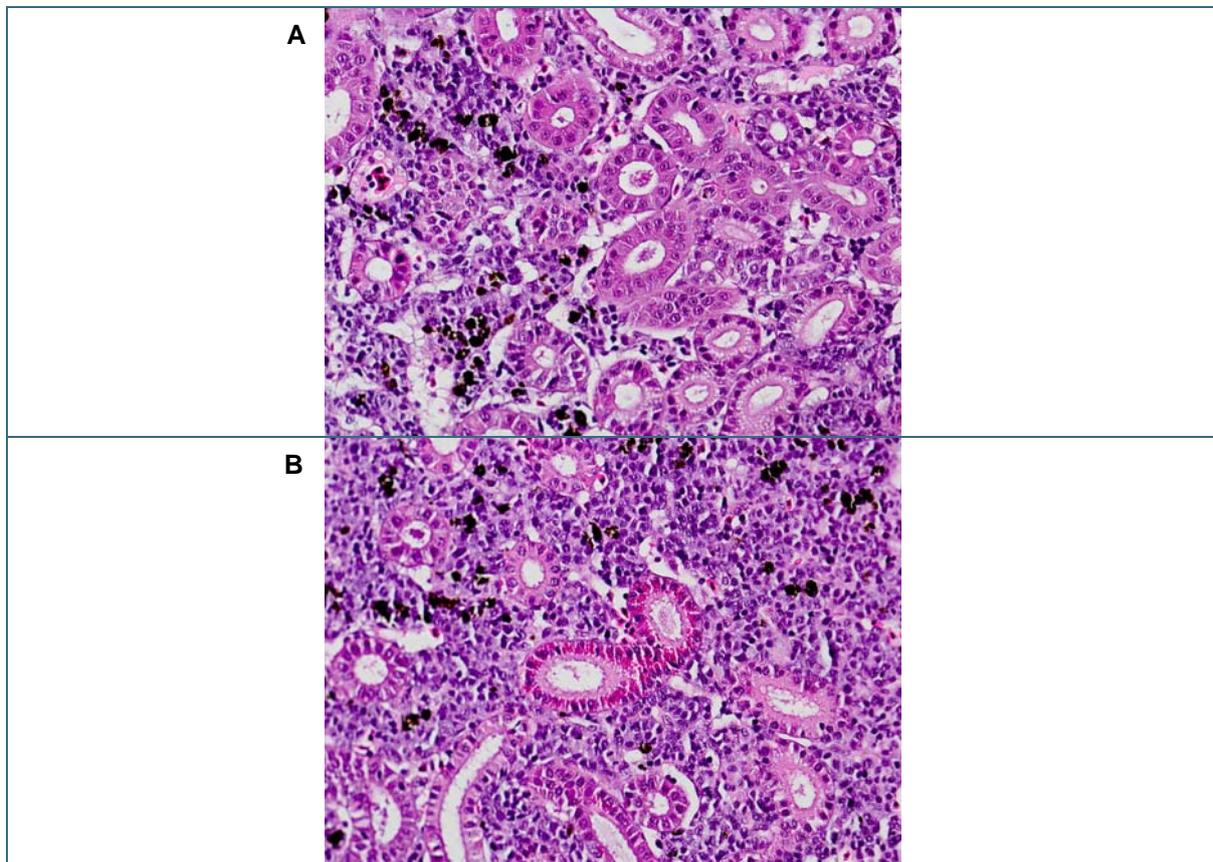


Abbildung 25: Rumpfnierengewebe von Regenbogenforellen. (A) Rumpfnierengewebe ohne pathologischen Befund; (B) Rumpfnierengewebe einer Regenbogenforelle nach Exposition in 50 μg PFOS/L: Hyalintropfige Speicherung; Färbung Hämatoxylin-Eosin; Primärvergrößerung 200 x

5.1.4 Ergebnisse der Rückstandsanalysen

Die rückstandsanalytischen Untersuchungen wurden an Gewebeproben von Blut, Leber, Niere, Kiemen und Muskulatur sowie an einer Probe der während des gesamten Versuchs verwendeten Futtermittelcharge durchgeführt. Die Überprüfung des Futtermittels ergab einen PFOS-Gehalt von 0,7 µg PFOS/kg Futter. Die in den Fischorganen ermittelten Rückstandswerte sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Bei Kontrolltieren wurden geringe Mengen von PFOS in Blut und Leber nachgewiesen. In Niere, Kiemen und Muskulatur der Kontrollgruppe war dagegen kein PFOS vorhanden. Nach 28-tägiger PFOS-Exposition kam es zu einer konzentrationsabhängigen Anreicherung von PFOS in allen untersuchten Geweben. Dabei war in allen Versuchsgruppen die stärkste Anreicherung in der Leber zu beobachten. Die zweithöchste PFOS-Belastung wies das Blut der Versuchsfische der einzelnen Gruppen auf. An dritter Stelle rangierten je nach Höhe der Expositionskonzentration entweder Niere (0,5, 1, 5, 10 µg PFOS/L) oder Kiemen (25, 50 µg PFOS/L). Die niedrigsten Konzentrationen innerhalb der Versuchsgruppen wurden im Muskelgewebe nachgewiesen. In Abbildung 26 sind die Biokonzentrationsfaktoren für PFOS in den verschiedenen Fischgeweben dargestellt.

Tabelle 14: PFOS-Konzentrationen der untersuchten Fischgewebe (in µg/ kg) nach 28-tägiger PFOS-Exposition in den verschiedenen Testgruppen (Mittelwerte ± Standardabweichung)

	Kontrolle	0,5 µg/L	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L
Muskulatur	0,00 ±0,00	1,18 ±0,54	5,83 ±1,75	11,02 ±3,88	26,80 ±14,70	63,67 ±25,69	385, 6±238,52
Kiemen	0,00 ±0,00	14,02 ±1,02	60,98 ±15,64	263,9 ±108,26	489,62±17 2,38	1472,97 ±896,02	6890,33 ±4832,62
Niere	0,00 ±0,00	23,23 ±5,76	119,8 ±20,96	284,55 ±72,21	674,18±14 9,96	1325,77 ±126,98	5572 ±2480,34
Blut	5,73 ±2,40	30,3 ±6,16	158,85 ±45,46	420,2 ±193,28	832,27 ±359,41	2445,88 ±547,26	8682,77 ±5109,58
Leber	6,12 ±4,47	38,77 ±6,83	176,04 ±14,58	581,77 ±192,63	2461,12 ±614,38	5846,12 ±1285,98	18343,27 ±2351,41

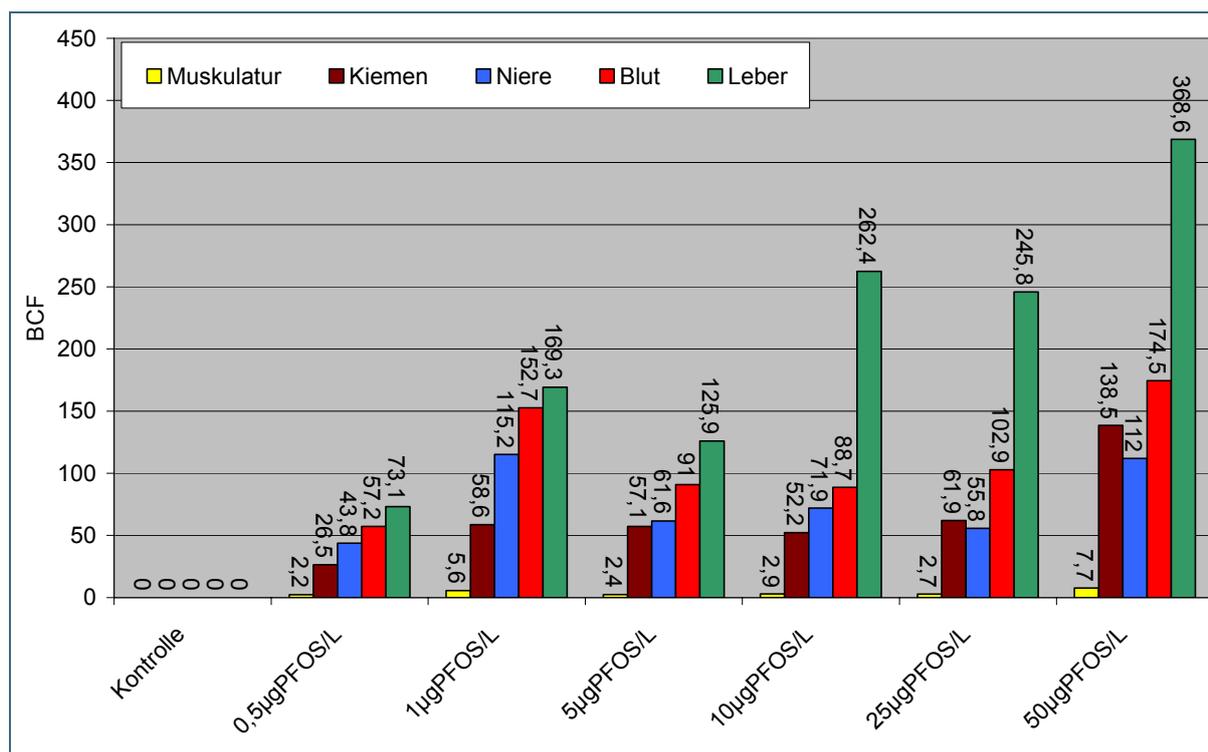


Abbildung 26: Biokonzentrationsfaktoren für PFOS in verschiedenen Geweben von Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition

5.2 Versuch II: Untersuchungsergebnisse zur endokrinen Wirkung von PFOS

5.2.1 Histologische Geschlechtsbestimmung und Untersuchungen zum gonadalen Reifegrad

Die histologische Untersuchung von Gonadengewebe ermöglichte eine eindeutige Bestimmung des Geschlechts der Versuchstiere. Die Anzahl männlicher und weiblicher Fische in den verschiedenen Versuchsgruppen sowie das Geschlechterverhältnis sind in Tabelle 15 wiedergegeben.

Tabelle 15: Ergebnisse der histologischen Geschlechtsbestimmung, absolute Anzahl männlicher und weiblicher Fische und Geschlechterverhältnis

Befunde	Kontrolle	0,5 µg/L	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L
Gesamtanzahl n	32	32	32	32	32	32	31
Anzahl ♂	14	13	20	19	16	21	19
Anzahl ♀	18	19	12	13	16	11	12
Prozentualer Anteil ♂:♀	43 : 56	41 : 59	63 : 37	59 : 41	50 : 50	66 : 34	61 : 39

Die Bestimmung des gonadalen Reifegrades ergab bei PFT-exponierten männlichen Individuen im Mittel meist keinen Unterschied zu Kontrolltieren. Eine Ausnahme bildete die 5 µg/L-Gruppe, bei der aufgrund der Tatsache, dass Einzeltiere eine fortgeschrittene Reife des Hodengewebes aufwiesen, ein gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhter mittlerer gonadaler Reifegrad beobachtet wurde. I.R. der Untersuchung von Eierstockgewebe wurden bei weiblichen Tieren keine Unterschiede im gonadalen Reifegrad zwischen Kontrolltieren und PFOS-exponierten Individuen ermittelt. Einen Überblick über die Reifegrade des Gonadengewebes bei männlichen und weiblichen Tieren aller Versuchsgruppen gibt Tabelle 16.

Tabelle 16: Ergebnisse der histologischen Bewertung des gonadalen Reifegrades bei männlichen und weiblichen Fischen (Mittelwerte ± Standardabweichung)

Befunde	Kontrolle	0,5 µg/L	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L
Anzahl ♂	14	13	20	19	16	21	19
Gonadaler Reifegrad/ Hoden							
Anzahl Reifegrad 0	9	8	12	6	7	13	9
Anzahl Reifegrad 1	1	0	0	1	1	0	2
Anzahl Reifegrad 2	4	2	4	5	5	5	3
Anzahl Reifegrad 3	0	3	4	7	3	3	5
Anzahl ♀	18	19	12	13	16	11	12
Gonadaler Reifegrad/ Eierstock (Ovar)							
Anzahl Reifegrad 2	16	19	12	12	15	11	11
Anzahl Reifegrad 3	2	0	0	1	1	0	1

5.2.2 Ergebnisse der Analyse von Sexualhormonen, Vitellogenin und Schilddrüsenhormonen

Die biochemische Analyse der Blutspiegel von Sexualhormonen, Vitellogenin und Schilddrüsenhormonen ergab zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern, sodass eine getrennte Darstellung der Ergebnisse für weibliche und männliche Fische erfolgt.

5.2.2.1 Männliche Tiere

Die Bestimmung des Testosterongehaltes im Blut männlicher Fische ergab keine Unterschiede zwischen PFOS-exponierten Fischen und Kontrolltieren (Abbildung 27). Die Blutspiegel von 11-keto-Testosteron waren nach Exposition in 5, 10 und 50 µg PFOS/L signifikant gegenüber Kontrollwerten erhöht (Abbildung 28). Wie aus den Abbildungen 27 und 28 hervorgeht, wurde für beide Hormone eine hohe positive Korrelation ($p < 0,001$) zwischen der Höhe der Hormonspiegel im Blut und dem gonadalen Reifegrad ermittelt. Die 17β-Estradiolgehalte im Blut der PFOS-exponierten Fische waren in der Regel mit den bei Kontrolltieren ermittelten Werten vergleichbar. Ausschließlich bei Tieren, die 5 µg PFOS/L ausgesetzt waren, wurde eine signifikante Abnahme der 17β-Estradiolspiegel beobachtet. Generell korrelierten die 17β-Estradiolwerte bei den männlichen Tieren nicht mit deren gonadalem Reifegrad (Abbildung 29).

Die Analyse des Vitellogeningehaltes im Blut ergab keine Unterschiede zwischen PFOS-exponierten und Kontrolltieren. Auch für die Vitellogeninwerte wurde keine Korrelation zum Reifegrad des Hodengewebes nachgewiesen (Abbildung 30).

Hinsichtlich der Schilddrüsenhormone ergab sich bei männlichen Fischen folgendes Bild. Die Blutspiegel für T3 (Trijodthyronin) zeigten nach Einwirkung von PFOS in der Regel keine Veränderungen gegenüber Kontrollwerten. Nur in der 0,5 µg/L-Gruppe wurden erhöhte Werte beobachtet (Abbildung 31). Ebenso ergab die Bestimmung von T4 (Thyroxin) bei PFOS-exponierten Fischen meist den Kontrolltieren vergleichbare Werte. Ausschließlich Fische, die 25 µg PFOS/L ausgesetzt waren, wiesen niedrigere T4-Hormonspiegel auf (Abbildung 32). Im Gegensatz dazu lagen die Gehalte an TSH (Thyreoida stimulierendes Hormon) im Blut der Fische bereits ab einer Einwirkung von 0,5 µg PFOS/L deutlich niedriger als bei Kontrolltieren (Abbildung 33). Die Blutspiegel der Schilddrüsenhormone korrelierten nicht mit dem gonadalen Reifegrad der männlichen Versuchstiere (Abbildungen 31-33).

