Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

BfG
Bundesanstalt für Gewässerkunde

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Einfluss der endokrinen Disruptoren Bisphenol A und Bisphenol S auf das Verhalten des Modelorganismus *Caenorhabditis elegans*

Bachelorarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science
im Studiengang Umwelttechnik
vorgelegt von

John Vincent Anthon

[redacted]

1. Prüfer: Prof. Dr. Carolin Floeter (HAW Hamburg)
2. Prüfer: Dr. Fenske (BfG)

—

in Zusammenarbeit mit der
Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz

—

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich recht herzlich all den Menschen danken, die stets an mich geglaubt haben und mich motiviert haben, weiterzumachen, sei es im Studium oder auch bei dieser Bachelorarbeit: Dazu zähle ich meine Eltern, meinen kleinen Bruder, meine Freunde und auch die Professoren, Dozenten sowie die Betreuerinnen dieser Arbeit. Auch wenn es mal hart war, habt ihr mich stets ermutigt, nicht aufzugeben.

Dank dir, Caro, für Deine ständige Unterstützung, dass Du trotz vieler Aktivitäten immer Zeit für mich gefunden hast und vielen Dank für die Vermittlung von sehr vielen interessanten Inhalten. Diese waren nicht zuletzt der Anlass, mich ausgiebig mit endokrinen Disruptoren beschäftigen zu wollen. Es war schön mit Dir zusammenzuarbeiten.

Dank dir, Martina, dass Du mich so spontan in der BfG willkommen geheißen hast. Du warst immer eine wunderbare sowie konstruktive Gesprächspartnerin. Vielen Dank für all die guten Ratschläge.

Und nicht zuletzt möchte ich mich herzlich bei Sophie bedanken: Nicht nur, dass du mich in all die Laborarbeiten eingearbeitet hast, sondern du hast mir auch immer gute Laune bereitet. Es war mir eine Freude, dass Du mich bei der praktischen Tätigkeit begleitet hast.

Last, but not least danke ich dem gesamten Referat G3 Biochemie, Ökotoxikologie von der BfG dafür, wie herzlich ihr mich aufgenommen habt und mir Tipps, wann immer es nötig war, gegeben habt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Zudem ist die Arbeit lediglich durch die von mir geführte Literatur und unter Verwendung der angegeben Hilfsmitteln angefertigt worden. Bei Verstoß weiß ich von der Aberkennung des Titels.

_____ Hamburg, den 30.09.2024

John Vincent Anthon

Zusammenfassung

Trotz bestehender und zukünftiger Verordnungen der Europäischen Kommission zur Reduzierung von Bisphenol A-Emissionen werden andere Bisphenole, wie Bisphenol S, zunehmend in der Umwelt nachgewiesen. Viele dieser Bisphenol-A-Alternativen erweisen sich als sogenannte „bedauerliche Substitutionen“ (*regrettable substitutions*), da sie ähnliche problematische Eigenschaften aufweisen. Daher ist es entscheidend, potenzielle Substitute auf ihre endokrin disruptiven und neurotoxischen Wirkungen umfassend zu überprüfen, damit ihr Gefahrpotential (*„Hazard Potential“*) eingeschätzt werden kann.

Dafür ist die Entwicklung sensibler Testverfahren notwendig. Der Nematode *Caenorhabditis elegans* scheint dabei aufgrund des großen Spektrums an Hormonrezeptoren, seiner frequenten Lokomotion, der einfachen Handhabung und des anerkannten Umgangs in der Laborpraxis ein geeigneter Testorganismus zu sein. Dazu bietet der Verhaltensparameter als Endpunkt die Möglichkeit, die Sensibilität zu gewährleisten, weil bereits geringere Konzentrationen eingesetzt werden können, um einen messbaren Effekt zu erkennen.

Entsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit die Anzahl der Kopfbewegungen (*„head thrashes“*) als Lokomotions- und Vitalitätsparameter sowie als zusätzlicher Parameter die Körperlänge von *C. elegans* bei Exposition zu BPA und BPS analysiert. Während viele Studien einen Rückgang in Körperlänge und Kopfbewegungen nachweisen, liefert diese Arbeit komplexere Ergebnisse.

Außerdem soll untersucht werden, ob *C. elegans* die nötigen Gene besitzt, um die Wirkung von endokrinen Disruptoren sowie neurotoxischen Schadstoffen nachweisen zu können.

Zudem werden Ansätze zur automatisierten Lokomotionsauswertung der *head thrashes* mithilfe von Python vorgestellt.

Abstract

Despite existing and future European Commission regulations to reduce bisphenol A emissions, other bisphenols, such as bisphenol S, are increasingly being detected in the environment. Many of these bisphenol A alternatives turn out to be regrettable substitutions, as they have similar problematic properties. It is therefore crucial to test potential substitutes for their endocrine disrupting and neurotoxic effects so that their hazard potential can be assessed.

To investigate these bisphenols and endocrine disruptors, the development of more sensitive test methods is necessary. The nematode Caenorhabditis elegans and a test method with a behavioral parameter offer a promising option.

This requires the development of sensitive test methods. The nematode Caenorhabditis elegans appears to be a suitable test organism due to its large spectrum of hormone receptors, its simple handling and its recognized handling in laboratory practice. In addition, the behavioral parameter as an endpoint offers the possibility of ensuring sensitivity, because even low concentrations can have an effect on behavior.

Accordingly, the present study analyzed the number of head thrashes as a locomotion and vitality parameter and, as an additional parameter, the body length for *C. elegans* being exposed to BPA and BPS. While many studies show a decrease in body length and head movements, this study provides more complex results. In addition, it will be investigated whether *C. elegans* possesses the necessary genes to detect the effects of endocrine disruptors and neurotoxic pollutants.

In addition, approaches for automated locomotion analysis of head thrashes using Python will be presented.

Inhaltsverzeichnis

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VIII

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS IX

III. TABELLENVERZEICHNIS XI

1. Einleitung - 1 -

1.1. Endokrine Disruptoren - 1 -

1.2. Auswirkung endokriner Disruptoren auf Nahrungsnetze - 2 -

1.3. Verhalten als Parameter in Testverfahren bei endokrinen Disruptoren - 4 -

1.4. Bisphenol A (BPA) - 6 -

1.5. Bisphenol S (BPS) - 7 -

1.6. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit - 8 -

2. Theoretische Grundlagen und Stand der Technik und Wissenschaft - 8 -

2.1. Caenorhabditits elegans in der Forschung - 8 -

2.1.1. Das neuroendokrine System von C. elegans - 10 -

2.1.2. Die verschiedenen Verhaltensparameter von C. elegans - 11 -

2.2. Wirkungen von BPA und BPS auf *C. elegans* - 12 -

3. Material und Methoden - 15 -

3.1. Zucht der *C. elegans*-Nematoden - 15 -

3.1.1. Reagenziensop - 15 -

3.1.2. Futterkultur E. coli - 16 -

3.1.3. Aufrechterhaltung der C. elegans-Kulturen - 17 -

3.1.4. Gerätschaften für C. elegans- und E. coli-Kulturerneuerungen - 18 -

3.1.5. - 18 -

3.2. Versuchsdurchführung - 18 -

3.2.1. Direkte Testvorbereitung - 18 -

3.2.2. Auswahl der Konzentrationen - 19 -

3.2.3. Mastermixgemische - 20 -

3.2.4. Einsetzen der Fadenwürmer in 96-Well-Platte - 21 -

3.2.5. Zugabe der Mastermix-Gemische - 21 -

3.2.6. Expositionsdauer - 21 -
3.2.7. Screening mit Leica-Mikroskop-Apparat - 21 -
3.2.8. Gerätschaften zum Testverfahren - 22 -
3.3. Testauswertung - 22 -
3.3.1. Längen - 22 -
3.3.2. Head thrashes - 23 -
3.4. Statistische Analyse - 27 -
3.4.1. Signifikanz-Analysen - 27 -

4. Ergebnisse - 28 -
4.1. Körperlängen - 28 -
4.1.1. Test Nr. 1: BPA-Test - 28 -
4.1.2. Test Nr. 2: BPS-Test mit geringeren Konzentrationen - 29 -
4.1.3. Test Nr. 3: BPS mit maximaler Konzentration - 30 -
4.2. Head thrashes - 31 -
4.2.1. Durch manuelles Zählen - 31 -
4.2.2. Automatisierte *Head-thrashes*-Auswertung - 36 -

5. Diskussion - 43 -
5.1. Einordnung der Ergebnisse - 43 -
5.1.1. Längenvarianz - 43 -
5.1.2. *Head thrashes* - 44 -
5.2. Auswertung mittels Python-Programm - 46 -
5.3. Sonstige Beobachtungen - 48 -
5.4. Fehlerursachen - 48 -
5.4.1. Systematische Fehlerquellen - 49 -
5.4.2. Statistische Fehlerquellen - 50 -
5.5. Zusammenfassung der Ergebnisse - 51 -

6. Fazit - 52 -

IV. ANHANG XIV

1. Programmtext zur Extraktion eines Frames als Bild XIV

2. Codes zur Durchführung des YOLOv8-Trainings XV

3. Programmtext zum Zählen der Kopfbewegungen XVI

4. Statistische Auswertungen XVIII

4.1. Längensignifikanzen XVIII

4.1.1. BPA-Test XVIII

4.1.2. 1. BPS-Test XVIII

4.1.3. 2. BPS-Test: Maximale BPS-Konzentration XVIII

4.2. Signifikanzen bei den *head thrashes* XXI

4.2.1. BPA-Test XXI

4.2.2. 1. BPS-Test mit mehreren Konzentrationen XXII

4.2.3. 2. BPS-Test mit maximaler Konzentration XXIII

LITERATURVERZEICHNIS XXV

I. Abkürzungsverzeichnis

ADE = *Anterior Deirid Neurons*

ADF = *Amphid Distal Fascicle*

ASO = *Amphid Socket*

BfG = Bundesanstalt für Gewässerkunde

BPA = Bisphenol A

BPS = Bisphenol S

DAF = Gen der Kategorie „Verharrung“ (*„**Da**uer **F**ormation“*)

FAU = *Formazine Attenuation Unit*

GABA = *γ*-Aminobuttersäure

HNF4-α = *Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha*

KEQ = Kopferkennungsquote

KI = Künstliche Intelligenz

MC = Motorneuron C

NC = *„Negative Control“*

NHR = Gen der Kategorie Nukleärer Hormonrezeptor (*“**N**uclear **H**ormone **R**eceptor*”)

OD = Optische Dichte

PDE = *Posterior Deirid Neurons*

qPCR = quantitative Echtzeit-PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