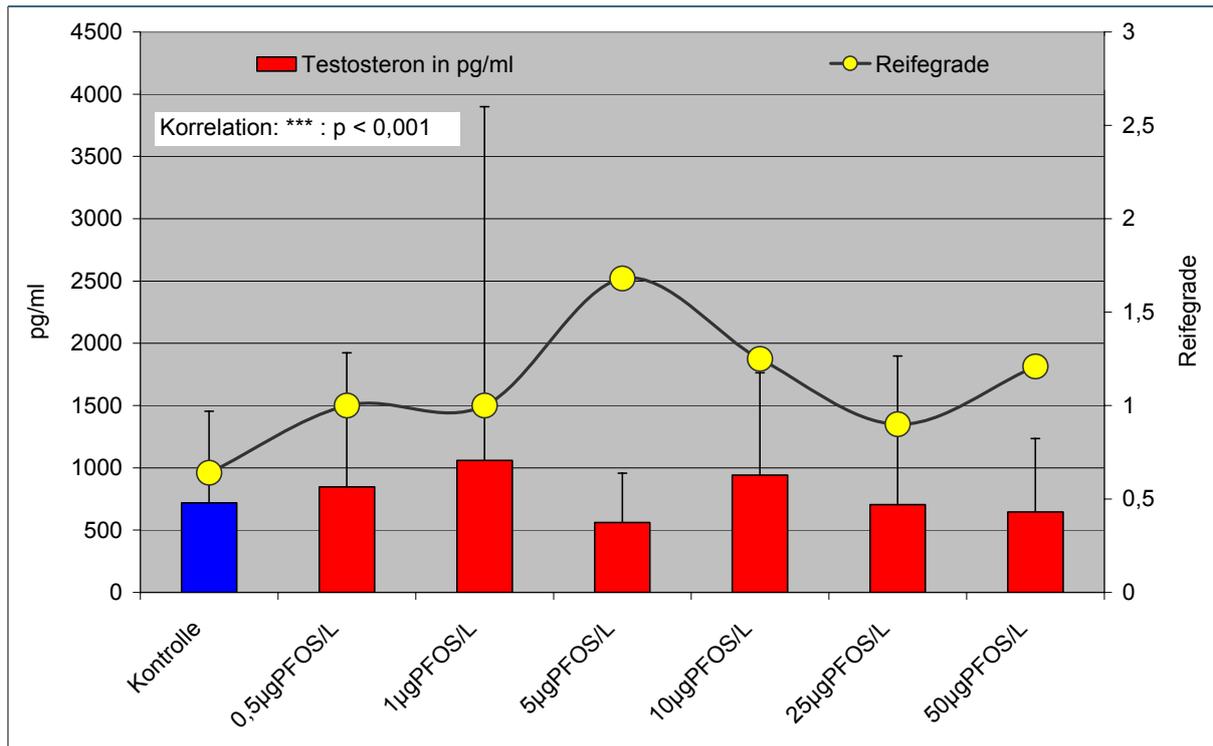


Abbildung 27: Konzentration von Testosteron im Plasma männlicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung)

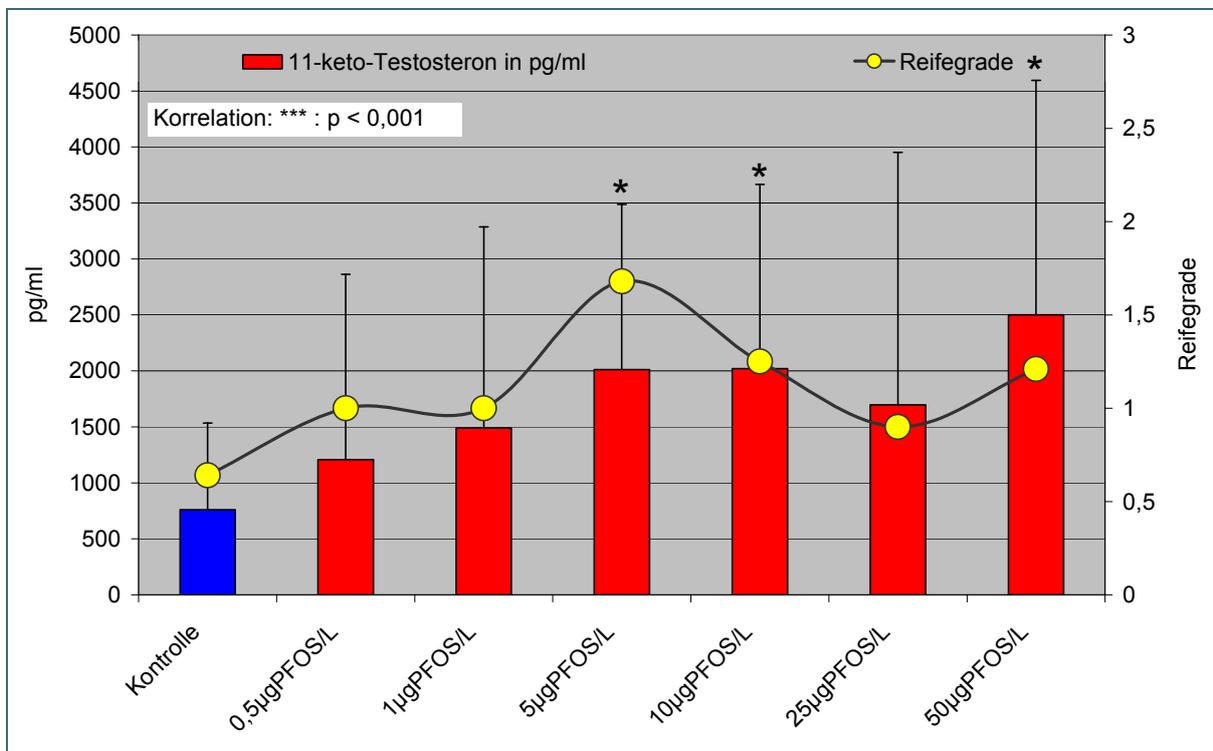


Abbildung 28: Konzentration von 11-keto Testosteron im Plasma männlicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; *p<0,05,

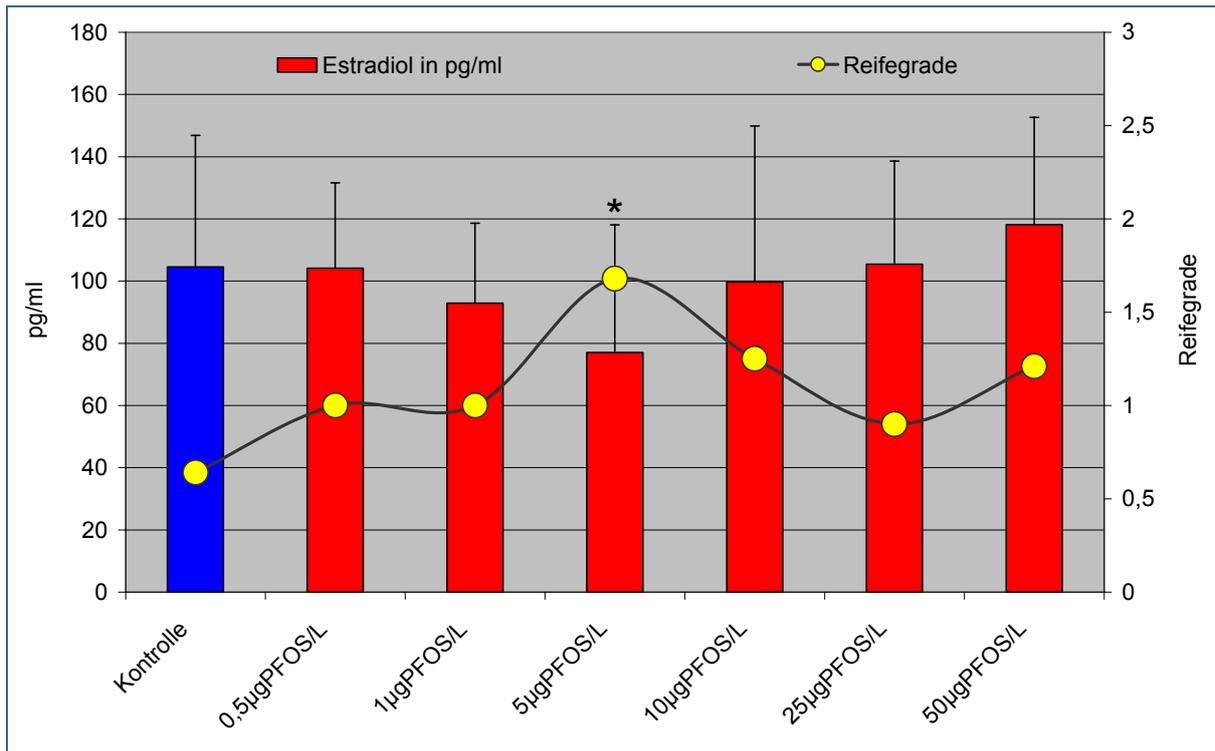


Abbildung 29: Konzentration von Estradiol im Plasma männlicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 μ g PFOS/L; * p <0,05,

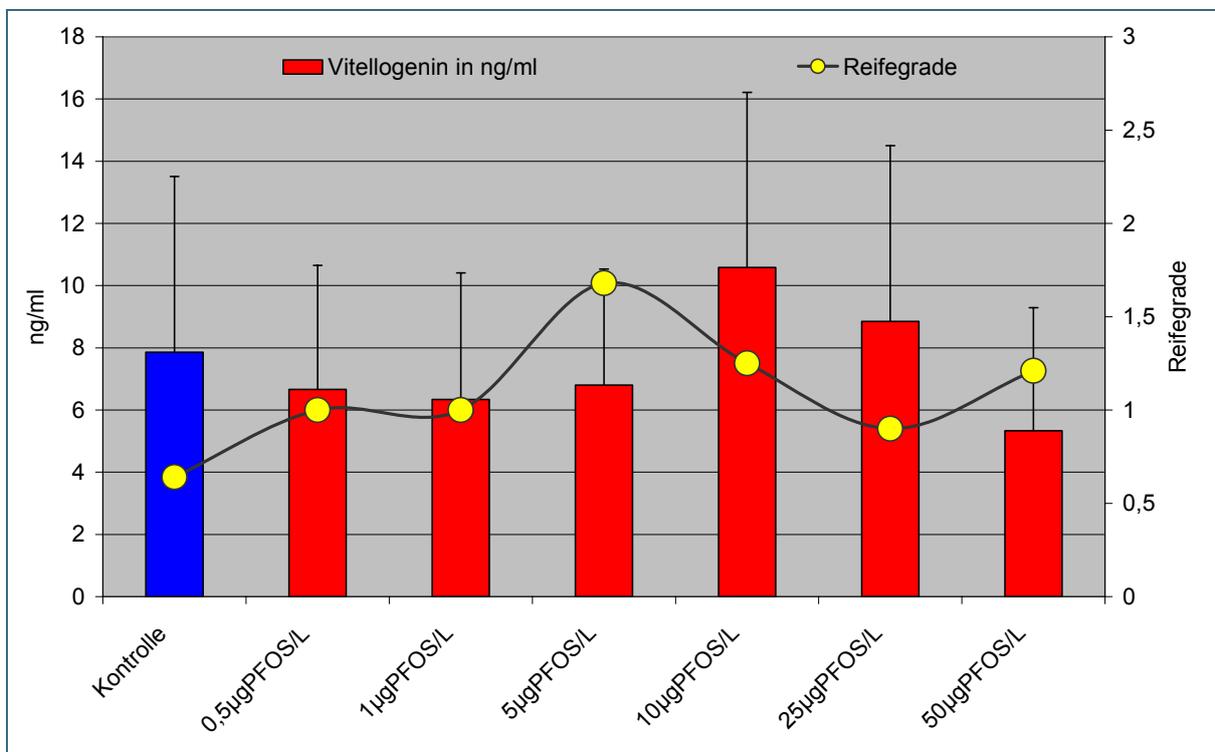


Abbildung 30: Konzentration von Vitellogenin im Plasma männlicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung)

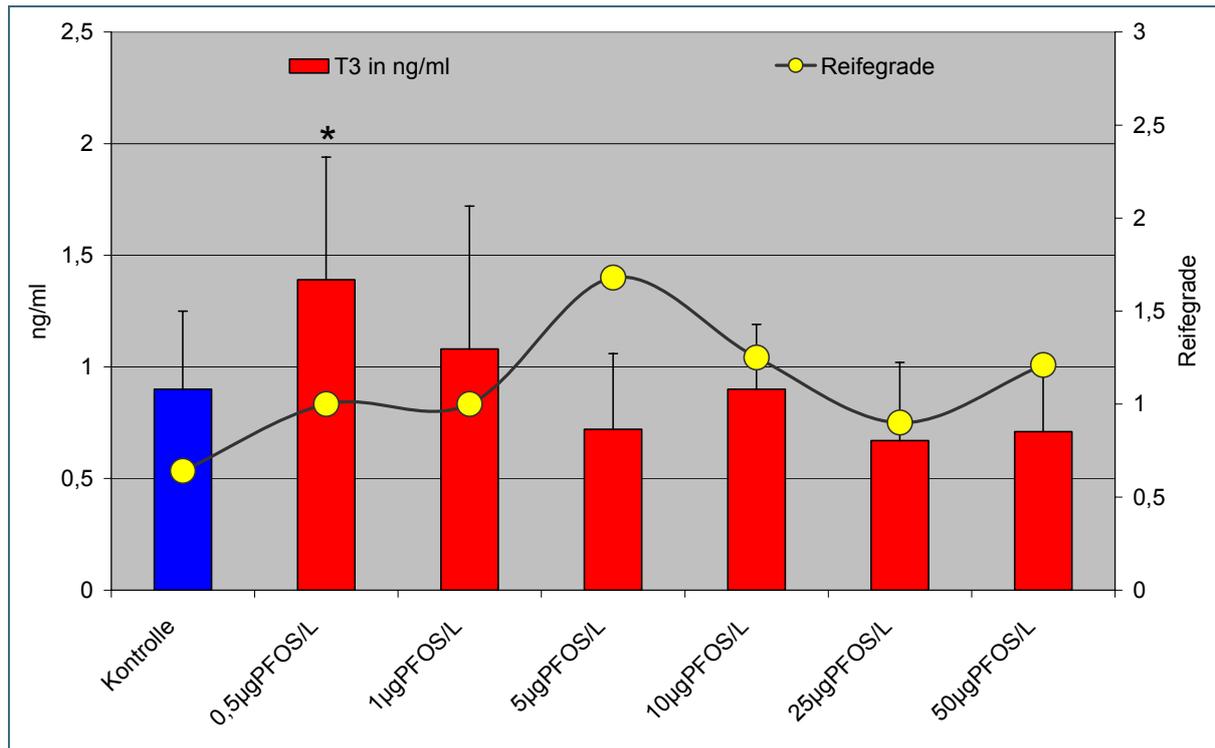


Abbildung 31: Konzentration von T3 (Trijodthyronin) im Plasma männlicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; * $p < 0,05$

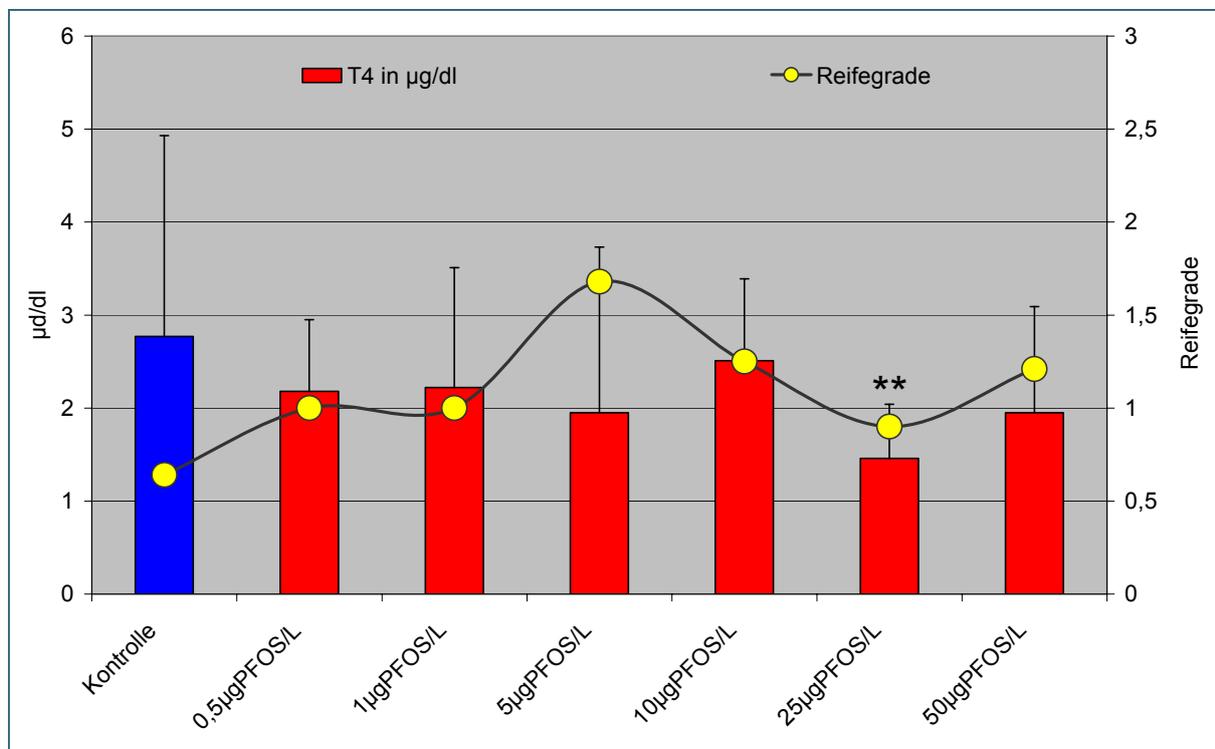


Abbildung 32: Konzentration von T4 (Thyroxin) im Plasma männlicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; ** $p < 0,01$

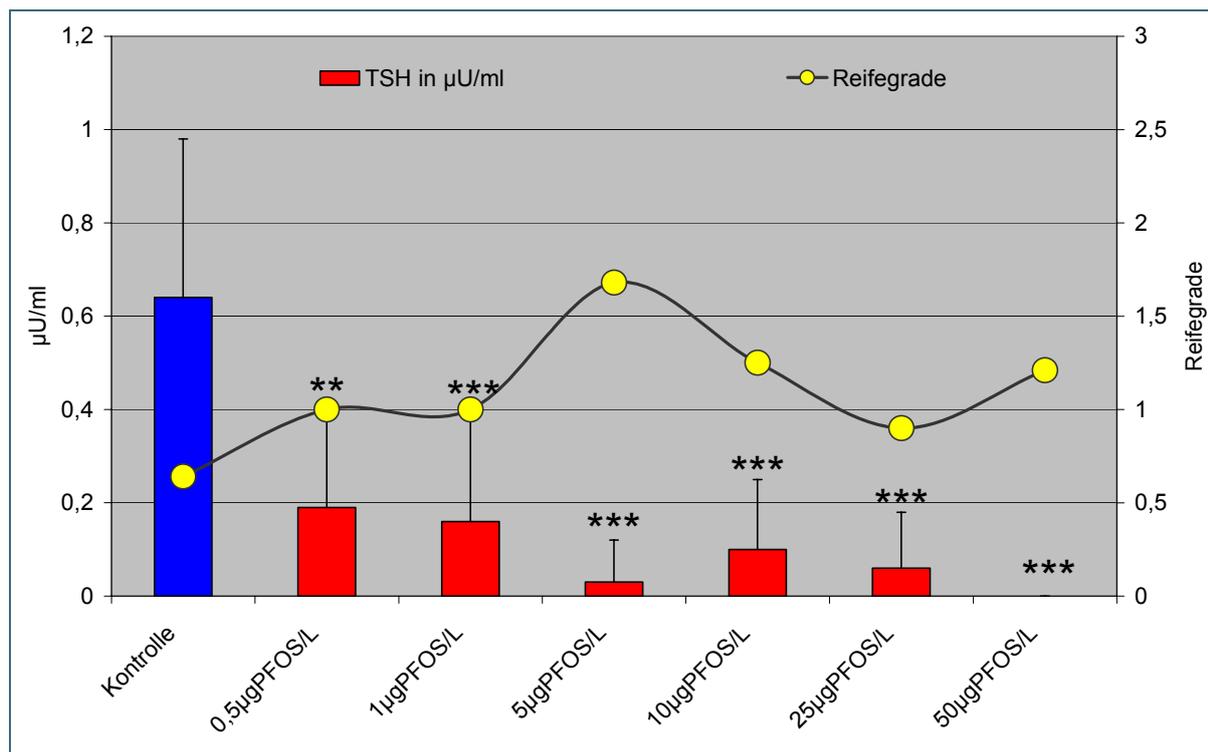


Abbildung 33: Konzentration von TSH (Thyreoida stimulierendes Hormon) im Plasma männlicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 μg PFOS/L; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

5.2.2.2 Weibliche Tiere

Bei weiblichen Testfischen führte eine PFOS-Exposition bereits ab einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Testosteron-Spiegel im Blut (Abbildung 34). Die Blutwerte von 11-keto-Testosteron waren ab einer Konzentration von 1 μg PFOS/L deutlich erhöht. Eine Ausnahme bildeten die Individuen der 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ -Gruppe, bei denen der 11-keto-Testosterongehalt im Mittel nur geringfügig über dem der Kontrollgruppe lag (Abbildung 35). Wie in den Abbildungen 34 und 35 dargestellt, korrelierten weder die Testosteronspiegel noch die Gehalte von 11-keto-Testosteron im Blut mit dem Reifegrad der Ovarien. Die Bestimmung von 17β -Estradiol ergab bei Fischen, die 0,5, 25 und 50 μg PFOS/L ausgesetzt waren, niedrigere Werte als bei Kontrolltieren. Für die übrigen PFOS-exponierten Versuchstiergruppen wurden den Kontrolltieren vergleichbare Werte ermittelt (Abbildung 36). Wie aus der Abbildung 36 hervorgeht, korrelierten die 17β -Estradiolwerte sehr stark ($p < 0,001$) mit dem Reifegrad der Ovarien.

Die Bestimmung des Vitellogeningehaltes im Blut der weiblichen Fischen ergab bei Individuen, die 0,5 und 1 und 50 μg PFOS/L ausgesetzt waren, niedrigere Werte als bei Kontrolltieren. In den 5 bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ -exponierten Gruppen lagen die Vitellogeninkonzentrationen im Bereich der Kontrollwerte. Auch für die Vitellogeninwerte wurde eine enge positive Korrelation zum gonadalen Reifegrad der Tiere ermittelt (Abbildung 37).

Unter den analysierten Schilddrüsenhormonen erwies sich T3 bei Fischen nach Exposition in 0,5 µg PFOS/L erhöht, nach Exposition in 50 µg/L hingegen erniedrigt. Bei Fischen der übrigen Versuchsgruppen wurden den Kontrolltieren vergleichbare Werte für T3 ermittelt (Abbildung 38). Bei allen Versuchsgruppen wurde ab einer Expositionskonzentration von 1 µg PFOS/L eine deutliche Absenkung der Blutspiegel von T4 gegenüber Kontrollwerten beobachtet (Abbildung 39). Die Blutgehalte an TSH waren ab einer PFOS-Konzentration von 0,5 µg/L statistisch signifikant verringert (Abbildung 40). Auch bei den weiblichen Tieren wurden hinsichtlich der Schilddrüsenhormone keine Korrelationen zwischen der Höhe der Hormonspiegel und dem gonadalen Reifegrad ermittelt (Abbildungen 38-40).

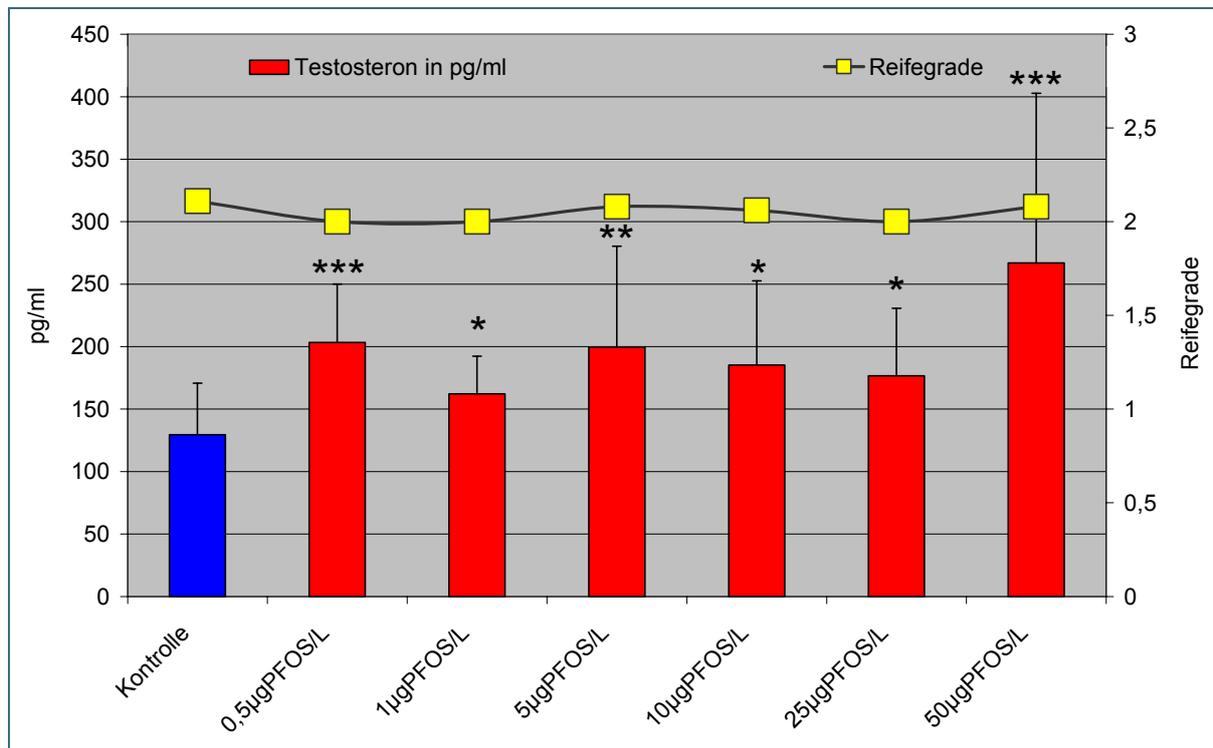


Abbildung 34: Konzentration von Testosteron im Plasma weiblicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

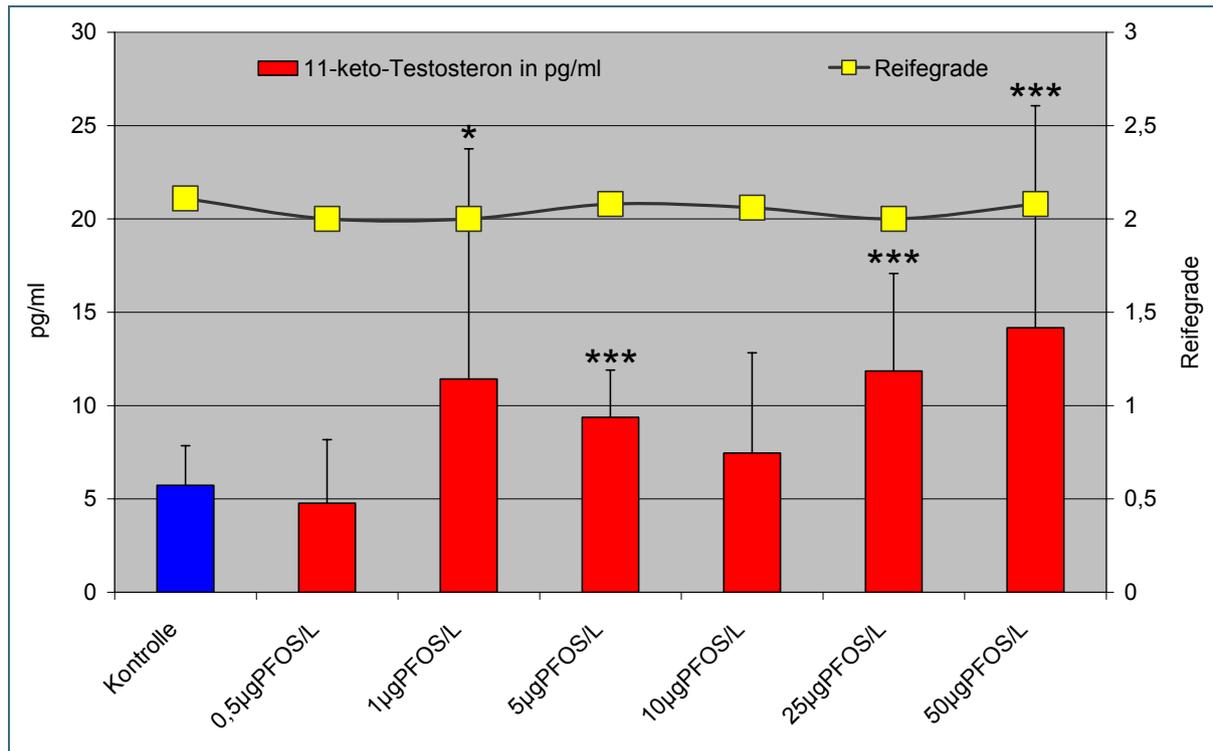


Abbildung 35: Konzentration von 11-keto Testosteron im Plasma weiblicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 μ g PFOS/L; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

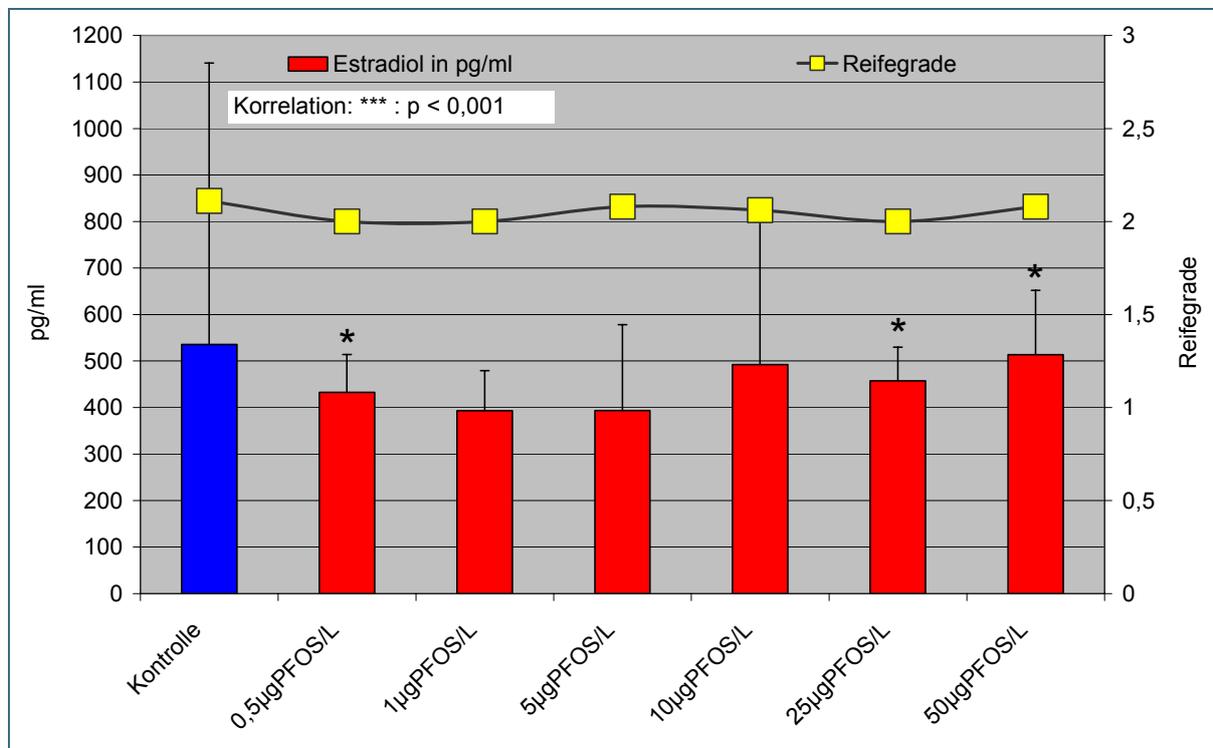


Abbildung 36: Konzentration von Estradiol im Plasma weiblicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 μ g PFOS/L; * $p < 0,05$, Korrelation: *** : $p < 0,001$