T3 = Triiodthyronin

T4 = Thyroxin/Tetraiodthyronin

TierSchG = Tierschutzgesetz

TPU = *Tensor Processing Unit*

TSH = *thyroid stimulating hormone*

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von 4,4'-isopropylidenediphenol/BPA (a) im Vergleich mit der Strukturformel von Strukturformel von 4,4'-Sulfonyldiphenol/BPS (b) (Schöpel et al. 2016) ..... - 7 -
Abbildung 2: Anzahl der head thrashes nach Aussetzung gegenüber BPS nach 48 h (McDonough et al. 2021)..... - 13 -
Abbildung 3 (A&B) und (C&D): Auswertung der Körperlänge und head thrashes nach 24 und nach 72 Stunden BPA-Exposition (A&B) (Zhou et al. 2016) sowie nach 72 Stunden Exposition gegenüber BPS (C&D) (Zhou 2018) ..... - 14 -
Abbildung 4: Sterilbank und eine standardmäßige Anordnung der Reagenzien sowie Gerätschaften für die Nematodenkulturaufrechterhaltung ..... - 17 -
Abbildung 5: Die verschiedenen Ausschläge der Kopfbewegungen von C. elegans (Zhang et al. 2022) - 23 -
Abbildung 6: Darstellung von C. elegans Verdauungstrakt inklusive der Pharynx (Cohen und Sundaram 2020)..... - 23 -
Abbildung 7: Programmausschnitt für Zugang durch Colab/Python zum Google-Drive-Konto..... - 24 -
Abbildung 9: YAML-Datei als YOLOv8-Algorithmus-Anleitung, welche Ordnerpfade für Training und welche Klassen für welches Label zu wählen sind (Felipe T. 2023a, 2023b) ..... - 25 -
Abbildung 8: Label-Text-Datei erstellt auf cvat.ai..... - 25 -
*Abbildung 10: Die durchschnittliche Körperlänge nach BPA-Exposition - *signifikant (p<0,05); **hoch signifikant (p<0,01); ***höchst signifikant (p<0,001)*..... - 28 -
Abbildung 11: Längenverteilungen der verschiedenen BPA-Konzentrationsgruppen sortiert nach der Länge (y-Achsenbeschriftung fehlt!) Erläuterung des Box-Whisker-Plots: X = ; Box = , Whisker =) (bitte auch bei weiteren Grafiken anpassen) ..... - 29 -
Abbildung 12: Durchschnittslängen von C. elegans bei geringeren BPS-Konzentrationen ..... - 30 -
Abbildung 13: Längenverteilungen der BPS-Konzentrationsgruppen ..... - 30 -
*Abbildung 14 a) und b): a) Die durchschnittliche Länge nach hoher BPS-Exposition – *signifikant (p<0,05); **hoch signifikant (p<0,01); ***höchst signifikant (p<0,001)* ..... - 31 -
Abbildung 15: Die Head-thrash-Anzahl im Vergleich beim BPA-Test - Dabei sind signifikant: bei allen head thrashes: A-B (**), A-C (*), A-D (*); bei großen head thrashes: a-b (*), a-c (*) ..... - 32 -
Abbildung 16: BPA-Test: Verteilung der Gesamtanzahl an head thrashes ..... - 33 -
Abbildung 17: BPA-Test: Verteilung der Anzahl an großen head thrashes ..... - 33 -
Abbildung 18: Durchschnittliche Head-thrash-Anzahl beim 1. BPS-Test ohne signifikante Unterschiede- 34 -
Abbildung 19: Verteilung der Anzahl der gesamten head thrashes beim 1. BPS-Test ..... - 34 -
Abbildung 20: Verteilung der Anzahl der großen head thrashes beim 1. BPS-Test..... - 35 -

Abbildung 21: Durchschnittliche head-thrash-Anzahl beim 2. BPS-Test ..... - 35 -
Abbildung 22: Verteilung der gesamten Head-thrash-Anzahl beim 2. BPS-Test..... - 36 -
Abbildung 23: Verteilung der großen head thrashes beim 2. BPS-Test..... - 36 -
Abbildung 24: Verteilung der Kopferkennungsquote beim BPA-Test [%]: x= Median, _____ = Mittelwert ..... - 37 -
Abbildung 25: Verteilung der Kopferkennungsquote beim 1. BPS-Test [%]: x= Median, _____ = Mittelwert..... - 38 -
Abbildung 26: Verteilung der Kopferkennungsquote beim 1. BPS-Test [%]: x= Median, _____ = Mittelwert..... - 39 -
Abbildung 27: Head-thrash-Anzahl im Durchschnitt beim BPA-Test, einmal mit allen Auswertungen und einmal mit lediglich den Auswertungen mit über 50-prozentiger Kopferkennungsquote ..... - 40 -
Abbildung 28: Head-thrash-Anzahl im Durchschnitt beim 1. BPS-Test, einmal mit allen Auswertungen und einmal mit lediglich den Auswertungen mit über 50-prozentiger Kopferkennungsquote ..... - 40 -
Abbildung 29: Head-thrash-Anzahl im Durchschnitt beim 2. BPS-Test, einmal mit allen Auswertungen und einmal mit lediglich den Auswertungen mit über 50-prozentiger Kopferkennungsquote ..... - 41 -
Abbildung 30: Auswertung der head thrashes beim BPA-Test einmal nach visueller Auswertung und einmal mithilfe des Pythonprogramms über die verschiedenen Konzentrationsgruppen hinweg..... - 42 -
Abbildung 31: Auswertung der head thrashes beim 1. BPS-Test einmal nach visueller Auswertung und einmal mithilfe des Pythonprogramms über die verschiedenen Konzentrationsgruppen hinweg..... - 42 -
Abbildung 32: Auswertung der head thrashes beim 2. BPS-Test einmal nach visueller Auswertung und einmal mithilfe des Pythonprogramms über die verschiedenen Konzentrationsgruppen hinweg..... - 43 -
Abbildung 33: Die sogenannte "confusion matrix normalized" nach YOLOv8-Training mit Erkennungswahrscheinlichkeiten bzw. Unterscheidungsmöglichkeiten: Farbe des Blautones gibt enstsprechend der Skala (rechts) die Identifizierungswahrscheinlichkeit (gelbe Diagonale) bzw. Unterscheidungswahrscheinlichkeit zwischen den Parametern (sonstige Werte) an..... - 46 -
Abbildung 34: Erkennung des C. elegans-Wurmes auf einem Video mit guter Qualität mittels YOLOv8 und mithilfe von Roboflows Code und YouTube-Anleitung (Skalski 2023b, 00:08:59, 2023a)..... - 47 -
Abbildung 35: Die stark variierende Verteilung der Kopferkennungsquoten innerhalb des BPA-Tests indiziert eine variierende Bildqualität und ein erhöhtes Trainingspotential ..... - 48 -
Abbildung 36: Ein C. elegans-Nematode der NC-Gruppe bei BPA mit einer Körperlänge von 610 µm gefangen von Partikeln – Möglicherweise Überreste von Kulturerneuerungen oder Cholesterin oder dergleichen ..... - 50 -

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung aller Geräte die im Zuge der Testvorbereitung für die C. elegans sowie dem dazugehörigen Futtermittel, den E.-coli-Bakterien benötigt werden - 18 -

Tabelle 2: Auflistung aller Geräte die im Zuge der Testvorbereitung für die C. elegans sowie dem dazugehörigen Futtermittel, den E.-coli-Bakterien benötigt werden - 22 -

Tabelle 3: Die verschiedenen p-Werte je Konzentration im Vergleich - 29 -

1. Einleitung

1.1. Endokrine Disruptoren

Verschiedene Kontaminationsquellen wie industrielle und kommunale Abwässer, landwirtschaftliche Abflüsse sowie unsachgemäße Abfallentsorgung tragen zur Einleitung einer Vielzahl von Schadstoffen in unsere Gewässer bei. Eine besonders problematische Gruppe dieser Schadstoffe, die in Gewässern nachgewiesen wird, sind die endokrinen Disruptoren (Colborn et al. 1993). Diese Substanzen, auch als Xenohormone bekannt, können in den Hormonhaushalt von Lebewesen eingreifen, indem sie hormonelle Prozesse stören. Dabei können sie auf der einen Seite natürliche Hormone verdrängen und stattdessen an hormonelle Rezeptoren binden. Diese Bindung kann zu unterschiedlichen Wirkungen führen: entweder wird der Rezeptor in ähnlicher oder sogar verstärkter Weise aktiviert (agonistische Wirkung), oder die Substanz bindet inhibitorisch an den Rezeptor, und verhindert die typische hormonelle Wirkung (antagonistische Wirkung). Auf der anderen Seite können sie auch die endokrine Balance verändern indem sie Hormonumwandlungsprozesse fördern oder reduzieren. Ein Beispiel wäre dabei eine Wirkung auf die Aromatase-Enzymfunktionsweise, welches Testosteron in Östrogen umwandelt (Fenske und Segner 2004). Wenn eine dieser Interaktionen schädliche bzw. negative Effekte auf das Lebewesen hat, spricht man von endokrinen Disruptoren. Ein schädlicher oder negativer Effekt stellt dabei jegliche Beeinträchtigung dar (Deutscher Bundestag 2016; BMUV 2023).

Besonders relevant für die Reproduktion und damit auch für den Erhalt von Populationen sind die Sexualhormone, die über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse bei Wirbeltieren einschließlich des Menschen gesteuert werden.

Bei den Androgenrezeptoren ist Testosteron bzw. in Fischen (*Teleostei*) die oxidierte Form 11-keto-Testosteron das zentrale natürliche Hormon (Teigeler 2021; Golshan und Alavi 2019). Bei Östrogenrezeptoren entfaltet das natürliche Östrogen 17-β-Östradiol (E2) die stärkste Wirkung. Es wird gefolgt von Estron (E1), einem Zwischenprodukt und Ausgangsstoff, sowie Estriol (E3), einem Metaboliten von Östradiol. Ein bekanntes Beispiel für ein synthetisches Östrogen ist das 17-α-Ethinylestradiol, der Hauptbestandteil der Antibabypille. Diese Substanz hat eine bis zu

doppelt so starke Wirkung wie das natürliche Östradiol und gelangt vor allem über den Urin in Abwässer, die schließlich in diverse Wasserkörper eingeleitet werden (Fent 2013, S. 302).

Auch Pestizide aus der Landwirtschaft, wie Atrazin, Glyphosphat, 2-4-Dichlorphenoxyessigsäure („2,4-D“) und Linurun können endokrin-disruptive Wirkungen entfalten (Mnif et al. 2011). Und auch verschiedene per- und polyfluorierte Alkylverbindungen haben endokrin-disruptive Eigenschaften, wobei bei diesen insbesondere die Schilddrüsenhormonbalance beeinträchtigt wird (Kar et al. 2017). Aus der Industrie sind insbesondere synthetische Polymere und deren Zusatzstoffe, wie Weichmacher (z.B. Phthalate) und Bisphenole, bekannt für ihre endokrine Wirkung. Obwohl das endokrin wirksame Potenzial von Bisphenolen geringer ist als das von natürlichen Sexualhormonen (Fent 2013, S. 302), können sie aufgrund der großen Mengen, die bei der Polymerproduktion freigesetzt werden, eine erhebliche östrogene Wirkung auf viele Lebewesen ausüben. Auf vielen Mehrwegflaschen findet sich der Aufdruck „BPA-free“. BPA steht für Bisphenol A, ein Stoff, der häufig in Polymeren verwendet wird. BPA ist kein Weichmacher, sondern ein Polymerisationsstoff, der jedoch von der EU in vielen Produktarten bereits kategorisch verboten oder in seiner Verwendung eingeschränkt ist (MKUEM Rheinland-Pfalz 2012). Der Grund dafür liegt im Verdacht, dass BPA als endokriner Disruptor wirkt und reproduktionstoxisch sein könnte (ECHA 2023a).
(Muth-Köhne et al. 2020)Inzwischen wird BPA häufig durch andere Bisphenole wie Bisphenol S (BPS) ersetzt, die aber ebenfalls endokrine Wirkungen zeigen (Muth-Köhne et al. 2020).