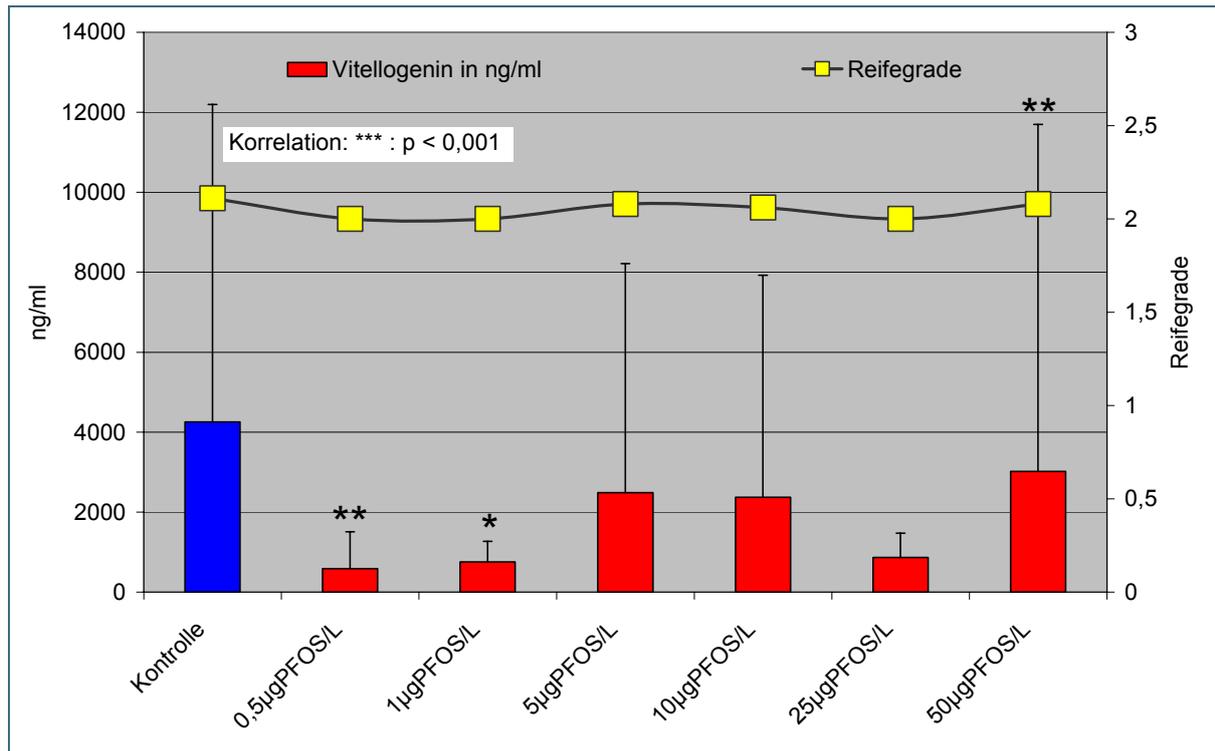


Abbildung 37: Konzentration von Vitellogenin im Plasma weiblicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; *p<0,05, **p<0,01

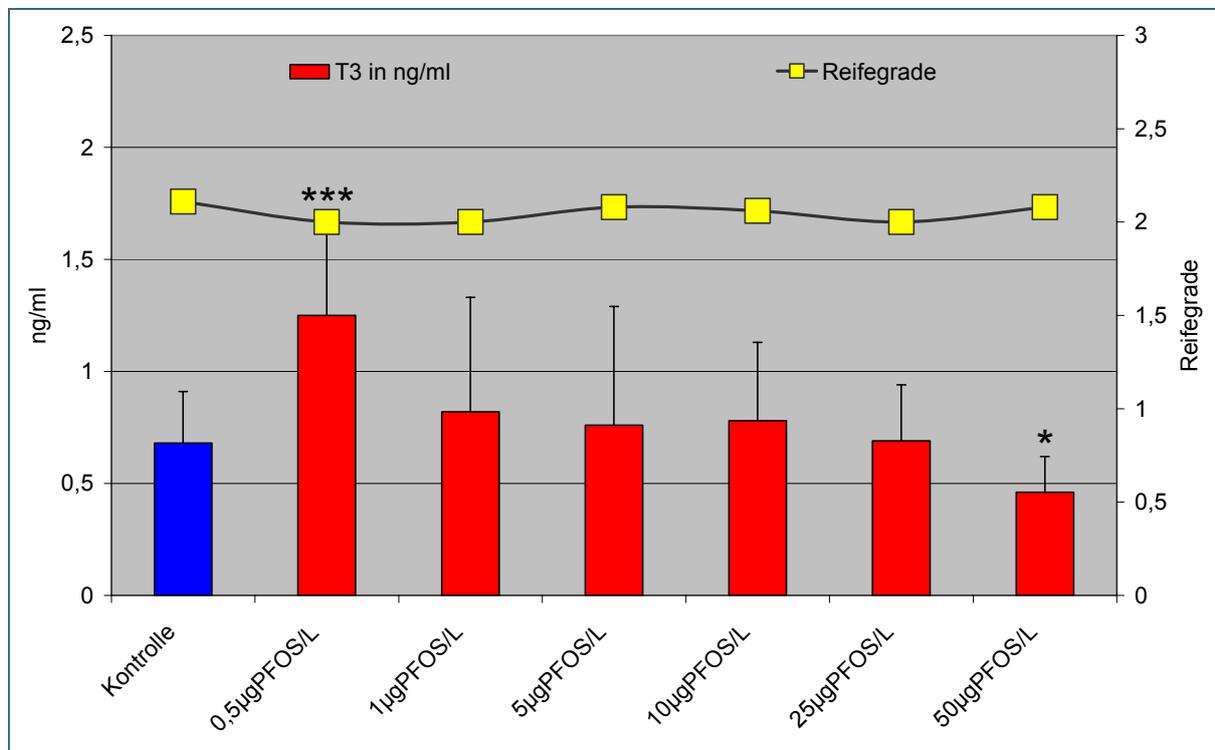


Abbildung 38: Konzentration von T3 (Trijodthyronin) im Plasma weiblicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte ± Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg PFOS/L; *p<0,05, ***p<0,001

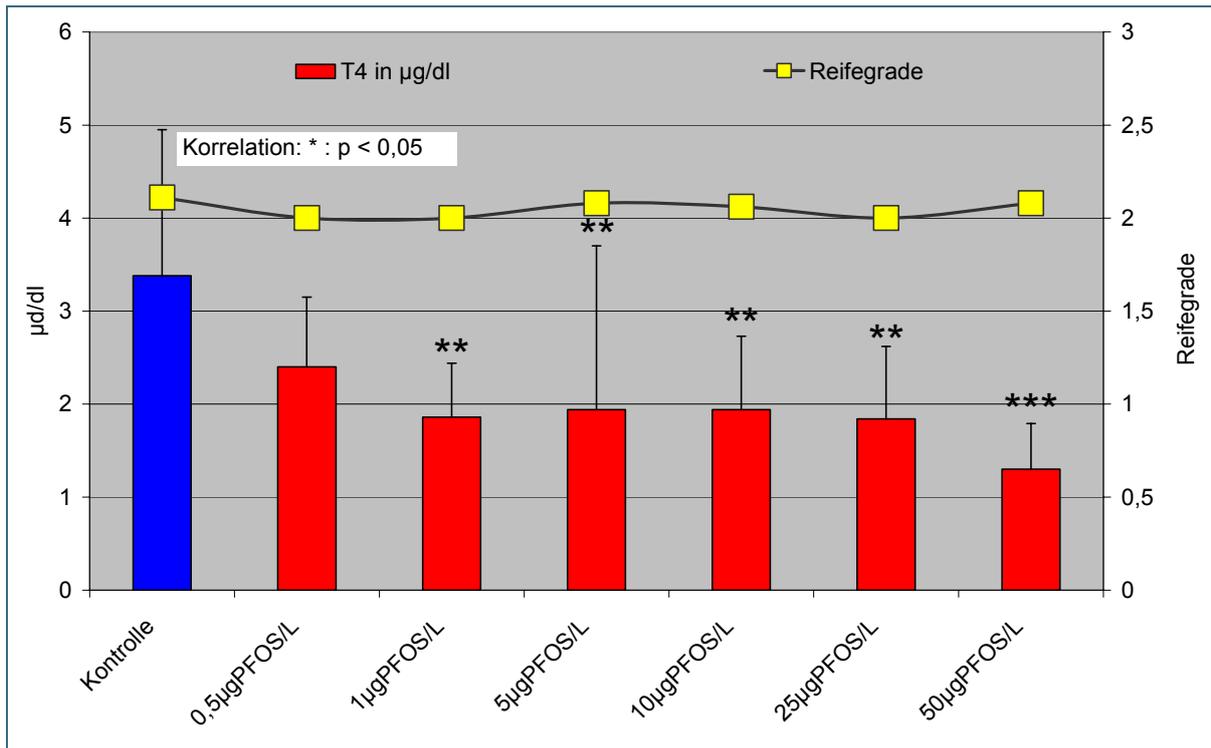


Abbildung 39: Konzentration von T4 (Thyroxin) im Plasma weiblicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g PFOS/L}$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

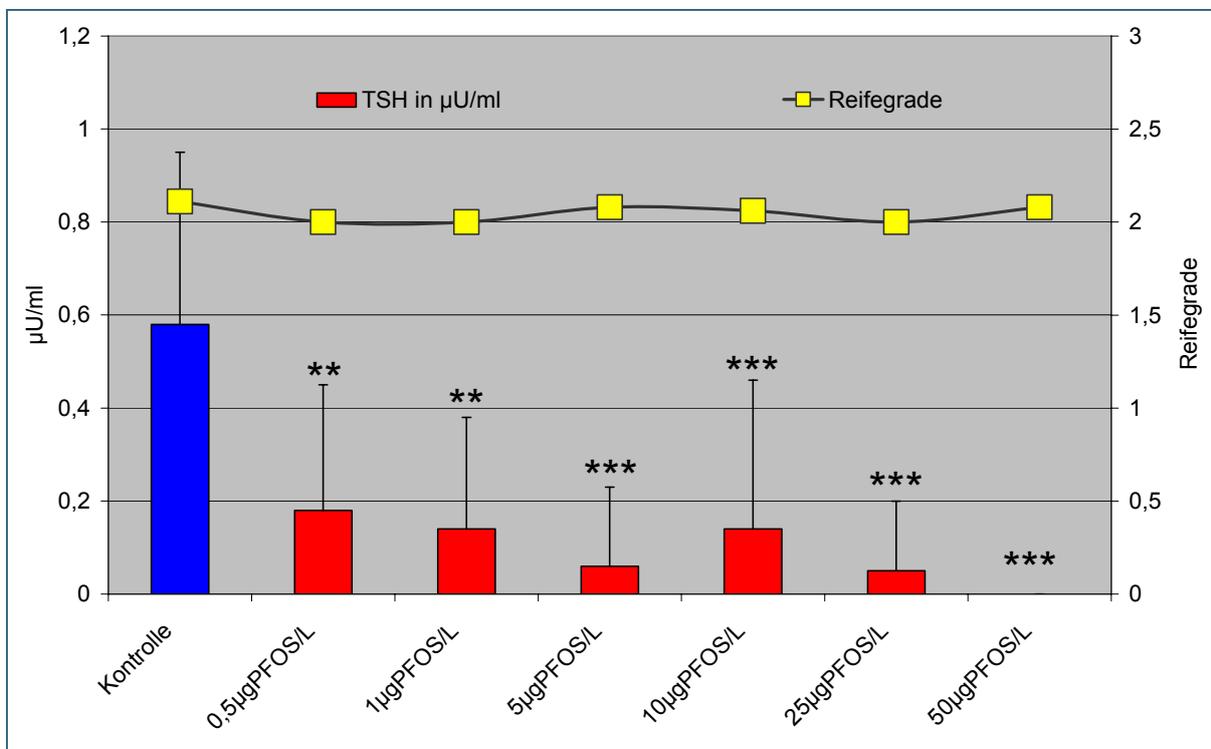


Abbildung 40: Konzentration von TSH (Thyreoida stimulierendes Hormon) im Plasma weiblicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Exposition in PFOS (Mittelwerte \pm Standardabweichung); *: Kontrolle versus 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 $\mu\text{g PFOS/L}$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

6 Diskussion

Der vorliegende Abschlussbericht fasst die Ergebnisse der Untersuchungen zur Fischtoxizität von PFOS (Perfluoroktansulfonsäure), eines aufgrund seiner chemischen Eigenschaften vielfach eingesetzten und mittlerweile weltweit in der belebten und unbelebten Umwelt verbreiteten perfluorierten Tensides zusammen. Für PFOS liegen bisher keine Daten aus Toxizitätsstudien an Fischen vor, die eine unter Umweltbedingungen vorliegende längerfristige Expositionssituation und das daraus resultierende Risiko abbilden. Ziel der Untersuchungen war eine Erarbeitung von adäquaten Expositions-Wirkungsdaten, um eine fundierte Risikoabschätzung und damit eine Festlegung von ökotoxikologisch begründeten Grenzwerten für Oberflächengewässer zu ermöglichen.

Die Studie gliederte sich in zwei Abschnitte. Im Rahmen eines ersten Expositionsversuches mit Regenbogenforellen kamen zur Erfassung PFOS-induzierter toxischer Wirkungen klassische, medizinisch-toxikologische Untersuchungsmethoden wie Hämatologie, klinische Chemie und Histopathologie zum Einsatz. Darüber hinaus wurden chemische Analysen zum Nachweis von PFOS-Rückständen in verschiedenen Fischorganen durchgeführt. Ein zweiter Expositionsversuch diente der Ermittlung potentieller endokriner Wirkungen von PFOS.

6.1 Toxische Wirkungen von PFOS

Zur Ermittlung möglicher fischtoxischer Wirkungen von PFOS wurden hämatologische Untersuchungen durchgeführt. Ausschließlich bei weiblichen Tieren, die der höchsten PFOS-Konzentration von 50 µg/L ausgesetzt waren, wurden dezente Veränderungen nachgewiesen. Neben einem Anstieg der Gesamterthrozytenzahl wurde eine Abnahme des mittleren Erythrozytenvolumens MCV (mean corpuscular volume) sowie des mittleren Hämoglobingehalts der Einzelerythrozyten MCH (mean corpuscular hemoglobin) beobachtet. Die Gesamthämoglobinkonzentration im Blut blieb dabei unverändert. Bei männlichen Fischen traten nach PFOS-Exposition keine hämatologischen Veränderungen auf. Die bei den weiblichen Fischen erhobenen Befunde sprechen für eine Beeinflussung der Erythrozyten durch PFOS. Der Anstieg der Gesamterthrozytenzahl stellt möglicherweise eine kompensatorische Reaktion auf einen verminderten Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (MCH) dar. Eine entsprechende Verminderung des MCH wurde auch bei Ratten nach oraler Applikation von PFOS nachgewiesen (Martin et al., 2007). Veränderungen der weißen Blutzellen im Sinne einer Vermehrung unsegmentierter neutrophiler Granulozyten, wie sie ebenfalls bei Ratten nach oraler Aufnahme von PFOS nachweisbar waren (Seacat et al., 2003), wurde in vorliegender Studie an Fischen nicht beobachtet.

Anhand klinisch-chemischer Analysen im Blut der Regenbogenforellen wurden unterschiedliche Reaktionsmuster der Leberenzyme auf eine Exposition mit PFOS festgestellt. Hinsichtlich der Enzyme Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Alkalische Phosphatase (AP) und Glutamat-Pyruvat-

Transaminase (GPT) wurde bei einem Teil der PFOS-exponierten Versuchsgruppen eine geringgradige Abnahme der Enzymaktivität im Blutplasma beobachtet. Im Zuge der Bewertung dieser Befunde gilt es zu berücksichtigen, dass eine Erhöhung dieser Enzyme von Bedeutung bei der Diagnose von Lebererkrankungen sein kann. Verminderungen der Enzymaktivität werden allgemein selten beobachtet und besitzen keine diagnostische Bedeutung. Das Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH), das im Falle einer Erhöhung ebenfalls als Indikator für Leberzellschäden dient, war bei PFOS-exponierten Fischen nicht verändert. Die Aktivität der γ -Glutamat-Transaminase (γ -GT) war unabhängig vom Geschlecht der Tiere in einzelnen PFOS-exponierten Versuchsgruppen erhöht. Eine Schädigung der Leber lässt sich aus diesem isolierten Befund nicht ableiten. In einer Studie an Ratten wurde nach oraler Gabe von PFOS oder PFOA keine Veränderungen der GPT bzw. AP beobachtet (Martin et al., 2007). Parallel durchgeführte Genexpressionsstudien lieferten jedoch Hinweise auf eine PFOS-induzierte Induktion AP- und GPT-spezifischer Gene. Nach Seacat et al. (2003) war bei männlichen Ratten nach Verabreichung von PFOS über das Futter ein Anstieg der GPT zu verzeichnen. Für Fische wurde eine Spezifität hinsichtlich einer Beeinflussung der Enzymaktivität der GPT durch PFOS beschrieben (Hoff et al., 2005a). Während bei Giebeln aus dem Freiland kein Zusammenhang zwischen der PFOS-Konzentration in der Leber und der GPT-Aktivität bestand, korrelierte dieses Enzym bei Karpfen und Aalen mit dem PFOS-Gehalt der Leber. Bei der Interpretation der Enzymbefunde gilt es zu berücksichtigen, dass die genannten Enzyme zudem hohen individuellen Schwankungen unterliegen (Scheinert & Hoffmann, 1987). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist davon auszugehen, dass PFOS in den verwendeten Konzentrationen und bei der gewählten Expositionsdauer keine nennenswerten Leberschäden bei Regenbogenforellen verursacht. Hierfür sprechen auch die histopathologischen Untersuchungen die - abgesehen von einer Glykogenspeicherung der Leber - keine pathologischen Leberveränderungen ergaben.

Weitere klinisch-chemische Untersuchungsergebnisse weisen auf eine Beeinflussung des Blutzuckerspiegels bei weiblichen Fischen hin. So war der Glukosegehalt mit Ausnahme der 5 $\mu\text{g/L}$ -Gruppe bereits ab einer Expositionskonzentration von 0,5 $\mu\text{g PFOS/L}$ signifikant vermindert. In der Literatur finden sich ebenfalls Hinweise auf eine PFOS-bedingte Störung der Regulation des Blutzuckerspiegels. So ermittelten Seacat et al. (2003) bei Sprague-Dawley Ratten nach oraler Verabreichung von PFOS verminderte Glukosespiegel im Blut. Nach Untersuchungen von Lin et al. (2008) waren erhöhte PFOS-Konzentrationen im menschlichen Blut mit einer erhöhten β -Zellaktivität in den Inselzellen der Bauchspeicheldrüse und damit erhöhten Insulinspiegeln und folglich verminderten Glukosespiegeln korreliert. Bei Zebrafischen wurde im Zusammenhang mit einer PFOS-Exposition eine erhöhte Genexpression von Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF) ermittelt (Shi et al., 2009). CRF vermittelt stress-bedingte Reaktionen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, indem es die Sekretion von Adrenokortikotropem Hormon (ACTH) in der Hypophyse und in der Folge von Adrenalin und Glukokortikoiden stimuliert (Mommsen et al., 1999). Es wird vermutet, dass CFR eine zweifache physiologische Rolle bei Fischen zukommt und sowohl in die Kontrolle der interrenalen als auch der thyroidalen Achse involviert ist (De Groef et al., 2006).

Neben der Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels ergaben sich auch Hinweise auf Verände-

rungen von Parametern des Proteinstoffwechsels durch PFOS. Bei weiblichen Fischen wurde bereits ab einer Konzentration von 0,5 µg PFOS/L eine deutliche Abnahme der Harnstoffkonzentration im Blut beobachtet. Eine Vermehrung des Gesamtproteingehaltes im Blut war sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren einzelner Versuchsgruppen nachweisbar. Der Kreatiningehalt war nur bei männlichen Fischen nach Exposition in 5 µg/L erhöht. Literaturangaben zu derartigen Veränderungen infolge einer PFOS-Einwirkung liegen nicht vor. Die genannten Parameter dienen in der labormedizinischen Diagnostik der Beurteilung der Nierenfunktion. Die Befunde sprechen gegen eine Einschränkung der Nierenfunktion, da in diesem Fall sowohl Harnstoff als auch Kreatinin erhöht wären. Dennoch kommt den Ergebnissen eine Bedeutung zu. So ist aufgrund der Befunde eine Beeinflussung des Proteinstoffwechsels im Sinne einer anabolen Stoffwechsellage nicht auszuschließen.

Der Triglyzeridgehalt im Blut war nur bei weiblichen Tieren, die 5 bzw. 50 µg PFOS/L ausgesetzt waren, deutlich reduziert. Es bestand somit keine Abhängigkeit zur Höhe der Expositionskonzentration oder zur Höhe der PFOS-Gehalte in der Leber. Andere Untersuchungen weisen auf eine Beeinflussung des Fettstoffwechsels durch PFOS hin. Hoff et al. (2005b) ermittelten bei Kohlmeisen eine negative Korrelation zwischen Serumlipidwerten und hohen PFOS-Gehalten der Leber. Die Ursachen wurden auf biochemischer Ebene in einer gesteigerten β -Oxidation der Fettsäuren sowie einer verminderten Lipoproteinsynthese vermutet (Haugom & Spydevold, 1992). Hinsichtlich der Cholesterin- und Bilirubinwerte wurden weder für männliche noch für weibliche PFOS-exponierte Fische Unterschiede zu den Kontrollindividuen ermittelt. Die Kalziumspiegel im Blut waren mit Ausnahme der 25 µg/L-Gruppe bei weiblichen Fischen aller Expositionsgruppen erhöht. Hoff et al. (2005a) ermittelten hingegen bei Wildfischen in Belgien eine negative Korrelation zwischen PFOS-Gehalten in der Leber und Kalziumkonzentrationen im Blut. Als Ursachen hierfür wurden eine durch PFOS gesteigerte Membranpermeabilität bzw. strukturelle Veränderungen des Kiemengewebes und ein damit einhergehender Elektrolytverlust diskutiert.

Die im Rahmen von Versuch I durchgeführten histopathologischen Untersuchungen ergaben ausschließlich im Bereich von Leber und Niere signifikante Unterschiede zwischen PFOS-exponierten Tieren und Kontrollindividuen. Im Bereich der anderen untersuchten Organe wurde für alle Gruppen ein vergleichbarer, geringer Schädigungsgrad ermittelt.

In der Leber beschränkten sich die Veränderungen auf eine deutliche Reduktion des Speicherstoffes Glykogen ab einer Expositionskonzentration von 10 µg PFOS/L. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Hagenaars et al. (2008) an Karpfen, die nach PFOS-Exposition ebenfalls eine Verminderung der Glykogendepots, begleitet von einer Verminderung des relativen Konditionsfaktors und des hepatosomatischen Index ergaben. Für einen PFOS-bedingten Einfluss auf den Energiehaushalt spricht auch die bereits in geringen PFOS-Konzentrationen nachgewiesene Abnahme der Glukosespiegel im Blut. In anderen Studien erwies sich die Leber als primäres Zielorgan toxischer PFOS-Wirkungen (Butenhoff et al., 2006; Seacat et al., 2003). Makroskopische Veränderungen umfassten eine Zunahme des Lebergewichtes und eine Schwellung des gesamten Organs bei Ratten bzw. Mäusen (Seacat et al., 2003; Yahia et al., 2008). Anhand histopathologischer Untersuchungen wurde eine

Hyperplasie von Leberzellen, verbunden mit einer zytoplasmatischen Vakuolisierung, diagnostiziert (Seacat et al., 2003). Eine Vakuolisierung von Leberzellen wurde auch bei Dickkopfelritzen und Zebrabärblingen nach Einwirkung von PFOS beschrieben (Ankley et al., 2005; Du et al., 2009). Bei Hühnerembryonen wurden ab einer Exposition in 1 µg PFOS/g Eigewicht periportale Entzündungen, Gallengangshyperplasien sowie Leberzellnekrosen nachgewiesen (Molina et al., 2006). Im Rahmen vorliegender Studie wurden derartige pathologische Leberveränderungen nicht beobachtet. Auch die bereits diskutierten klinisch-chemischen Befunde sprechen nicht für eine Schädigung des Leberparenchyms. Es ist zu vermuten, dass die eingesetzten PFOS-Konzentrationen zu gering waren, um derartige Veränderungen auszulösen.

Im Bereich der Niere wurde bei Tieren, die der höchsten Expositionskonzentration von 50 µg PFOS/L ausgesetzt waren, ein signifikant erhöhter Schädigungsgrad ermittelt. Dies beruht darauf, dass bei dieser Versuchsgruppe eine vermehrte Proteinspeicherung in den Nierentubuli zu beobachten war. Weitere, schwerwiegendere Nierenbefunde wurden nicht diagnostiziert. Literaturdaten zu möglichen Nierenveränderungen infolge einer Einwirkung von PFOS liegen nicht vor.

Die Rückstandsuntersuchungen ergaben ein deutliches Anreicherungspotential von PFOS und bestätigen damit die Ergebnisse anderer Autoren (Houde et al., 2006a; Martin et al., 2003a; Martin et al., 2004b; Sinclair & Kannan, 2006). Die höchsten Konzentrationen fanden sich in der Leber, gefolgt von Blut, Niere und Kiemen. In der Muskulatur waren generell die niedrigsten PFOS-Rückstände nachweisbar. Im Vergleich dazu ergab eine Studie an Dickkopfelritzen die höchste PFOS-Akkumulation im Blut, gefolgt von Leber und Gonadengewebe (Ankley et al., 2005). Die ermittelten Biokonzentrationsfaktoren (BCF) in vorliegender Studie lagen mit maximal 370 in der Leber am höchsten, insgesamt jedoch deutlich unter den in der Literatur angegebenen BCFs von 1100 (Fischkörper), 4300 (Blut) und 5400 (Leber) (Martin et al., 2003a). Untersuchungen an Aiteln aus einem französischen Fließgewässer ergaben BCFs von 158489 (Blutplasma), 19952 (Leber), 10000 (Kiemen), 10000 (Gonaden) sowie 2512 (Muskulatur) (Labadie & Chevreuil, 2011). Becker et al. (2010) ermittelten an Fischen aus dem Roten Main bei Bayreuth BCFs von 4600 (Aitel, Leber) bzw. 11000 (Gründling, Organpool) und damit erheblich höhere Werte als unter Laborbedingungen. Nach Becker et al. (2010) ist bei Fischen aus dem Freiland von einer Anreicherung von PFOS in der Leber um den Faktor 10^4 auszugehen. Dies deckt sich mit früheren Untersuchungsergebnissen des LfU (2008), denen zufolge z.B. in der Muskulatur von Fischen aus freien Gewässern eine deutlich höhere PFOS-Belastung vorlag als nach einer 4-wöchigen PFOS-Exposition unter Laborbedingungen, obwohl die jeweilige Wasserbelastung mit PFOS in etwa vergleichbar war. So wurden beispielsweise in Fischen aus dem Main bei Schweinfurt bei einer dort vorhandenen Belastung von 0,011 µg PFOS/L bis zu 57 µg PFOS/kg in der Muskulatur nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurden in vorliegender Laborstudie bei einer 28-tägigen Exposition in 0,5 µg PFOS/L nur 1,18 µg PFOS/kg in der Muskulatur ermittelt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die im Rahmen des Laborversuches gewählte Expositionsdauer von 28 Tagen zu kurz war, um eine vollständige Anreicherung von PFOS in den Fischgeweben zu erreichen, während unter Freilandbedingungen z.T. eine lebenslange Exposition stattfindet.

6.2 Endokrine Wirkungen von PFOS

In der Literatur finden sich neben zahlreichen Daten zu endokrinen Wirkungen von PFOS bei Menschen und Säugetieren (Gutshall et al., 1989; Lau et al., 2003; Luebker et al., 2005b; Martin et al., 2007; Thibodeaux et al., 2003) auch Hinweise auf eine Beeinflussung des Hormonsystems bei Fischen (Ankley et al., 2005; Du et al., 2009; Oakes et al., 2005; Shi et al., 2009).

Die vorliegenden Untersuchungen an Regenbogenforellen zu möglichen endokrinen Wirkungen von PFOS umfassten neben der Analyse von Sexual- und Schilddrüsenhormonen auch die histologische Bestimmung von Geschlecht und gonadalem Reifegrad. Diese Vorgehensweise ermöglichte eine Unterscheidung zwischen tatsächlichen, PFOS-induzierten Effekten auf der hormonellen Ebene und augenscheinlich hormonellen Veränderungen, die in Wirklichkeit nur den individuellen Reifegrad der Versuchstiere und den dadurch bedingten Hormonstatus widerspiegeln. Ein Vergleich der Ergebnisse mit den vorhandenen Literaturdaten führt z.T. zu einer unterschiedlichen Bewertung der endokrinen Wirksamkeit von PFOS. In keiner der bisher veröffentlichten Studien wurden jedoch die ermittelten Hormonspiegel im Blut mit dem Grad der Geschlechtsreife korreliert. Insbesondere bei der Interpretation von Sexualhormonspiegeln hat sich jedoch gezeigt, dass diese Vorgehensweise unverzichtbar ist, um eindeutig zwischen PFOS-bedingten Veränderungen und natürlichen hormonellen Schwankungen zu unterscheiden.

Die im Rahmen der aktuellen Studie durchgeführten histologischen Untersuchungen lieferten keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Gonadenreife bei männlichen und weiblichen Versuchsfischen durch eine 4-wöchige PFOS-Exposition.

Die Ergebnisse der Hormonanalysen sprechen jedoch für eine Beeinflussung verschiedener hormoneller Regelkreise bei Regenbogenforellen.

Im Hinblick auf die Sexualhormone wurden PFOS-bedingte Veränderungen ausschließlich bei weiblichen Tieren beobachtet. Bei diesen war die Konzentration von Testosteron im Blut bereits nach Exposition in 0,5 µg PFOS/L statistisch signifikant erhöht. Ab einer PFOS-Konzentration von 1 µg/L wurde darüber hinaus ein deutlicher Anstieg von 11-keto-Testosteron beobachtet. Es wurden keine Korrelationen zwischen der Höhe der Hormonspiegel und dem gonadalen Reifegrad ermittelt, sodass die Veränderungen eindeutig auf eine Einwirkung von PFOS zurückgeführt werden können. Auch hinsichtlich der 17β-Estradiolwerte wurden bei einzelnen PFOS-exponierten Gruppen Unterschiede zu den Kontrolltieren ermittelt. Aufgrund der Tatsache, dass die 17β-Estradiolwerte jedoch sehr stark mit dem gonadalen Reifegrad der weiblichen Versuchs- und Kontrolltiere korrelierten und damit den Entwicklungszustand der Einzelindividuen widerspiegeln, werden die beobachteten Schwankungen der Blutspiegel von 17β-Estradiol nicht als PFOS-induzierte Effekte interpretiert. Neben den Hormonanalysen erfolgte eine Bestimmung von Vitellogenin im Blut. Vitellogenin stellt einen Eiweißstoff dar, der natürlicherweise unter Estrogeneinfluss aber auch nach Einwirkung estrogen wirksamer Umweltchemikalien als Vorläufers des Dottersackproteins gebildet wird. Vitellogenin wird deshalb weitläufig als

Biomarker für eine Einwirkung estrogener Stoffe eingesetzt (Schwaiger & Negele, 1998). Die Bestimmung von Vitellogenin im Blut ergab bei weiblichen Fischen einzelnen PFOS-exponierter Versuchsgruppen ebenfalls Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe. Auch für die Vitellogeninwerte wurde eine hohe Korrelation zum gonadalen Reifegrad der Tiere ermittelt. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse sprechen demnach gegen eine PFOS-bedingte Beeinflussung der Vitellogeninsynthese und damit gegen eine estrogene Wirksamkeit von PFOS.