1.2. Auswirkung endokriner Disruptoren auf Nahrungsnetze

Die Belastung von Gewässern mit endokrinen Disruptoren mit östrogener Wirkung beeinflusst nicht nur einzelne Organismen, sondern kann ganze Nahrungsnetze destabilisieren (Ward et al. 2020). In aquatischen Ökosystemen sind insbesondere Krustentiere des Zooplanktons und Fische bedroht. Endokrine Disruptoren wirken sich allerdings auch auf bestimmte Phytoplanktonarten aus. Denn obwohl Phosphor- und Stickstoffeinträge das Pflanzenwachstum und damit auch Algenblüten maßgeblich beeinflussen (Jenny et al. 2020; Zimmerman und Cardinale 2014; Townsend 2009, S. 512), spielen endokrine Disruptoren auch eine Rolle und können zu Eutrophierungsprozessen beitragen. Eine direkte Beeinflussung findet dabei bei manchen teils toxischen Algenarten wie kleineren Grünalgenarten, Kieselalgen und

Dinoflagellaten statt, weil diese sich sexuell fortpflanzen. Entsprechend können endokrine Disruptoren ihre Fortpflanzung hemmen oder zu einer übermäßigen Vermehrung führen, was die Vielfalt des Phytoplanktonbiotops gefährdet (Theus et al. 2023; Long et al. 2020). Neben der Reproduktion wurde ein Einfluss von BPA auf die Photosyntheseleistung sowie ein stärkeres Wachstum bestimmter toxischer Algenarten nachgewiesen (Chae et al. 2020; M'Rabet et al. 2018). Auch Mikrobien als Destruenten sind von verschiedenen endokrinen Disruptoren betroffen. Insbesondere

Noch gravierender kann der Einfluss östrogen-wirkender Xenohormone auf die Populationen von Fischen sein: Eine zunehmende Verweiblichung der Männchen von *Rutilus rutilus* oder *Pimephales promelas* führte zu einer erhöhten Vitellogenin-Expression, einem Protein, das für die Eisynthese notwendig ist (Bjerregaard et al. 2006; Kidd et al. 2007; Rodgers-Gray et al. 2001). Diese Entwicklung führte nicht nur zu einer erhöhten Östrogenrezeptoraktivität bei den Männchen, sondern begünstigte auch die Bildung von intersexellen *Teleostei*, was langfristig zu einem Einbruch der Populationen führte (Rodgers-Gray et al. 2001; Geraudie et al. 2017).

Neben der Fortpflanzung beeinflussen endokrine Disruptoren auch den Metabolismus oder die allgemeine Vitalität von Organismen, beispielsweise in Form einer Förderung von Adipositas oder einer beschleunigten Alterung. Solche Veränderungen können sich auf das Räuber-Beute-Verhältnis auswirken und führen zu Anpassungen in der Populationszahl der verschiedenen trophischen Ebenen, was wiederum das Nahrungsnetz destabilisiert. Diese Effekte werden in verschiedenen Studien bei direkter Aussetzung des Östrogens Estron (Ward et al. 2020) oder beispielsweise dem Antidepressivum Fluoxetan (Gaworecki und Klaine 2008), bei dem eine endokrin disruptive Wirkung belegt worden ist (Domingues et al. 2023). Neben der direkten Beeinträchtigung von manchen Phytoplanktonarten spielen endokrine Disruptoren deshalb auch eine indirekte Rolle, indem sie das Nahrungsnetz verändern (Kermoysan et al. 2013). Denn bereits etwas höhere trophische Ebenen sind für den Abbau einiger Eutrophierung begünstigenden Algenarten wie Blaualgen entscheidend. Ein anschauliches Beispiel, der dies aufzeigt, ist der Befund beim von Hu et. al beim Einsatz von Karpfen *Hypophthalmichthys molitrix* und Muscheln zur Eindämmung von Algenblüten im Xiao-Jiang-Fluss in China (Hu et al. 2017). In den Lebern dieser Karpfen zeigte sich eine Anreicherung von endokrinen Disruptoren

wie BPA und BPS, die den Metabolismus beeinflussten und dadurch den gewünschten Effekt des Algenabbaus hemmten.

1.3. Verhalten als Parameter in Testverfahren bei endokrinen Disruptoren

Viele Schadstoffe, darunter insbesondere endokrine Disruptoren, befinden sich heutzutage in geringsten Konzentrationen von wenigen Mikrogramm manchmal sogar nur Nanogramm pro Litern in Gewässern (Bajard et al. 2023; Yang et al. 2022). Um zu untersuchen, ab welcher Dosis eines endokrinen Disruptors ein Effekt auf das Verhalten eintritt, ist weitere Forschung notwendig, und die Wahl der richtigen Testverfahren ist entscheidend. Charakteristisch für endokrine Schadstoffe ist, dass ihre Effekte dosisabhängig sehr unterschiedlich ausfallen können. So können sie in geringsten Dosen das Hormonsystem beispielsweise durch Hemmung der Vitalität beeinflussen, während sie in höheren Dosen möglicherweise auf bestimmte Endpunkte keine Wirkung zeigen (Hayes et al. 2002). Häufiger jedoch tritt bei den nicht-linearen Dosis-Wirkungs-Beziehungen eine „U-Form“ auf: Das bedeutet, dass bei geringen und hohen, jedoch nicht bei mittleren Konzentrationen ein Effekt spürbar ist (Clotfelter et al. 2004). Wenn dabei in geringen Dosen eine Stimulation und bei hohen Konzentrationen eine Hemmung zustande kommt, wird diese „U-förmige“ Dosis-Wirkungsbeziehung Hormesis genannt (Ludwig-Müller und Gutzeit 2014). In solchen Fällen könnte bei mittleren Konzentrationen ein Zustand der Homöostase vorliegen (Fent 2013, S. 74).

In der Ökotoxikologie wird zumeist die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verwendet, weil die Dosisbestimmung eines jeden Organismus zu umfangreich wäre. Hinzukommend kann die Übertragbarkeit der Toxizität von Substanzen bzw. ihren Konzentrationen zwischen Arten schwierig sein, weil bestimmter Effekte bei einer Spezies nachweisbar sind, während er bei anderen Arten derselben Klasse, Gattung oder Familie nicht auftreten. Ein Beispiel dafür ist die Wirkung von Atrazin bei Amphibien der Ordnung *Anura* (Frösche): Während der Frosch *Xenopus laevis* schon bei sehr geringen Dosen einen Effekt zeigt, benötigen andere Frösche wie *Rana pipiens*, *Rana sylvatica* oder *Bufo americanus* Konzentrationen, die bis zu 10.000 Mal höher sind, um eine toxische Wirkung zu zeigen, und eine reproduktionsbeschränkende Wirkung tritt erst bei 30.000 Mal höheren Konzentrationen auf (Hayes et al. 2002; Allran und Karasov 2001).

In der Ökotoxikologie gibt es verschiedene Ansätze, um die Toxizität zu bestimmen: Die zu untersuchende Chemikalie kann unter Laborbedingungen mithilfe von biologischen Teilprozessen analysiert werden, indem sie beispielsweise einzelnen Zellen (*in vitro*), Eiern (*in ovo*) oder ganzen Tieren (*in vivo*) exponiert wird (Clotfelter et al. 2004). Eine neuere Methode der Ökotoxikologie ist die *in silico*-Analyse, bei der Computerprogramme die Toxizität berechnen (Mekenyan 2010). Bei Testverfahren werden normalerweise eine maximale Konzentration und verschiedene geringere Konzentrationen verglichen. Zudem wird bei allen Verfahren, außer bei *in silico*, eine Negativkontrolle durchgeführt, um einen Wirkungszusammenhang sicherzustellen. Eine Negativkontrolle ist dabei ein Begleitexperiment, bei dem erwartet wird, dass keine Wirkung des zu untersuchenden Stoffes auf die zu untersuchenden Parameter eintrifft und welches durchgeführt wird, um die Kausalität der Ergebnisse, bei den Proben mit Testsubstanzdosis aufzeigen zu können (Lipsitch et al. 2010). Ein anderer Ansatz wäre die Überprüfung samt Positivkontrolle bei der eine Dosis eines bestimmten Stoffes eingesetzt wird, bei der ein bestimmtes Ergebnis mit Gewissheit erwartet werden kann (Mallinckrodt et al. 2010). Damit soll das ganze Testverfahren auf Funktionsweise überprüft werden. Bei klassischen Testverfahren sollten die mit der Testsubstanz bestückten Proben bezüglich der Konzentrationen so gewählt werden, dass die klassischen Endpunkte, insbesondere die letale Wirkung, erfasst werden können.

Um jedoch die Konzentrationen endokrin disruptiv wirkender Substanzen präzise zu bestimmen, sollten sensitivere Testverfahren eingesetzt werden, bei denen nicht nur klassische Endpunkte berücksichtigt werden, sondern auch Verhaltensänderungen als Endpunkt dienen. Das Verhalten umfasst alle Verhaltenscharakteristika, von frühentwickelten Reflexreaktionen bis zum komplexen Lernverhalten, also auch noch z.B. Aktivitäten wie Futtersuche, Feindvermeidung, Konkurrenzverhalten und Paarungsverhalten. Solche Verhaltensänderungen beeinflussen das individuelle Wachstum, Überleben und die Reproduktion und sind somit direkt mit den klassischen Endpunkten verknüpft. Diese Zusammenhänge wurden beispielsweise für das Pharmazeutikum und Beruhigungsmittel Oxazepam für den Flussbarsch von Brodin et al. (2013) festgestellt.

1.4. Bisphenol A (BPA)

BPA ist das erste und am häufigsten industriell genutzte Bisphenol und hat neben 20 verschiedenen Bezeichnungen unter anderem den IUPAC-Namen 4-[2-(4-Hydroxyphenyl)propan-2-yl]phenol (ECHA 2024; Farris 2014). Die Entdeckung von BPA mit wissenschaftlicher Evidenz geht auf den russischen Chemiker Aleksandr Dianin im Jahr 1891 durch Kondensation von Azeton und Salzsäure oder Schwefelsäure zurück (Besaratinia 2023). Mit dem Aufschwung der Polymerindustrie seit den 1950er Jahren hat sich BPA insbesondere in Polycarbonaten und Epoxidharzen weit verbreitet (Umweltbundesamt 2022b). BPA wird weltweit aber nicht nur als Ausgangsstoff für Epoxidharze und Polycarbonate verwendet, sondern findet auch Anwendung als Farbentwickler in Thermopapier und als Antioxidans bei der Herstellung von PVC (Ana Rodríguez Bernaldo de Quirós et al. 2019). Bereits 1936 wird die östrogene Wirkung von BPA entdeckt, als die Forscher Edwards C. Dodds und Wilfrid Lawson die Substanz als östrogen wirkendes Pharmazeutikum für die Hormontherapie identifizieren (Dodds und Lawson 1936). Die endokrin-disruptive Wirkung von BPA basiert hauptsächlich auf seiner Fähigkeit, als Agonist an verschiedene Östrogenrezeptoren zu binden (Muth-Köhne et al. 2020). Seit Dezember 2017 gilt BPA aufgrund seiner reproduktionstoxischen und hormonellen Wirkung als besonders besorgniserregender Stoff, wie es die Europäische Chemikalienagentur (ECHA) verkündete.

Neben den hormonellen Effekten steht BPA auch im Verdacht, neuro- oder genotoxische Wirkungen zu haben (Wang et al. 2023a). Trotz der sukzessiven Einschränkungen und Verbote der EU, wie z. B. in Säuglingsflaschen ab Oktober 2011, Thermopapier ab 2016 und Lebensmittelkontaktmaterialien ab 2018 (Europäische Kommission 14.01.2011, 12.12.2016, 14.02.2018), bleibt BPA weiterhin ein gesellschaftliches und ökologisches Problem. So wurde bei 83 % der deutschen Bevölkerung eine BPA-Konzentration im Körper nachgewiesen (European Environment Agency 2023). In Gewässern werden BPA-Konzentrationen von bis zu 9 µg/L und im Sediment bis zu 20 µg/kg gemessen (Umweltbundesamt 2021). Diese Werte bestehen trotz der zunehmenden Substitution von BPA durch andere Bisphenole. Dabei ist BPAs Octanol-Wasser-Verteilungskoeffzient (Log K_{OW}-Wert) 3,32 (PubChem 2024), sodass ihm danach eine gewisse bioakkumulierende lipophile Eigenschaft zu gesprochen werden kann (Gimeno et al. 2024; Fent 2013, S. 206). Die molare Masse beträgt 228,29 g/mol.