Bei männlichen Regenbogenforellen wurden hinsichtlich der Sexualhormonspiegel keine Veränderungen beobachtet, die auf eine Einwirkung von PFOS zurückgeführt werden können. Die Konzentrationen von Testosteron im Blut waren bei PFOS-exponierten Fischen und Kontrolltieren vergleichbar. Die Blutspiegel von 11-keto-Testosteron waren zwar nach Einwirkung von 5, 10 und 50 µg PFOS/L gegenüber Kontrollwerten erhöht. Aber auch diese erhöhten Werte stellen keine PFOS-induzierten Effekte dar, sondern korrelieren eng mit dem Grad der individuellen Geschlechtsentwicklung. Die Konzentration von 17β-Estradiol war ausschließlich bei Tieren, die 5 µg PFOS/L ausgesetzt war, signifikant gegenüber Kontrollwerten vermindert. In allen anderen Versuchsgruppen wiesen die Fische den Kontrolltieren vergleichbare Werte auf, sodass auch im Hinblick auf 17β-Estradiol nicht von einer signifikanten Beeinflussung durch PFOS ausgegangen werden kann. PFOS hatte keinen Einfluss auf die Vitellogeninsynthese bei männlichen Tieren.

In der Literatur finden sich experimentell ermittelte Daten zu einer Beeinflussung von Sexualhormonspiegeln bei verschiedenen Fischarten. In der Regel wurden die Untersuchungen an Aquarienfischarten wie Dickkopfelritze (Ankley et al., 2005; Oakes et al., 2005) oder Zebraabärbling (Du et al., 2009) durchgeführt. Insgesamt ergeben die veröffentlichten Daten kein einheitliches Bild hinsichtlich PFOS-induzierter Veränderungen der Hormonspiegel. Die Untersuchungsergebnisse variierten je nach eingesetzter Fischart, Geschlecht und Alter bzw. Entwicklungsstadium der Testtiere. Die in den Studien eingesetzten Testkonzentrationen lagen meist über den in vorliegender Studie verwendeten PFOS-Konzentrationen, sodass ein Vergleich der Daten nur bedingt möglich ist.

Ein Anstieg von Testosteron, wie aktuell an weiblichen Regenbogenforellen ermittelt, wurde auch bei juvenilen weiblichen Dickkopfelritzen beobachtet. 11-keto-Testosteron war bei juvenilen und adulten weiblichen Individuen erhöht (Oakes et al., 2005). Andere Untersuchungen an adulten Dickkopfelritzen ergaben nach PFOS-Exposition nur bei männlichen Individuen erhöhte Konzentrationen von Testosteron und 11-Ketotestosteron im Blut, während weibliche Tiere keine Veränderungen erkennen ließen. Die männlichen Versuchsfische wiesen zudem eine verminderte Aromatase-Aktivität im Gehirn auf, die nach Ansicht der Autoren in ursächlichem Zusammenhang mit den erhöhten Hormonspiegeln stehen könnte (Ankley et al., 2005). Im Gegensatz zu den aktuellen, an Regenbogen ermittelten Untersuchungsergebnissen, die gegen eine Beeinflussung der Hormonspiegel von 17β-Estradiol sprechen, wurde bei adulten weiblichen Dickkopfelritzen sowie juvenilen Tieren beiderlei Geschlechts ein Anstieg dieses Hormons nachgewiesen (Oakes et al., 2005). Als mögliche Ursachen für erhöhte Sexualhormonspiegel v.a. nach Exposition in niedrigen PFOS-Konzentrationen wurden eine Stimulation der Steroidsynthese sowie eine Verminderung von Steroidabbauvorgängen diskutiert (Ankley et al.,

2005; Oakes et al., 2005). Im Gegensatz zu Regenbogenforellen waren somit bei Dickkopfelritzen auch männliche Individuen von Veränderungen der Sexualhormonspiegel betroffen.

Bezüglich einer möglichen Beeinflussung des Biomarkers Vitellogenin durch PFOS liegen in der Literatur ebenfalls widersprüchliche Daten vor. Wie bei Regenbogenforellen in vorliegender Studie wurde nach Angaben von Ankley et al. (2005) auch bei männlichen und weiblichen Dickkopfelritzen die Konzentration von Vitellogenin im Blut nicht beeinflusst. Nach Oakes et al. (2005) führte eine PFOS-Exposition bei juvenilen Dickkopfelritzen beiderlei Geschlechts hingegen zu einer Erhöhung des Vitellogeninspiegels. Eine Induktion der Vitellogeninsynthese und damit eine estrogene Wirksamkeit von PFOS ergaben auch Genexpressionsstudien an der Leber von Zebrabärblingen (Du et al., 2009) sowie *in vitro* Studien an primären Leberzellkulturen männlicher Tilapien (*Oreochromis niloticus*) (Liu et al., 2007).

Neben einer Beeinflussung der Sexualhormone sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine Beeinflussung der Schilddrüsenhormone. Auch hiervon waren die weiblichen Fische deutlich stärker betroffen als die männlichen Individuen. So waren die Blutspiegel von T4 (Thyroxin) ab einer PFOS-Konzentration von 1 µg/L bei allen Versuchsgruppen deutlich verringert. Die Blutgehalte an TSH (Thyreoida stimulierendes Hormon) lagen bereits ab einer PFOS-Konzentration von 0,5 µg/L deutlich unter den Kontrollwerten. Hingegen wurden hinsichtlich der Konzentrationen von T3 (Trijodthyronin) im Blut keine Veränderungen nachgewiesen, die auf eine Einwirkung von PFOS zurückzuführen sind.

Bei männlichen Versuchsfischen lagen die Gehalte an TSH im Blut der Fische, vergleichbar den weiblichen Tieren, bereits ab einer Einwirkung von 0,5 µg PFOS/L deutlich unter den Kontrollwerten. Hingegen wurden bezüglich der Blutspiegel von T3 und T4 keine Veränderungen nachgewiesen, die auf eine Einwirkung von PFOS zurückzuführen sind. Unabhängig vom Geschlecht der Tiere wurden hinsichtlich der Schilddrüsenhormone keine Korrelationen zwischen der Höhe der Hormonspiegel und dem gonadalen Reifegrad ermittelt.

Effekte auf den thyreotropen Regelkreis bei Fischen durch PFOS wurden bereits von Shi et al. (2009) beschrieben. So ergaben Untersuchungen an Embryonen des Zebrabärblings Veränderungen der Genexpression bestimmter Enzyme der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse. Unter anderem wurde eine Erhöhung der Genexpression von Dio1 (mikrosomale Typ I Iodothyronin Deiodinase) nachgewiesen, einem Enzym, das die Umwandlung von T4 zu T3 katalysiert. Dies wurde begleitet von einer Zunahme von T3 in den Fischkörpern, während die Werte für T4 unverändert blieben. Hieraus wurde gefolgert, dass PFOS zu einer Störung des Gleichgewichtes der Schilddrüsenhormone führt, ohne dass eine Adaption und Autoregulation über die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse erfolgt. Bei Ratten wurde nach oraler Verabreichung von PFOS eine signifikante Abnahme von T3 und T4 (Lau et al., 2003; Martin et al., 2007) im Blutserum ermittelt. Ein eigentlich aufgrund einer Feedback-Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse zu erwartender Anstieg von TSH blieb aus (Lau et al., 2003; Martin et al., 2007). Als mögliche Ursache für Störungen der Schilddrüsenhormonspiegel wurden eine Verdrängung der Schilddrüsenhormone von ihren Transportproteinen

(Gutshall et al., 1989) und eine Veränderung des Schilddrüsenhormonmetabolismus diskutiert (Martin et al., 2007).

Fazit

Die vorliegende Studie zur Erfassung längerfristiger toxischer Auswirkungen von PFOS auf Fische wurde durchgeführt, um eine fundierte Risikoabschätzung und damit eine Festlegung von ökotoxikologisch begründeten Grenzwerten für Oberflächengewässer zu ermöglichen. Bisher wurde auf der Basis vorhandener, an Vertretern unterschiedlicher Trophiestufen ermittelter Toxizitätsdaten zum Schutz aquatischer Lebensgemeinschaften eine vorläufige PNEC (Predicted no effect concentration) für PFOS von 2 µg/L festgelegt.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigen das hohe Akkumulationspotential von PFOS und weisen auf eine Beeinflussung der Fischgesundheit durch die Substanz hin. Akut toxische Wirkungen oder schwerwiegende histopathologische Organveränderungen wurden in den geprüften Konzentrationsbereichen nicht beobachtet. Erste hämatologische und histopathologische Effekte traten erst nach Exposition in relativ hohen PFOS-Konzentrationen auf, denen keine Umweltrelevanz zukommt. Jedoch wurden bereits in niedrigen Testkonzentrationen Veränderungen beobachtet, die auf eine Beeinflussung hormoneller Regelkreise durch PFOS hinweisen. Von den Veränderungen waren in erster Linie weibliche Individuen betroffen. Bereits ab einer Expositionskonzentration von 0,5 µg PFOS/L war eine Beeinflussung des Geschlechtshormonsystems sowie des thyroidalen hormonellen Regelkreises nachweisbar. Zudem wurden in diesem Konzentrationsbereich Veränderungen einzelner klinisch-chemischer Parameter diagnostiziert, die möglicherweise für eine Beeinflussung des Kohlenhydrat- bzw. des Proteinstoffwechsels sprechen. Aufgrund dessen, dass in der niedrigsten getesteten Konzentration noch Effekte nachweisbar waren, ist von einer NOEC (no observed effect concentration) für PFOS von < 0,5 PFOS µg/L auszugehen. Somit ist durch die vorläufig für PFOS abgeleitete PNEC von 2 µg/L kein ausreichender Schutz für aquatische Organismen gewährleistet.

Die Befunde dürfen nicht isoliert betrachtet werden. So gilt es bei der Interpretation zu berücksichtigen, dass zwischen dem interrenalen und dem thyroidalen hormonellen Regelkreis (De Groef et al., 2006) sowie zwischen dem thyroidalen Hormonsystem und der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (Mukhi et al., 2007) enge Wechselwirkungen bestehen. Eine Beeinflussung der physiologischen Reproduktions- und Wachstumsvorgänge bei Fischen durch die beobachteten Veränderungen des hormonellen Gleichgewichtes sind nicht auszuschließen. Vor dem Hintergrund, dass neueste epidemiologische Untersuchungen auf eine Beeinflussung der Fruchtbarkeit beim Menschen durch PFOS hinweisen (Fei et al., 2009), erscheint es angezeigt, die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zu möglichen endokrinen Effekten bei Fischen um Studien zur Reproduktionstoxizität zu ergänzen. Literaturdaten weisen auf eine Beeinflussung der Eireife bzw. Eiablage bei Fischen hin (Ankley et al., 2005; Du et al., 2009). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den in der aktuellen Studie ermittelten hormonellen Effekten und potentiellen Störungen reproduktionsbiologischer Parameter zu erfassen, ist die Durchführung einer Mehr-Generationen-Studie an Fischen notwendig.

7 Literaturverzeichnis

3M. (2000). Phase-out Plan for PFOS-based Products. Submitted to U.S. EPA July 7, 2000.

3M. (2001). Comments of 3m on OECD's September 2001'draft assessment of perfluorooctane sulfonate and its salts', 3M, St. Paul, Minnesota, United States of America.

ANDERSEN, M. E., BUTENHOFF, J. L., CHANG, S. C., FARRAR, D. G., KENNEDY, G. L., JR., LAU, C., OLSEN, G. W., SEED, J. & WALLACE, K. B. (2008). Perfluoroalkyl acids and related chemistries--toxicokinetics and modes of action. *Toxicol Sci*, 102(1), 3-14.

ANKLEY, G. T., KUEHL, D. W., KAHL, M. D., JENSEN, K. M., LINNUM, A., LEINO, R. L. & VILLENEUVET, D. A. (2005). Reproductive and developmental toxicity and bioconcentration of perfluorooctanesulfonate in a partial life-cycle test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem*, 24(9), 2316-2324.

APELBERG, B. J., WITTER, F. R., HERBSTMAN, J. B., CALAFAT, A. M., HALDEN, R. U., NEEDHAM, L. L. & GOLDMAN, L. R. (2007). Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to weight and size at birth. *Environ Health Perspect*, 115(11), 1670-1676.

BECKER, A. M., GERSTMANN, S. & FRANK, H. (2008a). Perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate in the sediment of the Roter Main river, Bayreuth, Germany. *Environ Pollut*, 156(3), 818-820.

BECKER, A. M., GERSTMANN, S. & FRANK, H. (2008b). Perfluorooctane surfactants in waste waters, the major source of river pollution. *Chemosphere*, 72(1), 115-121.

BECKER, A. M., GERSTMANN, S. & FRANK, H. (2010). Perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate in two fish species collected from the Roter Main River, Bayreuth, Germany. *Bull Environ Contam Toxicol*, 84(1), 132-135.

BERGER, U., JÄRNBERG, U. & KALLENBORN, R. (2004). Perfluorinated alkylated substances (PFAS) in the European Nordic environment. *Organohalogen Compounds*, 66, 4046-4052.

BOSSI, R., RIGET, F. F. & DIETZ, R. (2005a). Temporal and spatial trends of perfluorinated compounds in ringed seal (*Phoca hispida*) from Greenland. *Environ Sci Technol*, 39(19), 7416-

7422.

- BOSSI, R., RIGET, F. F., DIETZ, R., SONNE, C., FAUSER, P., DAM, M. & VORKAMP, K. (2005b). Preliminary screening of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and other fluorochemicals in fish, birds and marine mammals from Greenland and the Faroe Islands. *Environ Pollut*, 136(2), 323-329.
- BOSSI, R., STRAND, J., SORTKJAER, O. & LARSEN, M. M. (2008). Perfluoroalkyl compounds in Danish wastewater treatment plants and aquatic environments. *Environ Int*, 34(4), 443-450.
- BOUDREAU, T. M., SIBLEY, P. K., MABURY, S. A., MUIR, D. G. & SOLOMON, K. R. (2003). Laboratory evaluation of the toxicity of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Lemna gibba*, *Daphnia magna*, and *Daphnia pulex*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 44(3), 307-313.
- BOULANGER, B., VARGO, J., SCHNOOR, J. L. & HORNBUCKLE, K. C. (2004). Detection of perfluorooctane surfactants in Great Lakes water. *Environ Sci Technol*, 38(15), 4064-4070.
- BOULANGER, B., VARGO, J. D., SCHNOOR, J. L. & HORNBUCKLE, K. C. (2005). Evaluation of perfluorooctane surfactants in a wastewater treatment system and in a commercial surface protection product. *Environ Sci Technol*, 39(15), 5524-5530.
- BUTENHOFF, J. L., OLSEN, G. W. & PFAHLES-HUTCHENS, A. (2006). The applicability of biomonitoring data for perfluorooctanesulfonate to the environmental public health continuum. *Environ Health Perspect*, 114(11), 1776-1782.
- D'EON, J. C., HURLEY, M. D., WALLINGTON, T. J. & MABURY, S. A. (2006). Atmospheric chemistry of N-methyl perfluorobutane sulfonamidoethanol, C₄F₉SO₂N(CH₃)CH₂CH₂OH: kinetics and mechanism of reaction with OH. *Environ Sci Technol*, 40(6), 1862-1868.
- DE GROEF, B., VAN DER GEYTEN, S., DARRAS, V. M. & KÜHN, E. R. (2006). Role of corticotropin-releasing hormone as a thyrotropin-releasing factor in non-mammalian vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 146(1), 62-68.
- DE SILVA, A. O. & MABURY, S. A. (2004). Isolating isomers of perfluorocarboxylates in polar bears (*Ursus maritimus*) from two geographical locations. *Environ Sci Technol*, 38(24), 6538-6545.
- DEAN, W. P., JESSUP, D. C., THOMPSON, G., ROMIG, G. & POWELL, D. (1978). Fluorad fluoro-

- chemical surfactant FC-95 acute oral toxicity (LD50) study in rats. 137-083. International Research and Development Corporation. (zitiert in OECD, 2002).
- DENK, H., KÜNZLE, H., PLENK, H., RÜSCHOFF, J. & SELLNER, W. (1989). Romeis - Mikroskopische Technik. 17. Auflage.
- DIMITROV, S., KAMENSKA, V., WALKER, J. D., WINDLE, W., PURDY, R., LEWIS, M. & MEKENYAN, O. (2004). Predicting the biodegradation products of perfluorinated chemicals using CATABOL. SAR QSAR Environ Res, 15(1), 69-82.
- DROTTAR, K. R. & KRUEGER, H. O. (2000a). PFOS: A 96-hr static acute toxicity test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). In EPA Docket AR226-0083, vol. Ltd. Project No. 454-102 (ed. W. International).
- DROTTAR, K. R. & KRUEGER, H. O. (2000b). PFOS: A early life-stage toxicity test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). In EPA Docket AR226-0097, vol. Ltd. Project No. 454-108 (ed. W. International).
- DU, Y., SHI, X., LIU, C., YU, K. & ZHOU, B. (2009). Chronic effects of water-borne PFOS exposure on growth, survival and hepatotoxicity in zebrafish: a partial life-cycle test. Chemosphere, 74(5), 723-729.
- ENVIRONMENT AGENCY. (2004). Environmental risk evaluation report: Perfluorooctanesulphonate (PFOS). UK Environment Agency, Chemicals Assessment Section. Feb. 2004.
- ENVIRONMENT CANADA. (2006). Ecological Screening Assessment Report on Perfluorooctane Sulfonate, Its Salts and Its Precursors that Contain the C8F17SO2, C8F17SO3 or C8F17SO2N Moiety. http://www.ec.gc.ca/CEPARRegistry/documents/subs_list/PFOS_SAR/PFOS_P10.cfm.
- ERA, S., HARADA, K. H., TOYOSHIMA, M., INOUE, K., MINATA, M., SAITO, N., TAKIGAWA, T., SHIOTA, K. & KOIZUMI, A. (2009). Cleft palate caused by perfluorooctane sulfonate is caused mainly by extrinsic factors. Toxicology, 256(1-2), 42-47.
- EU-SCHER. (2004). Opinion on the RPA's report "Perfluorooctane sulfonates risk reduction strategy and analysis of advantages and drawbacks".
- EU. (2006). Richtlinie 2006/122/EG des Europäischen Parlaments und Rates vom 12. Dezember 2006; Abl. L 372 vom 27. Dezember 2006, S. 32.