1.5. Bisphenol S (BPS)

(a)

(b)

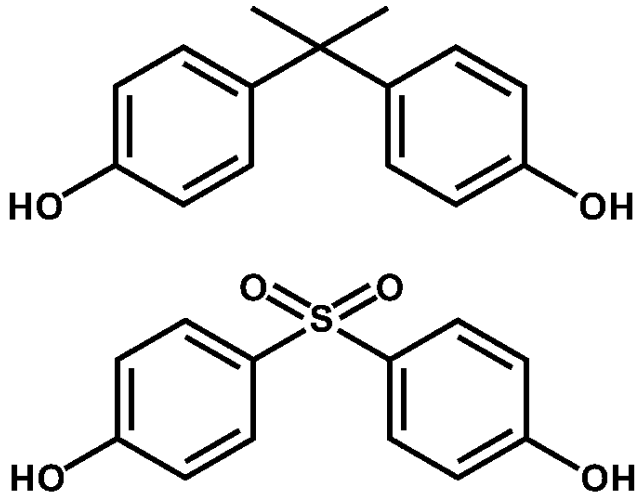


Abbildung 1: Strukturformel von 4,4’-isopropylidenediphenol/BPA (a) im Vergleich mit der Strukturformel von Strukturformel von 4,4‘-Sulfonyldiphenol/BPS (b) (Schöpel et al. 2016)

Ein Hauptsubstitut für BPA ist Bisphenol S (BPS), was den IUPAC-Namen 4,4‘-Sulfonyldiphenol trägt (ECHA 2023b). Besonders in der Thermopapierproduktion stieg seit Inkrafttreten einer Verordnung, die BPA quasi verboten hat, indem der BPA-Gehalt in Thermopapier auf 0,02 Gewichts-% beschränkt worden ist (Europäische Kommission 14.02.2018), der Großteil der Produktion auf BPS um. Etwa zwei Drittel der gesamten Thermopapierproduktion verwendet inzwischen BPS, während der Rest auf andere Bisphenole zurückgreift (ECHA 2020). Auch bei der Herstellung von Polycarbonaten und Epoxidharzen wird BPS zunehmend als Ersatzstoff verwendet (Umweltbundesamt 2022a). Das zweit häufigste Substitut stellt Bisphenol F (BPF) dar (Winkler et al. 2022). BPS molare Masse ist mit 250,27 g/mol etwas höher als die von BPA, während der Log K_{OW}-Wert von BPS mit 1,65 geringer ist und somit eine geringere bioakkumulierende Eigenschaft aufweist.

Aufgrund der zu BPA ähnlichen chemischen Struktur wird für BPS (siehe Figure 2) und andere Bisphenole eine vergleichbare endokrin-disruptive östrogene Wirkung vermutet (Umweltbundesamt 2022a; Muth-Köhne et al. 2020). Die ECHA stuft BPS mittlerweile als Kandidaten für die Liste der besonders besorgniserregenden Stoffe ein (ECHA 2023a).

Diese Bisphenole gelangen hauptsächlich über die Abwässer der Produktionsanlagen in die aquatische Umwelt, wobei der Großteil von Polycarbonat- und Epoxidharzherstellern stammt (Umweltbundesamt 2010).

1.6. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist, ob der Ersatz von BPA durch BPS eine „Regrettable Substitution“ darstellt – also eine Substitution, die sich jedoch als ebenso schädlich erweisen könnte. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit die beiden am häufigsten in der Umwelt vorkommenden Bisphenole, BPA und BPS, beleuchtet.

Untersucht wird, ob BPS ähnliche Auswirkungen wie BPA auf die Entwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* hat, insbesondere auf seine Länge und die Kopfbewegungen (*„head thrashes“*) im Erwachsenenstadium. Dabei wird zunächst analysiert, ob BPA und BPS den betrachteten Verhaltensparameter und die Länge der Nematoden beeinflussen. Im Weiteren werden die Ergebnisse von BPA und BPS verglichen.

Dabei stellt sich die Frage, inwieweit der Verhaltensparameter Rückschlüsse auf neuronale und hormonelle Veränderungen zulassen.

Ein weiterer Aspekt der Untersuchung ist die Frage, inwieweit es möglich ist, gemachte Videoaufzeichnungen mit der Programmiersprache “Python” automatisiert auszuwerten. Dabei ist das erste Ziel die Erkennung der verschiedenen Merkmale zu ermöglichen, bevor das zweite Ziel der automatischen Zählung erreicht werden kann.

2. Theoretische Grundlagen und Stand der Technik und Wissenschaft

2.1. Caenorhabditits elegans in der Forschung

Der in der vorliegenden Arbeit als Testorganismus verwendete Nematode *Caenorhabditis elegans* gehört zur Gruppe der Fadenwürmer (Stamm *Nematoda*, Familie der *Rhabditidae*). *C. elegans* durchläuft in weniger als vier Tagen seine sechs Lebensstadien, beginnend vom Embryo über vier juvenile Stadien bis hin zum adulten Nematoden. Im ausgewachsenen Zustand erreicht er eine Länge von etwa 1,3 mm. *C. elegans* ist ein weit verbreiteter Bodenbewohner, der in unterschiedlichen Temperaturbereichen vorkommt und sich von Bakterien sowie zersetzendem organischen Material (Detritus) ernährt (Gerald et al. 2022).

Der Fadenwurm ist entweder zwittrig oder männlich. Bei der Befruchtung eines Hermaphroditen durch ein Männchen entstehen sowohl männliche als auch zwittrige Nachkommen. Bei der Selbstbefruchtung entstehen ausschließlich Hermaphroditen, weshalb in der Natur die Zwitterform dominiert. Im Labor werden hauptsächlich Hermaphroditen verwendet, wodurch diese in Experimenten meist im Fokus stehen. Die Hermaphroditen besitzen U-förmige Gonaden, die sowohl Spermien als auch Eizellen produzieren (Bajard et al. 2023).

Der Nematode *C. elegans* wird zunehmend in der Forschung eingesetzt, da Testverfahren mit Invertebraten nicht als Tierversuche im Sinne des §8 TierSchG gelten, weil es sich bei *C. elegans* nicht um Wirbeltiere gem. § 8 I TierSchG handelt. Und selbst eine Anzeige der zuständigen Behörde gegenüber gemäß §8a IV TierSchG ist nicht erforderlich, da es sich auch nicht um ein leidensfähiges wirbelloses Tier nach § 8 IV TierSchG handelt, selbst wenn Reflexe durch das Nervensystem wie ein Reiz des Nozizeptionsystems möglich sind (Irvine 2020; Smith und Lewin 2009). Neben den geringeren rechtlichen Hürden sprechen auch die einfache Haltung und die mögliche Rolle als Indikator, eventuell auch für Säugetiere, für den Einsatz von *C. elegans* als Forschungsorganismus. Der Grund, warum C. elegans als translationales Modell in vielen biologischen, pharmakologischen und medizinischen Bereichen dienen kann, liegt darin, dass zum einen die Gene des Nematoden gut erforscht sind und Expressionen relativ einfach in der Analyse danach aufbereitet und somit gehandhabt werden können. Zum anderen besteht eine gewisse Homologie der Gene mit anderen Lebewesen, zum Beispiel mit uns Menschen. Über 83 % der Genproteine in *C. elegans* sind auch im Menschen vorhanden, allerdings sind diese in der Abfolge nur rund 40 %, hingegen strukturell bei knapp unter 60 % übereinstimmend (Lai et al. 2000).

Aber auch in der Ökotoxikologie kann *C. elegans* das Toxizitätspotential für die Umweltkompartimente Boden und Wasser aufzeigen. Das Testverfahren basiert weitgehend auf der Verfahrensnorm DIN EN ISO 10872:2021 „Wasserbeschaffenheit und Bodenbeschaffenheit - Bestimmung der toxischen Wirkung von Sediment- und Bodenproben auf Wachstum, Fertilität und Reproduktion von *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) (ISO 10872:2020)“.

2.1.1. Das neuroendokrine System von C. elegans

Seit den 1980er Jahren ist bekannt, dass *C. elegans* über ein neuronales System verfügt, das bestimmte Verhaltensweisen steuert (White et al. 1986). In den 1990er Jahren wurde entdeckt, dass es Neuronen in *C. elegans* gibt, deren Zahl auf mittlerweile auf 302 bemessen wird (Hobert 2018). Diese Neuronen produzieren Neuropeptide, die hormonelle Wirkungen entfalten und an Rezeptoren binden, darunter auch orthologe Hormone wie Serotonin (Li et al. 1999; Schinkmann und Li 1992). Die Zahl der identifizierten Kernrezeptoren in *C. elegans* ist im Laufe der Jahre auf 284 angestiegen, während der Mensch nur 48 Familien von nuklearen Rezeptoren besitzt (Antebi 2018a). Von den 284 Kernrezeptoren sind 15 evolutionär konserviert, was bedeutet, dass sie denen von vielen Lebewesen sehr ähnlich sind, also Homologe darstellen. Außerdem gehen von dieser Hormonregulierung zahlreiche Prozesse wie Häutung, Homöostase, Entwicklung, Verdauung und Fortpflanzung aus (Li et al. 1999). Es besteht ein Wechselspiel zwischen den Neurotransmittern Serotonin, Dopamin und GABA und der neuroendokrinen Achse, das Verhaltensprozesse wie Verdauung und Energieverwertung beeinflusst (Rodrigues et al. 2024). Beispielsweise reguliert die Adenosinmonophosphat-Kinase (AMPK) in *C. elegans* über die Genome *AAK-1* und *AAK-2* den Serotoninspiegel und beeinflusst dadurch den Fettabbau und die Bewegung (Cunningham et al. 2014). Die Hormone werden innerhalb des Fadenwurms über Zell-Zell-Kanäle transportiert, da *C. elegans* im Gegensatz zu anderen Würmern, wie dem Regenwurm, weder Blut noch ein Kreislaufsystem besitzt (Rodrigues et al. 2024).

Ein wesentlicher Unterschied zum neuroendokrinen System von Wirbeltieren liegt in der fehlenden Synthesefähigkeit von Cholesterol, einem für das Zellwachstum essenziellen Stoff. Stattdessen muss Cholesterol oder dessen Derivate, wie das bei Pilzen gebildete Ergosterol, über die Nahrung aufgenommen werden (Antebi 2018b; Matyash et al. 2001). Dies wirft die Frage auf, ob in *C. elegans* überhaupt Steroidhormonrezeptor-vermittelte endokrine Prozesse ablaufen. Es spricht jedoch einiges dafür, dass *C. elegans* durch die Aufnahme von Cholesterin über die Nahrung Steroidhormone bilden kann. Der Rezeptor *DAF*-12 und das Cytochrom-steuernde Gen *DAF*-9 spielen eine Rolle bei der Bildung von Androstan-Derivaten wie Pregnenolon, einem Ausgangsstoff von Progesteron, der auch bei Säugetieren und anderen höheren Lebewesen vorkommt (Broué et al. 2007). Darüber hinaus verfügt *C. elegans* über

Rezeptoren, die die Cholesterol-Homöostase steuern, wobei der entsprechende Homolog NHR-8 ist (Magner et al. 2013).

Von besonderer Relevanz für diese Arbeit ist die Frage, ob *C. elegans* über Rezeptoren verfügt, an die östrogenähnlich wirkende Xenohormone binden können. Tatsächlich reagieren einige Genrezeptoren von *C. elegans* auf Steroide und zeigen durch danach auftretende Körperreaktionen eine gewisse Homologie zu Steroidrezeptoren von Säugetieren. So sind die Kernrezeptoren *NHR*-14, *NHR*-69 und *NHR*-121 von der Sequenz her dem menschlichen Östrogenrezeptor ähnlich. Des Weiteren hat *NHR*-14 in Studien sogar mit Östradiol interagiert und die Vitellogeninsynthese erhöht, was darauf hindeutet, dass dieser Kernrezeptor als Östrogenrezeptor fungieren könnte (Mimoto et al. 2007).