- FALANDYSZ, J., TANIYASU, S., GULKOWSKA, A., YAMASHITA, N. & SCHULTE-OEHLMANN, U. (2006). Is fish a major source of fluorinated surfactants and repellents in humans living on the Baltic Coast? *Environ Sci Technol*, 40(3), 748-751.
- FEI, C., MCLAUGHLIN, J. K., LIPWORTH, L. & OLSEN, J. (2009). Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Hum Reprod*.
- FROMME, H., MIDASCH, O., TWARDDELLA, D., ANGERER, J., BOEHMER, S. & LIEBL, B. (2007). Occurrence of perfluorinated substances in an adult German population in southern Bavaria. *Int Arch Occup Environ Health*, 80(4), 313-319.
- FROMME, H., TITTEMIER, S. A., VOLKEL, W., WILHELM, M. & TWARDDELLA, D. (2008). Perfluorinated compounds - Exposure assessment for the general population in western countries. *Int J Hyg Environ Health*.
- GIESY, J. P. & KANNAN, K. (2001a). Accumulation of perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in fish tissues. Prepared for 3M, StPaul. US EPA. Administrative Record AR-226-1030a156. .
- GIESY, J. P. & KANNAN, K. (2001b). Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ Sci Technol*, 35(7), 1339-1342.
- GRUBER, L., SCHLUMMER, M., UNGEWISS, J., WOLZ, G., MÜLLER, A., WEISE, N. & FROMME, H. (2007). Analysis of sub-ppb levels of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonate (PFOS) in food and fish.
- GUTSHALL, D. M., PILCHER, G. D. & LANGLEY, A. E. (1989). Mechanism of the serum thyroid hormone lowering effect of perfluoro-n-decanoic acid (PFDA) in rats. *J Toxicol Environ Health*, 28(1), 53-65.
- HAGENAARS, A., KNAPEN, D., MEYER, I. J., VAN DER VEN, K., HOFF, P. & DE COEN, W. (2008). Toxicity evaluation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat Toxicol*, 88(3), 155-163.
- HANSEN, K. J., JOHNSON, H. O., ELDRIDGE, J. S., BUTENHOFF, J. L. & DICK, L. A. (2002). Quantitative characterization of trace levels of PFOS and PFOA in the Tennessee River. *Environ Sci Technol*, 36(8), 1681-1685.

- HARADA, K., INOUE, K., MORIKAWA, A., YOSHINAGA, T., SAITO, N. & KOIZUMI, A. (2005). Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion, vol. 99, pp. 253-261. Elsevier.
- HAUGHOM, B. & SPYDEVOLD, O. (1992). The mechanism underlying the hypolipemic effect of perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulphonic acid (PFOSA) and clofibrilic acid. *Biochim Biophys Acta*, 1128(1), 65-72.
- HOFF, P. T., SCHEIRS, J., VAN DE VIJVER, K., VAN DONGEN, W., ESMANS, E. L., BLUST, R. & DE COEN, W. (2004). Biochemical effect evaluation of perfluorooctane sulfonic acid-contaminated wood mice (*Apodemus sylvaticus*). *Environ Health Perspect*, 112(6), 681-686.
- HOFF, P. T., VAN CAMPENHOUT, K., VAN DE VIJVER, K., COVACI, A., BERVOETS, L., MOENS, L., HUYSKENS, G., GOEMANS, G., BELPAIRE, C., BLUST, R. & DE COEN, W. (2005a). Perfluorooctane sulfonic acid and organohalogen pollutants in liver of three freshwater fish species in Flanders (Belgium): relationships with biochemical and organismal effects. *Environ Pollut*, 137(2), 324-333.
- HOFF, P. T., VAN DE VIJVER, K., DAUWE, T., COVACI, A., MAERVOET, J., EENS, M., BLUST, R. & DE COEN, W. (2005b). Evaluation of biochemical effects related to perfluorooctane sulfonic acid exposure in organohalogen-contaminated great tit (*Parus major*) and blue tit (*Parus caeruleus*) nestlings. *Chemosphere*, 61(11), 1558-1569.
- HOFF, P. T., VAN DONGEN, W., ESMANS, E. L., BLUST, R. & DE COEN, W. M. (2003). Evaluation of the toxicological effects of perfluorooctane sulfonic acid in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat Toxicol*, 62(4), 349-359.
- HOUDE, M., BUJAS, T. A., SMALL, J., WELLS, R. S., FAIR, P. A., BOSSART, G. D., SOLOMON, K. R. & MUIR, D. C. (2006a). Biomagnification of perfluoroalkyl compounds in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) food web. *Environ Sci Technol*, 40(13), 4138-4144.
- HOUDE, M., CZUB, G., SMALL, J. M., BACKUS, S., WANG, X., ALAEE, M. & MUIR, D. C. G. (2008). Fractionation and Bioaccumulation of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) Isomers in a Lake Ontario Food Web, vol. 42, pp. 9397-9403.
- HOUDE, M., MARTIN, J. W., LETCHER, R. J., SOLOMON, K. R. & MUIR, D. C. (2006b). Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environ Sci Technol*, 40(11), 3463-3473.

- INOUE, K., OKADA, F., ITO, R., KATO, S., SASAKI, S., NAKAJIMA, S., UNO, A., SAIJO, Y., SATA, F., YOSHIMURA, Y., KISHI, R. & NAKAZAWA, H. (2004). Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environ Health Perspect*, 112(11), 1204-1207.
- JERNBRO, S., ROCHA, P. S., KEITER, S., SKUTLAREK, D., FARBER, H., JONES, P. D., GIESY, J. P., HOLLERT, H. & ENGWALL, M. (2007). Perfluorooctane sulfonate increases the genotoxicity of cyclophosphamide in the micronucleus assay with V79 cells. Further proof of alterations in cell membrane properties caused by PFOS. *Environ Sci Pollut Res Int*, 14(2), 85-87.
- JOHNSON, J., GIBSON, S. & OBER, R. (1979). Extent and route of excretion and tissue distribution of total carbon-14 in rats after a single i.v. dose of FC-95-14C. Riker Laboratories, Inc. St Paul, MN, US EPA Administrative Record, 8EHQ-1180-00374.
- JOHNSON, J. D., GIBSON, S. J. & OBER, R. E. (1984). Cholestyramine-enhanced fecal elimination of carbon-14 in rats after administration of ammonium [14C]perfluorooctanoate or potassium [14C]perfluorooctanesulfonate. *Fundam Appl Toxicol*, 4(6), 972-976.
- JOHNSON, R., WOLF, J. & BRAUNBECK, T. (2009). Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology of Fish Gonads (ed. OECD).
- JONES, P. D., HU, W., DE COEN, W., NEWSTED, J. L. & GIESY, J. P. (2003). Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins. *Environ Toxicol Chem*, 22(11), 2639-2649.
- KALLENBORN, R., BERGER, U., JÄRNBERG, U., DAM, M., GLESNE, O., HEDLUND, B., HIRVI, J. P., LUNDGREN, A., MOGENSEN, B. B. & SIGURDSSON, A. S. (2004). Perfluorinated alkylated substances (PFAS) in the Nordic environment. <http://www.norden.org/pub/miljo/miljo/sk/2004-552.pdf>. Nordisk Ministerråd.
- KANNAN, K., CHOI, J. W., ISEKI, N., SENTHILKUMAR, K., KIM, D. H. & GIESY, J. P. (2002a). Concentrations of perfluorinated acids in livers of birds from Japan and Korea. *Chemosphere*, 49(3), 225-231.
- KANNAN, K., CORSOLINI, S., FALANDYSZ, J., FILLMANN, G., KUMAR, K. S., LOGANATHAN, B. G., MOHD, M. A., OLIVERO, J., VAN WOUWE, N., YANG, J. H. & ALDOUST, K. M. (2004). Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries. *Environ Sci Technol*, 38(17), 4489-4495.

- KANNAN, K., CORSOLINI, S., FALANDYSZ, J., OEHME, G., FOCARDI, S. & GIESY, J. P. (2002b). Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in marine mammals, fishes, and birds from coasts of the Baltic and the Mediterranean Seas. *Environ Sci Technol*, 36(15), 3210-3216.
- KANNAN, K., KOISTINEN, J., BECKMEN, K., EVANS, T., GORZELANY, J. F., HANSEN, K. J., JONES, P. D., HELLE, E., NYMAN, M. & GIESY, J. P. (2001). Accumulation of perfluorooctane sulfonate in marine mammals. *Environ Sci Technol*, 35(8), 1593-1598.
- KANNAN, K., NEWSTED, J., HALBROOK, R. S. & GIESY, J. P. (2002c). Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in mink and river otters from the United States. *Environ Sci Technol*, 36(12), 2566-2571.
- KÄRRMAN, A., MUELLER, J. F., VAN BAVEL, B., HARDEN, F., TOMS, L. M. & LINDSTROM, G. (2006). Levels of 12 perfluorinated chemicals in pooled Australian serum, collected 2002-2003, in relation to age, gender, and region. *Environ Sci Technol*, 40(12), 3742-3748.
- KLAUNIG, J. E., BABICH, M. A., BAETCKE, K. P., COOK, J. C., CORTON, J. C., DAVID, R. M., DELUCA, J. G., LAI, D. Y., MCKEE, R. H., PETERS, J. M., ROBERTS, R. A. & FENNER-CRISP, P. A. (2003). PPAR α agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance. *Crit Rev Toxicol*, 33(6), 655-780.
- KUKLENYIK, Z., REICH, J. A., TULLY, J. S., NEEDHAM, L. L. & CALAFAT, A. M. (2004). Automated solid-phase extraction and measurement of perfluorinated organic acids and amides in human serum and milk. *Environ Sci Technol*, 38(13), 3698-3704.
- LABADIE, P. & CHEVREUIL, M. (2011). Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). *Environ Pollut*, 159(2), 391-397.
- LAU, C., ANITOLE, K., HODES, C., LAI, D., PFAHLES-HUTCHENS, A. & SEED, J. (2007). Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol Sci*, 99(2), 366-394.
- LAU, C., BUTENHOFF, J. L. & ROGERS, J. M. (2004). The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. *Toxicol Appl Pharmacol*, 198(2), 231-241.
- LAU, C., THIBODEAUX, J. R., HANSON, R. G., ROGERS, J. M., GREY, B. E., STANTON, M. E., BUTENHOFF, J. L. & STEVENSON, L. A. (2003). Exposure to perfluorooctane sulfonate dur-

- ing pregnancy in rat and mouse. II: postnatal evaluation. *Toxicol Sci*, 74(2), 382-392.
- LAWA. (2009). LAWA-Ausschuss „Grundwasser und Wasserversorgung“: Abwasseruntersuchungen in NRW. in: PFT-Belastung in Grundwasser und Oberflächengewässern Deutschlands – Datenzusammenstellung aus den Bundesländern – Entwurf zur Abstimmung auf der 57-Sitzung des LAWA-AG und mit dem Obmann des LAWA-AO. (nicht veröffentlicht).
- LEHMLER, H. J. (2005). Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants--a review. *Chemosphere*, 58(11), 1471-1496.
- LFU. (2006). Perfluorierte Tenside – PFT. Ergebnisse der Untersuchung von Kläranlagenabläufen. http://www.lfu.bayern.de/analytik_stoffe/fachinformationen/analytik_org_stoffe_perfluorierte_tenside/index.htm.
- LFU. (2008). Untersuchungen zu Perfluoroktansäure (PFOA) und Perfluoroktansulfonsäure (PFOS) in Fischen und Muscheln aus bayerischen Flüssen. Abschlussbericht zum Sonderuntersuchungsprogramm PFT im Rahmen der Technischen Gewässeraufsicht. http://www.lfu.bayern.de/analytik_stoffe/analytik_org_stoffe_perfluorierte_chemikalien/doc/ergebnisse_fischuntersuchungen_fliessgewaesser.pdf.
- LFU. (2009). Untersuchungen von Kläranlagenabläufen und korrespondierenden Oberflächengewässern bei Kläranlagen mit auffälligen Gehalten von perfluorierten Verbindungen im Klärschlamm. (nicht veröffentlicht).
- LFU. (2010). Bestimmung persistenter, bioakkumulierender Perfluoralkylverbindungen in verschiedenen Umweltproben. www.lfu.bayern.de/analytik_stoffe/analytik_org_stoffe_perfluorierte_chemikalien/pft/index.htm.
- LGL. (2006). Umweltmedizinische Bedeutung Perfluorierter Kohlenwasserstoffe (PFC). <http://www.lgl.bayern.de/publikationen/index.htm#umwelt>.
- LIN, C. Y., CHEN, P. C., LIN, Y. C. & LIN, L. Y. (2008). Association Among Serum Perfluoroalkyl Chemicals, Glucose Homeostasis and Metabolic Syndrome in Adolescents and Adults. *Diabetes Care*.
- LIU, C., DU, Y. & ZHOU, B. (2007). Evaluation of estrogenic activities and mechanism of action of perfluorinated chemicals determined by vitellogenin induction in primary cultured tilapia hepatocytes. *Aquat Toxicol*, 85(4), 267-277.