2.1.2. Die verschiedenen Verhaltensparameter von C. elegans

Eine Möglichkeit, die Aktivität bestimmter Genome nach der Exposition gegenüber Schadstoffen zu untersuchen, besteht in der Verwendung der *Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction* (*RTQ-PCR*) (Peterson et al. 2019; Chauve et al. 2020). Es stellt sich die Frage, inwieweit Verhaltensparameter Rückschlüsse auf neuronale und hormonelle Veränderungen bei *C. elegans* zulassen.

Verhaltensweisen können anhand von Lokomotion, Eiablage, Defäkation, Chemotaxis, die Dauerstadienbildung (einem Zustand, in dem die Nematodenlarve länger als gewöhnlich im Larvenstadium verweilt) und vielen weiteren Parametern untersucht werden. Viele Neuronen, die für diese Verhaltensweisen verantwortlich sind, sind bereits bekannt. Beispielsweise regulieren die *ADE*- und *PDE*-Neuronen die Lokomotionsrate, während die *ADF*- und *ASI*-Neuronen einen starren Zustand unterdrücken. *AS* fungiert als genereller Lokomotionsmotor, während die Neuronen M3, M4 und *MC* für die Bewegung des Pharynx zuständig sind (Hope 1999, S. 155).

Die Lokomotion von *C. elegans* im wässrigen Medium ist durch wellenartige Bewegungen und ruckartige Bewegungen des Pharynx charakterisiert. Diese ist derartig ausgeprägt, weil der Nematode im Gegensatz zu seinem natürlichen Habitat, dem Boden, sich im wässrigen Medium nicht festhalten kann.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Lokomotions-Verhaltensparameter zu messen. So kann man beispielsweise die Reaktion des Fadenwurms auf Berührungen untersuchen und messen, wie viele Berührungen erforderlich sind, bis der Fadenwurm in einen Ruhezustand übergeht (Mersha et al. 2018). Eine andere Methode ist die Messung der Anzahl und Frequenz der sogenannten "Bodybends", also der schwungartigen Ganzkörperbewegungen. Dabei werden der Abstand zwischen Kopf- und Schwanzende sowie die Bewegungsrichtung des Kopfes gemessen, um den Ausschlag zu bestimmen (Zhang und Chen 2023).Ein weiterer Lokomotionsparameter sind die "*Head Thrashes*", ruckartige Kopfbewegungen ab dem Pharynx. Das erste Mal wurde dieser Parameter in Verbindung mit *C. elegans* in der Wissenschaft Recherchen zufolge 1995 erwähnt (Rand und Johnson 1995). Seit Mitte der 2000er fand der Parameter in der Verhaltensanalyse des Nematoden häufiger Verwendung (Touroutine et al. 2005; HU et al. 2008; Wang et al. 2007). Dabei zeigt er Korrelationen zu den *DAF*-Genen, die das Wachstum und die Verweildauer im Larvenstadium regulieren (Zhao et al. 2016). Ein Zusammenhang zwischen Hormonrezeptoren und *head thrashes* wird zumindest beim *NHR*-76 und beim *„Cytein Rich Motor"-protein* (*CRM*-1) vermutet (Long et al. 2023). Der Hormonrezeptor *NHR*-76 ist für die altersbedingte Chemotaxis (Yokosawa und Noma 2024) sowie für die Fettverbrennung durch β-Oxidation von Fettsäuren verantwortlich (Ali und Brownstone 1976). Außerdem reguliert der Hormonrezeptor *CRM*-1 (Long et al. 2023).

2.2. Wirkungen von BPA und BPS auf *C. elegans*

In der vorliegenden Arbeit wird der Lokomotions-Parameter *head thrashes* als Testendpunkt gewählt, er charakterisiert das Verhalten der Vitalität des Organismus (Zhang und Chen 2023). Als Verhaltensparameter ist er sensibler als die klassischen Endpunkte, sodass subletale und damit kleinere Konzentrationen gewählt werden können. Zudem könnte er der Vorarbeit zur Genexpressionsanalyse z.B. bei der qPCR-Analyse oder im Falle einer Sequenzierung des Transkriptoms dienen, indem er als sichtbarer Indikator (*„phenotypical anchorpoint"*) fungiert und man typischerweise einen morphologischen Endpunkt mit Genexpressionen verknüpfen sollte (Moggs et al. 2004; Murata et al. 2012). Des Weiteren wurde dieser Parameter in diversen Studien zu den endokrinen Disruptoren BPA und BPS verwendet (Zhou et al. 2016; Zhou 2018; Xiao et al. 2019; McDonough et al. 2021; Wang et al. 2023b; Kucharíková et al. 2023). In den meisten dieser Studien zeigen die Ergebnisse eine abnehmende Anzahl an

Kopfbewegungen mit steigenden Konzentrationen der Substanzen. Die für BPA verwendeten Konzentrationen reichen von etwa 440 µg/L bis 44 mg/L (Wang et al. 2023b) und von 0,22 µg/L bis 2,2 mg/L (Zhou et al. 2016). Zhou wendete dieselben molaren Konzentrationen bei BPS an, die zwischen 0,25 µg/L und 2,5 mg/L lagen (Zhou 2018), während andere Studien BPS-Konzentrationen zwischen 25 µg/L und 2,5 mg/L (McDonough et al. 2021) sowie 62,5 mg/L und 500 mg/L (Xiao et al. 2019) verwendeten. In der vergleichenden Arbeit von Zhou wird festgestellt, dass BPS zwar einen Effekt zeigt, dieser jedoch nicht so signifikant ist wie bei BPA. Außerdem nimmt die Anzahl der *head thrashes* bei BPA bereits bei niedrigeren Konzentrationen signifikant ab (2,2 µg/L) als bei BPS (250 µg/L), obwohl eine signifikante Tendenz bereits bei niedrigeren Konzentrationen sichtbar ist (Zhou et al. 2016; Zhou 2018).

In der Arbeit von McDonough et al. (2021) mit BPS sind die Ergebnisse der *head thrashes* größtenteils nicht signifikant. Lediglich ein Anstieg der *head thrashes* bei einer Konzentration von 25 µg/L ist signifikant, ebenso wie ein weiterer Anstieg bei etwa 250 µg/L. Danach sinken die Kopfbewegungswerte leicht unter das Niveau der Negativkontrollgruppe („Negative Control“ (Abk. NC)). Dieses Ergebnis zeigt somit keine klare, lineare Tendenz.

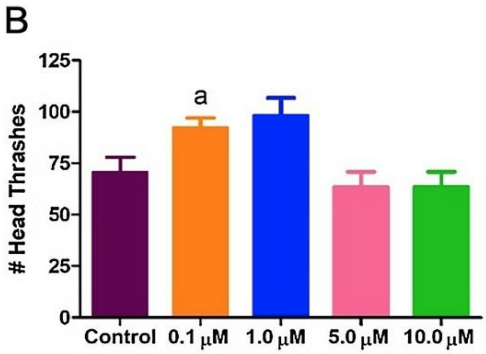


Abbildung 2: Anzahl der *head thrashes* nach Aussetzung gegenüber BPS nach 48 h (McDonough et al. 2021)

Der weitere gewählte Parameter ist die Körperlänge. Hierzu haben die meisten Forschungen auch eine monotone Abnahme der Körperlänge mit zunehmender BPA- sowie BPS-Konzentration festgestellt wie bspw. bei Kucharíková et al. 2023 und Zhou et al. 2016/2018.

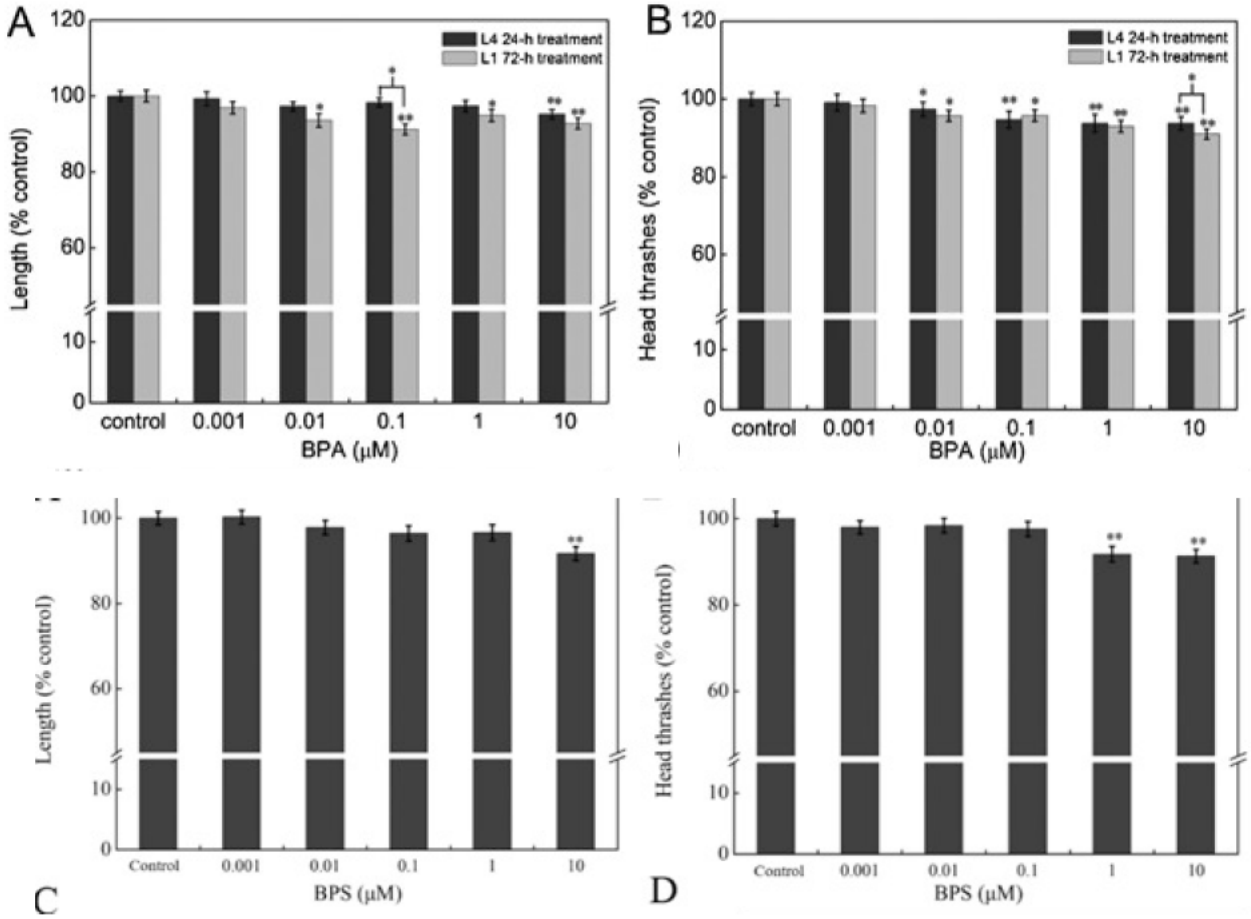


Abbildung 3 (A&B) und (C&D): Auswertung der Körperlänge und *head thrashes* nach 24 und nach 72 Stunden BPA-Exposition (A&B) (Zhou et al. 2016) sowie nach 72 Stunden Exposition gegenüber BPS (C&D) (Zhou 2018)

Hingegen gibt es auch wieder eine Studie, die diese Tendenz widerlegt und zeigt sogar eine größere Länge mit zunehmender BPA-Konzentration nach 48-stündiger Exposition auf (García-Espiñeira et al. 2018)

Zusätzlich haben andere Forschende einen Rückgang der Reproduktionsrate bei *C. elegans* im Zusammenhang mit BPS und BPA festgestellt (Kucharíková et al. 2023; Hyun et al. 2021). Die Anzahl der gelegten Eier nimmt mit steigenden Konzentrationen ab. In der Studie von Kucharíková et al. sinkt die Anzahl der Eier bei BPS sogar stärker als bei BPA bei jeweiligen Konzentrationen von 0,1 µM bis 5 µM etwa 22 µg/L-220 µg/L (Kucharíková et al. 2023). Hyun et

al. (2021) messen bei einer Konzentration von 1 mM (entspricht 220 mg/L für BPA und 250 mg/L für BPS) einen Rückgang von 20 % bei BPA und 23 % bei BPS, während Xiao et al. (2019) einen Rückgang von über 30 % bei BPS ab einer Konzentration von 2,5 µg/L feststellen. Zudem zeigt sich ein weiter abnehmender Effekt auf die Eiproduktion über mehrere Generationen hinweg. Auch Mersha et al. (2018) zeigen einen Rückgang in der Eiproduktion mit steigender BPA-Konzentration.