- LOGANATHAN, B. G., SAJWAN, K. S., SINCLAIR, E., SENTHIL KUMAR, K. & KANNAN, K. (2007). Perfluoroalkyl sulfonates and perfluorocarboxylates in two wastewater treatment facilities in Kentucky and Georgia. *Water Res*, 41(20), 4611-4620.
- LUEBKER, D. J., CASE, M. T., YORK, R. G., MOORE, J. A., HANSEN, K. J. & BUTENHOFF, J. L. (2005a). Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats. *Toxicology*, 215(1-2), 126-148.
- LUEBKER, D. J., YORK, R. G., HANSEN, K. J., MOORE, J. A. & BUTENHOFF, J. L. (2005b). Neonatal mortality from in utero exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in Sprague-Dawley rats: dose-response, and biochemical and pharmacokinetic parameters. *Toxicology*, 215(1-2), 149-169.
- MACDONALD, M. M., WARNE, A. L., STOCK, N. L., MABURY, S. A., SOLOMON, K. R. & SIBLEY, P. K. (2004). Toxicity of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid to *Chironomus tentans*. *Environ Toxicol Chem*, 23(9), 2116-2123.
- MARTIN, J. W., MABURY, S. A., SOLOMON, K. R. & MUIR, D. C. (2003a). Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem*, 22(1), 196-204.
- MARTIN, J. W., MABURY, S. A., SOLOMON, K. R. & MUIR, D. C. (2003b). Dietary accumulation of perfluorinated acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem*, 22(1), 189-195.
- MARTIN, J. W., SMITHWICK, M. M., BRAUNE, B. M., HOEKSTRA, P. F., MUIR, D. C. & MABURY, S. A. (2004a). Identification of long-chain perfluorinated acids in biota from the Canadian Arctic. *Environ Sci Technol*, 38(2), 373-380.
- MARTIN, J. W., WHITTLE, D. M., MUIR, D. C. & MABURY, S. A. (2004b). Perfluoroalkyl contaminants in a food web from Lake Ontario. *Environ Sci Technol*, 38(20), 5379-5385.
- MARTIN, M. T., BRENNAN, R. J., HU, W., AYANOGLU, E., LAU, C., REN, H., WOOD, C. R., CORTON, J. C., KAVLOCK, R. J. & DIX, D. J. (2007). Toxicogenomic study of triazole fungicides and perfluoroalkyl acids in rat livers predicts toxicity and categorizes chemicals based on mechanisms of toxicity. *Toxicol Sci*, 97(2), 595-613.
- MIDASCH, O., DREXLER, H., HART, N., BECKMANN, M. W. & ANGERER, J. (2007). Transplacental

- exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health*, 80(7), 643-648.
- MIDASCH, O., SCHETTGEN, T. & ANGERER, J. (2006). Pilot study on the perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate exposure of the German general population. *Int J Hyg Environ Health*, 209(6), 489-496.
- MOLINA, E. D., BALANDER, R., FITZGERALD, S. D., GIESY, J. P., KANNAN, K., MITCHELL, R. & BURSIA, S. J. (2006). Effects of air cell injection of perfluorooctane sulfonate before incubation on development of the white leghorn chicken (*Gallus domesticus*) embryo. *Environ Toxicol Chem*, 25(1), 227-232.
- MOMMSEN, T. P., MATHILAKATH, M. V. & MOON, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, 211-268.
- MOODY, C. A., MARTIN, J. W., KWAN, W. C., MUIR, D. C. & MABURY, S. A. (2002). Monitoring perfluorinated surfactants in biota and surface water samples following an accidental release of fire-fighting foam into Etobicoke Creek. *Environ Sci Technol*, 36(4), 545-551.
- MORIKAWA, A., KAMEI, N., HARADA, K., INOUE, K., YOSHINAGA, T., SAITO, N. & KOIZUMI, A. (2006). The bioconcentration factor of perfluorooctane sulfonate is significantly larger than that of perfluorooctanoate in wild turtles (*Trachemys scripta elegans* and *Chinemys reevesii*): an Aii river ecological study in Japan. *Ecotoxicol Environ Saf*, 65(1), 14-21.
- MORIWAKI, H., TAKATAH, Y. & ARAKAWA, R. (2003). Concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in vacuum cleaner dust collected in Japanese homes. *J Environ Monit*, 5(5), 753-757.
- MUKHI, S., TORRES, L. & PATINO, R. (2007). Effects of larval-juvenile treatment with perchlorate and co-treatment with thyroxine on zebrafish sex ratios. *Gen Comp Endocrinol*, 150(3), 486-494.
- NAKAYAMA, S., STRYNAR, M. J., HELFANT, L., EGEHY, P., YE, X. & LINDSTROM, A. B. (2007). Perfluorinated compounds in the Cape Fear Drainage Basin in North Carolina. *Environ Sci Technol*, 41(15), 5271-5276.
- NATT, M. P., AND C. A. HERRICK. (1952). A new diluent for counting the erythrocytes and leukocytes

- of the chicken. *Poultry Science*, 31, 735-737.
- NEWSTED, J. L., GIESY, J. P. & COADY, K. (2004). Avian toxicity reference values (TRVs), predicted no effect concentrations (PNECs) and water quality criteria for perfluorooctane sulfonate (PFOS). Project No. 178401; 3M Co.: St. Paul, MN, March 2004.
- NOKER, P. & GORMAN, G. (2003). A pharmacokinetic study of potassium perfluorooctanesulfonate in the cynomolgus monkey. Southern Research Institute, Birmingham, Alabama., Southern Research Institute Study ID: 9921.6.
- OAKES, K. D., SIBLEY, P. K., MARTIN, J. W., MACLEAN, D. D., SOLOMON, K. R., MABURY, S. A. & VAN DER KRAAK, G. J. (2005). Short-term exposures of fish to perfluorooctane sulfonate: acute effects on fatty acyl-coa oxidase activity, oxidative stress, and circulating sex steroids. *Environ Toxicol Chem*, 24(5), 1172-1181.
- OECD. (1984). OECD Guideline 204 for testing chemicals - "Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study" (ed. OECD).
- OECD. (2002). Hazard Assessment of Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its Salts. ENV/JM/RD(2002)17/FINAL. Paris.
- OECD. (2005). Results of survey on production and use of PFOS, PFAS and PFOA, related substances and products/ mixtures containing these substances. ENV/JM/MONO(2005)1. Paris.
- OLSEN, G. W., BURRIS, J. M., EHRESMAN, D. J., FROEHLICH, J. W., SEACAT, A. M., BUTENHOFF, J. L. & ZOBEL, L. R. (2007). Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect*, 115(9), 1298-1305.
- OLSEN, G. W., CHURCH, T. R., MILLER, J. P., BURRIS, J. M., HANSEN, K. J., LUNDBERG, J. K., ARMITAGE, J. B., HERRON, R. M., MEDHDIZADEHKASHI, Z., NOBILETTI, J. B., O'NEILL, E. M., MANDEL, J. H. & ZOBEL, L. R. (2003a). Perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in the serum of American Red Cross adult blood donors. *Environ Health Perspect*, 111(16), 1892-1901.
- OLSEN, G. W., HANSEN, K. J., STEVENSON, L. A., BURRIS, J. M. & MANDEL, J. H. (2003b). Human donor liver and serum concentrations of perfluorooctanesulfonate and other perfluorochemicals. *Environ Sci Technol*, 37(5), 888-891.

- PABEL, U., WÖLFLE, D., LAHRSEN-WIEDERHOLT, M. & LAMPEN, A. (2008). Toxikologie der Perfluorooctansäure (PFOA) und der Perfluorooctansulfonsäure (PFOS). Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin. *J. Verbr. Lebensm.* 3 (2008): 252 – 258.
- PREVEDOUROS, K., COUSINS, I. T., BUCK, R. C. & KORZENIOWSKI, S. H. (2006). Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environ Sci Technol*, 40(1), 32-44.
- RHOADS, K. R., JANSSEN, E. M., LUTHY, R. G. & CRIDDLE, C. S. (2008). Aerobic biotransformation and fate of N-ethyl perfluorooctane sulfonamidoethanol (N-EtFOSE) in activated sludge. *Environ Sci Technol*, 42(8), 2873-2878.
- RIKZ. (2002). Perfluoroalkylated substances. Aquatic environmental assessment. Report RIKZ/2002.043, 1.7.2002.
- ROBERTSON, J. C. (1986). Potential for environmental impact of AFA-6 surfactant. In EPA Docket AR226-1030a043 (ed. O. Beak Consultants Ltd. Missassauga, Canada).
- RPA. (2004). Risk reduction strategy and analysis of advantages and drawbacks for perfluorooctane sulfonate (PFOS). Final report prepared for DEFRA. London, UK.
- SCHEINERT, P. & HOFFMANN, R. (1987). [Qualitative and quantitative distribution of 7 enzymes in organs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) and the carp (*Cyprinus carpio*)]. *Zentralbl Veterinarmed A*, 34(5), 339-343.
- SCHULTZ, M. M., HIGGINS, C. P., HUSET, C. A., LUTHY, R. G., BAROFSKY, D. F. & FIELD, J. A. (2006). Fluorochemical mass flows in a municipal wastewater treatment facility. *Environ Sci Technol*, 40(23), 7350-7357.
- SCHWAIGER, J. & NEGELE, R. D. (1998). Plasma vitellogenin. A blood parameter to evaluate exposure of fish to xenoestrogens. *ACTA VETERINARIA BRNO*, 67(4), 257-264.
- SEACAT, A. M., THOMFORD, P. J., HANSEN, K. J., CLEMEN, L. A., ELDRIDGE, S. R., ELCOMBE, C. R. & BUTENHOFF, J. L. (2003). Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctane-sulfonate in rats. *Toxicology*, 183(1-3), 117-131.
- SEACAT, A. M., THOMFORD, P. J., HANSEN, K. J., OLSEN, G. W., CASE, M. T. & BUTENHOFF, J. L. (2002). Subchronic toxicity studies on perfluorooctanesulfonate potassium salt in cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci*, 68(1), 249-264.

- SHI, X., LIU, C., WU, G. & ZHOU, B. (2009). Waterborne exposure to PFOS causes disruption of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish larvae. *Chemosphere*, 77(7), 1010-1018.
- SHOEIB, M., HARNER, T., LEE, S. C., LANE, D. & ZHU, J. (2008). Sorbent-impregnated polyurethane foam disk for passive air sampling of volatile fluorinated chemicals. *Anal Chem*, 80(3), 675-682.
- SINCLAIR, E. & KANNAN, K. (2006). Mass loading and fate of perfluoroalkyl surfactants in wastewater treatment plants. *Environ Sci Technol*, 40(5), 1408-1414.
- SINCLAIR, E. & TANIYASU, S. (2004). Perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate in Michigan and New York waters. *Organohalogen Compounds*, 66, 4069-4073.
- SKUTLAREK, D., EXNER, M. & FARBER, H. (2006). Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters. *Environ Sci Pollut Res Int*, 13(5), 299-307.
- SO, M. K., TANIYASU, S., YAMASHITA, N., GIESY, J. P., ZHENG, J., FANG, Z., IM, S. H. & LAM, P. K. (2004). Perfluorinated compounds in coastal waters of Hong Kong, South China, and Korea. *Environ Sci Technol*, 38(15), 4056-4063.
- STOCK, N. L., FURDUI, V. I., MUIR, D. C. & MABURY, S. A. (2007). Perfluoroalkyl contaminants in the Canadian Arctic: evidence of atmospheric transport and local contamination. *Environ Sci Technol*, 41(10), 3529-3536.
- STRYNAR, M. J. & LINDSTROM, A. B. (2008). Perfluorinated compounds in house dust from Ohio and North Carolina, USA. *Environ Sci Technol*, 42(10), 3751-3756.
- SUCHENWIRTH, R. H. R., JÜRLING, H., R, H. & BÜCKING, M. (2006). Perfluorierte Alkyl-Substanzen (PFAS) in der Muttermilch. Ergebnisse und vorläufige Bewertungen einer Pilotstudie des Nds. Landesgesundheitsamtes.
<http://www.nlga.niedersachsen.de/servlets/download?C=23217451&L=20>.
- TANIYASU, S., KANNAN, K., HORII, Y., HANARI, N. & YAMASHITA, N. (2003). A survey of perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated organic compounds in water, fish, birds, and humans from Japan. *Environ Sci Technol*, 37(12), 2634-2639.
- TAO, L., KANNAN, K., KAJIWARA, N., COSTA, M. M., FILLMANN, G., TAKAHASHI, S. & TANABE, S. (2006). Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in albatrosses, elephant

- seals, penguins, and polar skuas from the Southern Ocean. *Environ Sci Technol*, 40(24), 7642-7648.
- THIBODEAUX, J. R., HANSON, R. G., ROGERS, J. M., GREY, B. E., BARBEE, B. D., RICHARDS, J. H., BUTENHOFF, J. L., STEVENSON, L. A. & LAU, C. (2003). Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I: maternal and prenatal evaluations. *Toxicol Sci*, 74(2), 369-381.
- THOMFORD, P. J., SEACAT, A.M., AND BUTTENHOFF, J.L. (2002). Terminal observations in Sprague Dawley rats after lifetime dietary exposure to N-ethylperfluorooctanesulfonamido ethanol (abstract). *Toxicological Sciences*, 66, 185-186.
- TITTEMIER, S. A., PEPPER, K., SEYMOUR, C., MOISEY, J., BRONSON, R., CAO, X. L. & DABEKA, R. W. (2007). Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packaging. *J Agric Food Chem*, 55(8), 3203-3210.
- TOMY, G. T., TITTEMIER, S. A., PALACE, V. P., BUDAKOWSKI, W. R., BRAEKEVELT, E., BRINKWORTH, L. & FRIESEN, K. (2004). Biotransformation of N-ethyl perfluorooctanesulfonamide by rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) liver microsomes. *Environ Sci Technol*, 38(3), 758-762.
- TRUDEL, D., HOROWITZ, L., WORMUTH, M., SCHERINGER, M., COUSINS, I. T. & HUNGERBUHLER, K. (2008). Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA. *Risk Anal*, 28(2), 251-269.
- UBA. (2006). Entwicklung und Validierung einer Methode zur Bestimmung von polyfluorierten organischen Substanzen in Meerwasser, Sedimenten und Biota; Untersuchungen zum Vorkommen dieser Schadstoffe in der Nord- und Ostsee. UBA-Forschungsbericht 202 22 213. <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/3319.pdf>.
- UMWELTMINISTERIUM NRW. (2008). Konzentrationen perfluorierter Verbindungen („PFT“) im Blutplasma von Anglern am Möhnesee. http://www.umwelt.nrw.de/umwelt/pdf/angler_pdf.pdf.
- UNEP. (2006). Risk profile on perfluorooctane sulfonate. Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its second meeting. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. <http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/poprc2/UNEP-POPS-POPRC.2-17-Add.5.English.PDF>.

- UNEP. (2008a). Consideration of new information on perfluorooctane sulfonate (PFOS). Annex II. Submission by China. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. <http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/poprc4/UNEP-POPS-POPRC.4-INF-17.English.PDF>.
- UNEP. (2008b). Addendum to the risk management evaluation of perfluorooctane sulfonate. Report of the Persistent Organic Pollutants Committee on the work of its fourth meeting. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. <http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/poprc4/UNEP-POPS-POPRC.4-15-Add.6.English.PDF>.
- US-EPA. (2002). Revised draft hazard assessment of perfluorooctanoic acid and its salts. Office of Pollution Prevention and Toxics, Risk Assessment Division. Washington, DC. 4. November 2002.
- VANDEN HEUVEL, J. P., KUSLIKIS, B. I., VAN RAFELGHEM, M. J. & PETERSON, R. E. (1991). Tissue distribution, metabolism, and elimination of perfluorooctanoic acid in male and female rats. *J Biochem Toxicol*, 6(2), 83-92.
- XU, L., KRENITSKY, D. M., SEACAT, A. M., BUTENHOFF, J. L. & ANDERS, M. W. (2004). Biotransformation of N-ethyl-N-(2-hydroxyethyl)perfluorooctanesulfonamide by rat liver microsomes, cytosol, and slices and by expressed rat and human cytochromes P450. *Chem Res Toxicol*, 17(6), 767-775.
- YAHIA, D., TSUKUBA, C., YOSHIDA, M., SATO, I. & TSUDA, S. (2008). Neonatal death of mice treated with perfluorooctane sulfonate. *J Toxicol Sci*, 33(2), 219-226.
- YAMASHITA, N., KANNAN, K., TANIYASU, S., HORII, Y., PETRICK, G. & GAMO, T. (2005). A global survey of perfluorinated acids in oceans. *Mar Pollut Bull*, 51(8-12), 658-668.
- YEUNG, L. W., SO, M. K., JIANG, G., TANIYASU, S., YAMASHITA, N., SONG, M., WU, Y., LI, J., GIESY, J. P., GURUGE, K. S. & LAM, P. K. (2006). Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood samples from China. *Environ Sci Technol*, 40(3), 715-720.
- YOUNG, C. J., FURDUI, V. I., FRANKLIN, J., KOERNER, R. M., MUIR, D. C. & MABURY, S. A. (2007). Perfluorinated acids in Arctic snow: new evidence for atmospheric formation. *Environ Sci Technol*, 41(10), 3455-3461.