Die Anzahl an Eiern wird in dieser Arbeit aber nicht weiter nachgegangen, aber dennoch erwähnt.

Es ist noch erwähnenswert, dass bei mehreren Bisphenolen bei Hyun et al. (2021) ein Rückgang in der Lebensspanne außer bei BPS gemessen wird. In dieser Arbeit wurden BPA, BPS, BPF und TMBPAF untersucht

3. Material und Methoden

3.1. Zucht der *C. elegans*-Nematoden

Das Nematoden-Testverfahren ist in einer modifizierten Form, angelehnt an die DIN EN ISO 10872-2020, durchzuführen. Das entsprechende Anleitungsdokument ist die Standardarbeitsanweisung „SOP 3-14“ der BfG, auf der viele der folgenden Methodenschritte basieren (BfG 2022). müssen zunächst die Kulturen von *C. elegans*- gepflegt werden. Dabei werden dieselben Reagenzien wie in der DIN-Norm, jedoch mit angepassten Konzentrationen verwendet. Die Nematoden werden in Flüssigkulturen gezüchtet, wobei die folgenden Reagenzien, Futtermittel und Geräte zum Einsatz kommen.

3.1.1. Reagenziensop

Die verwendeten Reagenzien umfassen:

1. LB-Medium: Bestehend aus Pepton (1 %), Hefeextrakt (0,5 %), Natriumchlorid (1 %) und doppelt destilliertem Wasser.
2. S-Basal-Medium: Zusammengesetzt aus Natriumchlorid (0,585 %), Dikaliumhydrogenphosphat (0,1 %), Kaliumdihydrogenphosphat (0,6 %) und doppelt destilliertem Wasser (98,715 %).
3. Lösung metallischer Spurenelemente: Enthält Natrium-EDTA (0,186 %), Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat (0,02 %), Kupfersulfat-Pentahydrat (0,0025 %),

Eisen(II)sulfat-Heptahydrat (0,069 %), Zinksulfat-Heptahydrat (0,029 %) und doppelt destilliertes Wasser (99,6935 %).

4. Kalium-Citratpuffer (pH 6): Bestehend aus Citronensäure-Monohydrat (2 %), Trikaliumcitrat-Monohydrat (29,35 %) und doppelt destilliertem Wasser (68,65 %).
5. Calciumchlorid-Lösung: Zusammengesetzt aus Calciumchlorid-Dihydrat (14,701 %) und doppelt destilliertem Wasser (85,299 %).
6. Magnesiumsulfat-Lösung: Enthält Magnesiumsulfat-Heptahydrat (24,647 %) und doppelt destilliertes Wasser (75,353 %).
7. Cholesterin-Lösung: Bestehend aus Cholesterin (0,5 %) gelöst in Ethanol (99,5 %).
8. S-Complete-Medium: Enthält S-Basal-Medium (98 %), 1M Kaliumcitratpuffer (1 %), Lösung metallischer Spurenelemente (1 %), 1M Calciumchlorid-Lösung (0,3 %), Magnesiumsulfat-Lösung (0,3 %) und Cholesterin-Lösung (0,1 %).
9. M9-Medium: Zusammengesetzt aus Natriumchlorid (0,5 %), Dinatriumhydrogenphosphat (0,6 %), Kaliumdihydrogenphosphat (0,3 %), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (0,025 %) und doppelt destilliertem Wasser (98,575 %).
10. Triton X-Spüllösung: Enthält Triton X-100 (0,01 %) gelöst in doppelt destilliertem Wasser (99,99 %).
11. Bengalrosa-Lösung: Besteht aus Bengalrosa (0,03 %) gelöst in doppelt destilliertem Wasser (99,97 %).

3.1.2. Futterkultur E. coli

3.1.2.1. Allgemeines

Das hauptsächliche Futtermittel im Labor besteht aus *Escherichia coli*-Bakterien des Stammes OP50, einer genetisch veränderten Uracil-defizienten Mutante. Sobald der Uracilvorrat auf einer Agarplatte erschöpft ist, kann sich dieser Stamm nicht weiter vermehren. OP50 ist eine Variante des *E. coli*-Stammes K12, der nicht pathogen ist und daher für die Umwelt unbedenklich ist.

3.1.2.2. Herstellung

Zur Herstellung der Futterkultur werden 6 mL LB-Medium mit 10 µL *E. coli* in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen bei 37°C und 150 Umdrehungen pro Minute für 12–14 Stunden geschüttelt. Am nächsten Morgen wird das LB-Medium mit der Vorkultur beimpft und 8 Stunden bei 37°C und 100 Umdrehungen pro Minute mit einem Inkubationsschüttler

geschüttelt. Falls erforderlich, kann die Kultur nach 8 Stunden bei 4°C bis zum nächsten Morgen gelagert werden. Die optische Dichte (OD) der Kultur wird bei einer Verdünnung von 1:20 mit einem Photometer gemessen. Die Bakterienkultur wird zentrifugiert, gewaschen und in s-complete resuspendiert, bevor sie bei 4°C bis zu einem Monat aufbewahrt wird.

3.1.3. Aufrechterhaltung der C. elegans-Kulturen

Die Aufrechterhaltung der Flüssigkultur erfolgt unter sterilen Bedingungen. Zum Wechsel von Agar- zu Flüssigkultur werden etwa 7 Tage alte Agarplatten mit M9-Medium abgewaschen und die Nematoden zentrifugiert und gewaschen. Anschließend werden die Nematoden mit Bleiche und Natriumhydroxid behandelt, um die Eier zu isolieren, die dann in S-Complete-Medium resuspendiert werden. Damit die Isolierung der Eier erfolgreich sein kann und keine Nematodenbestandteile zurückbleiben sowie keine Eier beschädigt werden, sollte bei gelegentlichem Inspizieren durch das Mikroskop „gevortext“ werden. Die Resuspension erfolgt mit einer derart gewählten Ei-Lösung, dass eine Anzahl von 4000 Eiern erreicht wird. Die Lösung aus den Eiern, 10 mL S-Complete und 500 FAU *E. coli*-Bakterien wird nunmehr im Nematodenschrank aufbewahrt und alle vier Tage erneuert.

Abbildung 4: Sterilbank und eine standardmäßige Anordnung der Reagenzien sowie Gerätschaften für die Nematodenkulturaufrechterhaltung

3.1.4. Gerätschaften für C. elegans- und E. coli-Kulturerneuerungen

Geräte und Utensilien	Hersteller	Modell	Zweck
Sterilbank	HERASafe	Heraeus HS 15	Hygienisches Arbeiten bei Prozessen bei denen zum Herstellen von Nematodenkulturen sowie *E. coli*-Kulturen und für die Testverfahrenvorbereitung Flüssigkeiten pipettiert werden müssen
Pipetten	Eppendorf		Pipettieren
Zentrifugenröhrechen (*Tubes*)	Brand		Herstellung von zu zentrifugierenden Lösungen wie Nematodenkulturen vor Erneuerung und zum sicheren Schütteln der *E. coli*-Lösungen in Inkubationsschüttler
Schnellkochtopf	Fissler	Vitavit	Desinfektion
Zentrifuge	Universal 320 R	Hettich	Trennung von Gemischen: Vor allem das Absetzen der Nematoden am Bodenrand der *Tubes*
Erlenmeyerkolben			Ansetzen von *E. coli*-Gemischen
Inkubationsschüttler	INFORS MT	Multitron Pro	*E. coli*-Kulturpflege
Photometer	Tecan	M200 Pro	Trübeanalyse zur Herleitung der *E. coli*-Menge
T-25-Suspensionskulturflaschen			Lagerung von *C. elegans*-Kulturen
Vortex-Gerät	IKA	2	Durchmischen von Suspensionen und das ledigliche Zurückbleiben von Eiern
Glasflaschen	Duran	100 mL	Aufbewahrung von M9 und S-Complete
Messzylinder	divers		Herstellung der Reagenzien
Bechergläser	divers		Verfügbarkeit von M9 und S-Complete während Pipettiervorgang

Tabelle 1: Auflistung aller Geräte die im Zuge der Testvorbereitung für die *C. elegans* sowie dem dazugehörigen Futtermittel, den *E.-coli*-Bakterien benötigt werden

3.1.5.

3.2. Versuchsdurchführung

Es werden drei Testverfahren durchgeführt. Im ersten Test werden die Nematoden mit BPA in drei verschiedenen Konzentrationen beimpft. Im zweiten Test werden die Nematoden mit BPS in verschiedenen Konzentrationen behandelt, und der dritte Test umfasst eine hohe BPS-Konzentration, die einem LC50-Wert entspricht.

3.2.1. Direkte Testvorbereitung

Die Vorbereitung beginnt einen Tag vor Testbeginn, indem die Fadenwurmeier in eine T-25-Zellkulturflasche gegeben werden. Es wird darauf geachtet, dass keine Futterkultur, sondern

lediglich S-Complete-Medium zugeführt wird, damit die Würmer mit den gleichen Bedingungen starten und eine Synchronisierung vorliegt.

3.2.2. Auswahl der Konzentrationen

Bei all den Testverfahren wird eine NC-Gruppe verwendet. Entsprechend wird diese Konzentrationsgruppe weder mit BPA noch mit BPS beimpft. Allerdings wird soviel Ethanol hinzugegeben, dass der Wert äquivalent zum Ethanolgehalt der anderen Konzentrationen ist, damit das als Ursache für einen möglichen Parameterunterschied nicht in Frage kommt.

3.2.2.1. Test Nr. 1: BPA

Der Test mit BPA hat die Konzentrationen von cmax=12 mg/L, c=0,516 mg/L und 0,004 mg/L sowie eine Nematodengruppengröße von 15. Die größte Konzentration ist damit ungefähr 0,6 mg/L höher als die Konzentration, bei der die erste signifikante Kopfbewegungsänderung bei dem Testverfahren von Wang (2023b) festgestellt worden ist, während es bei Zhou (2016) bereits bei 220 µg/L erste deutlich signifikante *head thrashes* nach 72 Stunden bei BPA gibt. Entsprechend wird auch noch eine deutlich kleinere Konzentration, die hinzukommend dem EC_{50}-Wert beim YES-Assay-Test entspricht mit einer Konzentration von 516 µg/L gewählt (Reininger und Oehlmann 2024). Gerade um eine mögliche Verknüpfung der endokrin-disruptiven Eigenschaft in Form einer östrogenen Beeinflussung mit neurotoxischen Effekten herzustellen, scheint diese Konzentration geeignet. Hier sollen ebenfalls 15 Nematoden untersucht werden.

Die kleinste eingesetzte Konzentration ist 4 µg/L mit anvisierten zehn zu untersuchenden Nematoden. Außerdem ist 4 µg/L der Mittelwert, der beiden höchsten Konzentrationen die Bajard et al. (2023) misst und rund 1 µg/L unter dem ist, was die UBA als höchsten Wert in Deutschland angibt (Umweltbundesamt 2021). Zusätzlich messen Zhou et al. (2016) bereits signifikante *head-thrash*-Messungen bei 2,2 µg/L (<0,05), sodass auch mit 4 µg/L signifikanten Ergebnisse möglich scheinen. Die NC-Gruppe, bei der keine Konzentration BPA aufzufinden ist, hat eine Gruppengröße von 20 und der Ethanolgehalt entspricht 1,05 µg/L.

3.2.2.1. Test Nr. 2: BPS

Hier ist die maximale Konzentration 30 mg/L. In diesem Fall ist der höchste Wert der, bei dem im YES-Test ungefähr (33,2 mg/L) der EC-50-Wert festgestellt worden ist (Reininger und Oehlmann 2024, S. 7), um genauso wie bei BPA herauszufinden, ob eine endokrin wirksame Konzentration von BPS sich auf die Parameter auswirkt und so evtl. eine neuro-endokrine

Wirkung vermutet werden kann. Die andere Konzentration an BPS beträgt 8 µg/L und liegt 1,13 µg/L unter der von Bajard et al. (2023) maximalen Messung an BPS in der Umwelt. Insgesamt sollen auch 60 Nematoden beprobt werden, allerdings nur 40 mit Konzentrationen an BPS. Die restlichen 20 werden zur NC-Gruppe hinzugefügt. 20 Nematoden sollen mit 30 mg/L und die anderen 20 Tiere mit 8 µg/L BPS beimpft werden. Bei der NC-Gruppe beträgt der Ethanolgehalt 1,13 µg/L.

3.2.2.1. Test Nr. 3: Maximale BPS-Exposition

Bei diesem Test gibt es nur eine Konzentration, sodass zwei Testgruppen entstehen: die NC-gruppe und die 500- mg/L-BPA-Gruppe. Angestrebt sind 30 Fadenwürmer je Gruppe zu beimpfen, sprich 60 Wells mit Nematoden zu belegen. Die NC-Gruppe wird zudem mit 25 µg/L an Ethanol beimpft, um der ebenfalls so hohen Konzentration im BPS-Mastermix gerecht zu werden.

3.2.3. Mastermixgemische

Am nächsten Tag gilt es die entsprechenden Konzentrationen der Mastermixanfertigungen für die verschiedenen Testgruppen, „NC“, „maximale Konzentration“ und „Verdünnungsreihe“, richtig zu erstellen. Dabei besteht der Mastermix für die maximale Bisphenol-Konzentration aus der Bisphenol-Lösung, welche sich aus Ethanol und dem Bisphenol (*stock* solution) zusammensetzt, S-Complete und *E. coli*-Futtermittellösung und der für die NC-Gruppe aus den gleichen Inhaltsstoffen, nur dass statt dem zu testenden Bisphenol die entsprechende Menge an Ethanol diesem zugeführt wird. Der Mastermix für die Verdünnungsreihe muss in seinen Konzentrationen so errechnet werden, dass nach jeweiligem Pipettieren des Mastermixes des Bisphenols die richtige Konzentration von diesem übrigbleibt. Entsprechend ist in diesem Mastermix anfänglich kein Bisphenol, sondern lediglich eine ebenfalls errechnete Menge an S-Complete sowie Futtermittel zu geben. Die Berechnung wird mithilfe eines Excel-Tools gemacht.

Sind die Mastermix-Gemische hergestellt, werden sie im Ultraschall-Wasserbad bei 38 °C für 15 min behandelt, um eine BPA bzw. BPS besser in Ethanol lösen zu können (Vgl.(Xiao et al. 2019)). Nun wird die 96-Well-Platte vorbereitet, indem in jedes sich im Inneren der Platte befindenden Well, was für das Einsetzen eines Fadenwurms bestimmt ist, 29 µL an S-Complete vorgelegt wird. In die sich am Rand befindenden Wells wird 150 µL destilliertes Wasser gegeben.

3.2.4. Einsetzen der Fadenwürmer in 96-Well-Platte

Die Fadenwürmer sind im L-1-Stadium am Folgetag nach mind. 20 Stunden Ruhezeit einzusetzen, um das komplette Schlüpfen zu gewährleisten. Dafür werden die Nematoden samt S-Complete-Medium in eine Petrischale überführt. Dann werden unter dem Leica-Mikroskop M165 FC mit einer Eppendorf-Pipette mit einem Volumenbereich von 0,5-10 µL jeweils ein Fadenwurm gepickt. Dabei beträgt das eingestellte Volumen 1 µL und das Mikroskop wird auf die maximale Vergrößerung eingestellt. Um das Erfassen und Ablassen von jeweils einem Nematoden zu gewährleisten, wird die Pipette vorher jeweils in Triton 100x getaucht, damit der Nematode mit einer kleineren Wahrscheinlichkeit am Rand der Pipettenspitzen hängen bleibt. Nach Erfassen eines Fadenwurms wird dieser in das entsprechende Well gesetzt, sodass die zu belegenden Wells 30 µL an S-Complete und Nematoden beinhalten.

3.2.5. Zugabe der Mastermix-Gemische

Nun wird zuerst mithilfe der Verdünnungsreihe und den entsprechenden Mastermix-Gemischen die richtigen Konzentrationen an Bisphenol hergestellt. Dies geschieht in den Tubes, könnte aber auch bei kleineren Testverfahren in der Platte selbst gemacht werden. In die entsprechenden Wells werden anschließend 120 µL an Negativ-Kontroll-Gemisch oder der jeweiligen Bisphenolgemische gegeben, sodass sich nun in jeglichem Well 150 µL an Flüssigkeit befindet.

3.2.6. Expositionsdauer

Um eine maximale Einwirkungsintensität auf die Nematoden zu gewährleisten, verweilen die Nematoden etwas unter 72 Stunden im Nematodenschrank.

3.2.7. Screening mit Leica-Mikroskop-Apparat

Die Videosequenzen sind mit der zum Mikroskopapparat von Leica gehörenden Kamera zu machen. Dabei ist die Rolle der Beleuchtung, aber auch der Verweildauer unter dem Licht entscheidend. Auf der einen Seite darf die Beleuchtung nicht zu gering sein, da sonst die Nematoden nicht klar erkennbar sind, auf der anderen Seite reagiert *C. elegans* auch in seinem Verhalten bzw. konkret in seinen Kopfbewegungen auf das Licht (DeBardeleben et al. 2017; Magalhaes Filho et al. 2018). Um diesen Stressfaktor zu minimieren, wurde die Lichtintensität so gering wie möglich gehalten. Da jedoch, je nach Lage des Wells die Beleuchtung durch die Umstände verschieden ist, muss abgewogen werden, ob die Beleuchtung nicht leicht verändert werden sollte, was entsprechend gelegentlich so gehandhabt wird.

Die Videodauer ist dabei immer auf 20 Sekunden eingestellt und die Bildrate beträgt 30 Bilder pro Sekunde. Jedes Video bekommt neben der Bezeichnung der Testsubstanz (BPS oder BPA) auch noch die Well-Bezeichnung in den Dateinamen eingetragen. Mithilfe des „*Quantify-Tools*“ von Leica kann schließlich die Körperlänge des Fadenwurms gemessen werden, indem man eine Linie entlang des Nematodenkörpers zieht. Diese Länge wird mit in den Dateinamen eingetragen.

3.2.8. Gerätschaften zum Testverfahren

Geräte und Utensilien	Hersteller	Modell	Zweck
Ultraschallbad	Bandelin	Sonorex RK 100 H	Verbesserte Lösbarkeit von Bisphenolen in Ethanol
96-Well-Mikrotitierplatten	Greiner		Durchführung der Testverfahren
Mikroskop 1	Leica	DMC 5400	Erkennung der Nematoden zum Herauspicken für 96-Well-Platte
Mikroskopapparat			Auswertung der Testverfahren
Mikroskop 2	Leica	DMi8	Erkennung der Nematoden bei Testauswertung (in 50-facher, 100-facher, 200-facher sowie 400-facher Vergrößerung)
Kamera	Leica	DFC 9000 GT	Bildtransfer in sCMOS-Qualität an Computer sowie LAS-X-Software
Software	Leica	LAS-X	Längenmessung mittels Analysetools und Videoaufzeichnung
Externe Kaltlichtquelle	Schott	KL 1600 LED	Ersatzlichtquelle für Mikroskop mit flexiblem Lichtleiter

Tabelle 2: Auflistung aller Geräte die im Zuge der Testvorbereitung für die *C. elegans* sowie dem dazugehörigen Futtermittel, den *E.-coli*-Bakterien benötigt werden

3.3. Testauswertung

3.3.1. Längen

Die aus dem Dateinamen zu entnehmenden Größen werden in eine Excel eingetragen, welche nach Wells sortiert ist. Aus den verschiedenen Längen wird dann der Mittelwert jeweils von jeder Testgruppe errechnet, um die Konzentrationsgruppen miteinander in der Länge zu vergleich und zu erkennen, ob eine Varianz vorliegt und ob aus dieser Muster erkannt werden können.

3.3.2. Head thrashes

3.3.2.1. Definition

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, zu definieren, wann eine Kopfbewegung einen zählenswerten *head thrash* ausmacht. Generell lässt sich sagen, dass mit fortschreitendem Alter die Kopfbewegungen generell kleiner zu werden scheinen (Zhang et al. 2022). Nun gilt es die verschieden großen und kleinen Kopfbewegungen zu messen. Ein *head thrash* wird gezählt, wenn der Kopf sich zur Seite und dann zur Mitte zurückbewegt. Längere Verharrungen im angewinkelten Zustand und anschließende Bewegungen zählen ebenfalls als neuer *head thrash*.

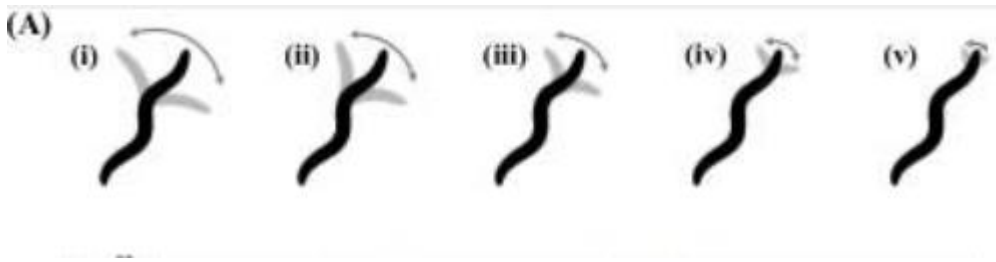


Abbildung 5: Die verschiedenen Ausschläge der Kopfbewegungen von *C. elegans* (Zhang et al. 2022)

3.3.2.2. Visuelle Auswertung

Bei der visuellen Auswertung bzw. beim manuellen Zählen der Kopfbewegungen wird jedes Video über den VLC-Player (Version 3.0.18) geöffnet, in 0,25-facher bis zu minimal 0,1-facher Geschwindigkeit abgespielt und die Kopfbewegungen gezählt. Dies wird zweimal ausgeführt, wobei beim ersten Mal jegliche Kopfbewegungen und beim zweiten Mal lediglich solche von großem Ausmaß bzw. Winkel entsprechend (iii) bei Abb. 5 aufgenommen werden. Dabei wird insbesondere auf den Part der Pharynx geachtet (s. Abb. 6). Bei großen *head thrashes* sollte sich dieser Part des Kopfes mitbewegen.

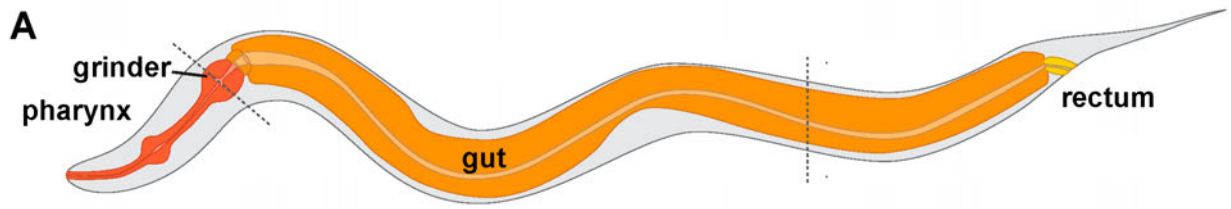


Abbildung 6: Darstellung von *C. elegans* Verdauungstrakt inklusive der Pharynx (Cohen und Sundaram 2020)

Die Anzahl wird in einer Excel-Tabelle aufgelistet, wobei jedes Well entsprechend zwei Spalten bekommt.

3.3.2.3. Automatisierte Auswertung

Als Programmiersprache wird Python verwendet, wobei die Ausführung über Google Colab erfolgt, weil hier über eine Cloud eine besonders leistungsstarker Grafikprozessor in Form einer GPU (*Graphics Processing Unit*) bzw. der Google-eigenen Variante TPU (v. 2-8) („***T**ensor **P**rocessing **U**nit*“) und ein größerer Arbeitsspeicher (RAM – *Random-Access Memory*) verwendet werden kann (Google Colab 2024; Carneiro et al. 2018). Dies bedeutet auch, dass alle Ordner und Daten inklusive des Videomaterials, die zur Videoanalyse benötigt werden, auf die Google-Drive-Cloud hochgeladen werden müssen.

```
[5]  1 from google.colab import drive
     2
     3 drive.mount('/content/gdrive')
```

Abbildung 7: Programmausschnitt für Zugang durch Colab/Python zum Google-Drive-Konto

3.3.2.3.1. Automatisierte Fadenwurmerkennung durch Training

Im Python Programm selbst werden die Bibliotheken Os („***O**perating **S**ystem*“) und YOLOv8 („***Y**ou **O**nly **L**ook **O**nce*”) verwendet.

Erstere dient dazu, auf Ordner zugreifen sowie Ordner erstellen und dort die richtigen Dateien speichern zu können.

YOLOv8 von „Ultralytics“ wird zum Trainieren der Kopferkennung verwendet (GitHub 2024). Dabei ist das folgende Schema anzuwenden: Es wird eine Ordnerstruktur angelegt, bei der es zwei Ordner *„images“* und *„labels“* gibt, in denen jeweils wieder zwei Ordner angelegt werden mit den Titeln *„train“* und *„val“* (für engl. *validate*). Nun werden auf den Ordner *„images“* in *„train“* Bilder von Videos der BPA-Sequenzen hochgeladen und auf den Ordner *„train“* entsprechende Bilder von BPS-Videos (GitHub 2024). Die einzelnen Bilder aus dem *„train*“-Ordner sind einzelne Frames aus den 20-sekündigen und aus knapp über 600 bestehenden Frames bestehenden Videos und werden mithilfe eines Python-Programmtextes in Form eines einzelnen Frames erstellt (der Programmtext befindet sich im Anhang).

Die „*labels*“-Ordner dienen den Dateien, welche die Positionen der drei zu den Bildern gehörenden Boxen definieren, in denen sich erstens der Fadenwurm, zweitens der Kopf und drittens der Schwanz befinden.

Jedes Bild, welches immer für genau ein Video steht, bekommt entsprechend eine gleichnamige Datei mit den Labeln zugeordnet. Diese Dateien sind „Editor-Text“-Dateien. Das Erstellen der entsprechenden Boxen wird auf der kostenlos zugänglichen Webseite ‚https://www.cvat.ai‘ durchgeführt (Computer Vision Annotation Tool 2024). Dabei werden die drei Klassen „*worm*“ (0) „*head*“ (1) und „*tail*“ (2) erstellt und beim „*Labeling*“ in den Textdateien in Form der entsprechenden Nummer angegeben (s. Abb. 8). Dabei fungieren die Gleitkommazahlen als Angaben, wo sich die Box befindet – Die ersten zwei Zahlen geben das Center der Box an, während die dritte und die vierte Zahl die Höhe und Breite der Box definieren (Felipe T. 2023b, 00:23:40) . Die Klassennamen werden dem YOLO-Algorithmus in Form einer YAML-Datei zugespielt (s. Abb. 9) (Felipe T. 2023b, 00:35:40).

Datei Bearbeiten Ansicht

```
1 0.678125 0.350625 0.046250 0.106250
0 0.464375 0.521875 0.481250 0.453750
2 0.257500 0.716250 0.065000 0.065000
```

Abbildung 9: *Label*-Text-Datei erstellt auf cvat.ai

Datei Bearbeiten Ansicht

```
path: ../gdrive/My Drive/YOLO/Normal_labeling/data
train: ../images/train
val: ../images/val

names:
 0: worm
 1: head
 2: tail
```

Abbildung 8: YAML-Datei als YOLOv8-Algorithmus-Anleitung, welche Ordnerpfade für Training und welche Klassen für welches Label zu wählen sind (Felipe T. 2023a, 2023b)

Nach entsprechender Trainingsalgorithmusausführung wird im Ordner „YOLO“ in der Ordnerstruktur …/runs/detect/… für jeden Trainingsdurchlauf ein „*train*“-Ordner erstellt. In diesem sind die Resultate der Erkennungserfolge entnehmbar genauso wie die „*confusion_matrix_normalized*“, in der die Wahrscheinlichkeiten („*confidences*“) zur Erkennung der Klassen entnehmbar sind. Außerdem ist in jedem „*train*“-Ordner ein weiterer Ordner mit dem Namen „*weights*“, in dem sich die Dateien „best.pt“ und „last.pt“ befinden. Ersterer wird

für die weitere Verwendung in weiteren Programmtexten (*codes*) verwendet, um die YOLO-Erkennungsdaten zu übernehmen.

3.3.2.3.2. Automatisiertes Zählen

Im Python Programm zum automatisierten selbst werden folgende Bibliotheken verwendet: OpenCV ("***Open*** *Source* ***C****omputer* ***V****ision Library"*), NumPy ("***N****umerical* ***P****ython"*), os („***o****perating* ***s****ystem*"), YOLOv8 („***Y****ou* ***O****nly* ***L****ook* ***O****nce*") und pandas („***pa****nel* ***da****ta*").

OpenCV dient dabei der gesamten Videoverarbeitung von Einlesen des Videos sowie der einzelnen Frames bis hin zum Erstellen der Box, die den Fadenwurmkopf einrahmt. NumPy wird verwendet, damit die Rechenprozesse, konkret dem Zählen der Frames sowie der Kopfbewegungen, erfolgen kann. Hier dient „os" vor allem dem Zugriff vom Algorithmus auf Videodateien, aber auch auf Dateien wie die „best.pt"-Datei. Genauso wird YOLO in Form der YOLOv8-Version gebraucht, damit die Wurmerkennung bzw. Kopferkennung mithilfe des Models und der „best.pt"-Datei funktionieren kann. Damit die Daten auch noch übersichtlicher in einer Excel ausgegeben werden können, wird „pandas" verwendet. Dafür wird genauso wie „ultralytics" wie „pandas openpyxl" mittels pip über die Konsole oder wie hier vorliegend direkt mit !pip über den Code installiert.

Zur Optimierung werden zwei KI-„Chatbots" (KI=Künstliche Intelligenz) Gemini und ChatGPT 4.0 hinzugezogen.

Der Programmtext ist im Anhang ersichtlich. Vor der Code-Durchführung ist auf jeden Fall eine leistungsstarke GPU wie A-100-GPU oder die TPU zu aktivieren, da so die Bearbeitungszeit von 40 min bis zu 1 h auf weniger als 8 min reduziert werden kann. Bei Durchführung wird jedes Frame jedes Videos durchgegangen und das Vorhandensein von „*worm*", „*head*" und „*tail*" überprüft und ob Kopfbewegungen zu verzeichnen sind. Dabei ist das „*center*" einer jeden Box ausschlaggebend für die Kopfposition und der „*threshold*"- Wert entscheidend für das Ausmaß der Kopfbewegung. Es werden einmal die großen Kopfbewegungen und die gesamte Anzahl an Kopfbewegungen ausgewertet, wobei der „*threshold*"-Wert für die großen Kopfbewegungen doppelt so groß ist. Die Resultate werden zudem über den Tracker von „Ultralytics" erzielt. Hinzukommend wird der Anteil der Frames in Prozent ausgegeben, in denen kein Kopf erkannt wird, was immer dann der Fall ist, wenn keine Bewegung erkannt worden ist. In manchen Frames können auch mehrere Köpfe erkannt werden. Dafür ist eine „*if*"-Anweisung eingebaut, dass bei mehreren Köpfen, der Kopf mit der höchsten „*confidence*" zu Rate gezogen wird.

Schlussendlich wird die Excel in dem Zielordner erstellt, die den gewünschten Namen bekommen soll (hier: ‚fr1_th7_head_movements_results.xlsx')

3.4. Statistische Analyse

3.4.1. Signifikanz-Analysen

Als Analyseprogramm wird R in der Version 4.1.1 und als graphische Benutzeroberfläche RStudio verwendet. Dabei wird immer so vorgegangen, dass zuerst die parametrischen Signifikanz-Analysen, sprich ANOVA mit unabhängigen Variablen oder der T-Test, angestellt werden, bevor schließlich die nicht-parametrischen Tests, also entweder beim Testverfahren mit zwei Konzentrationen der Mann -Whitney -U-Test oder bei mehreren der Kruskal-Wallis-Test herangezogen wird.

Dabei wird jeder Testparameter Länge, totale Anzahl an *head thrashes* und Anzahl an großen *head thrashes* separat getestet, sodass insgesamt neun Signifikanzanalysen vollzogen werden müssen. Die Signifikanzen der *Head-thrashes*-Messungen durch den Algorithmus werden vorerst nicht bestimmt.

3.4.1.1. ANOVA und T-Test

Die Voraussetzungen der ANOVA und des T-Tests sind eine Normalverteilung und eine Varianzhomogenität. Die Normalverteilung wird mittels des Shapiro-Wilk-Tests aber auch mithilfe von Histogrammen aufgezeigt. Beim Shaprio-Wilk-Test ist die Nullhypothese, dass die Normalverteilung nicht gegeben ist. Sollte der p-Wert also größer als 0,05 sein, ist die Nullhypothese widerlegt und stattdessen kommt die Arbeitshypothese zum Greifen, dass eine Normalverteilung vorliegt. Die Varianzhomogenität-Analysen erfolgen durch den Fligner-Killeen-Test und zusätzlich durch eine Gegenüberstellung der quadrierten Standardabweichungen. Diese werden in R durch die *library* „Psych“ und die Ausgabe „DefineBy“ ermittelt. Beim Fligner-Killeen-Test ist die Nullhypothese, dass die Varianzen unterschiedlich sind. Sollte der p-Wert also größer als 0,05 sein, ist die Nullhypothese widerlegt und stattdessen gilt die Arbeitshypothese, dass Varianzhomogenität herrscht.

Der t-Test, welcher für zwei Gruppen lediglich möglich ist, und die ANOVA-Analyse, welche drei oder mehr Gruppen zulässt, vergleichen die Mittelwerte der Gruppen und stellen so eine Signifikanzkontrolle dar. Beim t-Test ist noch eine Bonferroni-Korrektur durchzuführen.

3.4.1.2. Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test

Die nicht parametrischen Testverfahren, konkret Mann-Whitney-U- oder auch Wilcoxon-Test und der Kruskal-Wallis-Test beschäftigen sich nicht mit dem Mittelwert, sondern analysieren Rangsummen. Die Durchschnittsränge werden schlussendlich miteinander verglichen.

4. Ergebnisse

4.1. Körperlängen

4.1.1. Test Nr. 1: BPA-Test

Die NC-Gruppe ist im Durchschnitt kleiner als die Gruppen mit BPA-Konzentration. Jedoch ist auch die höchste Konzentration mit 12 mg/L im Durchschnitt rund 100 µm kleiner als die beiden geringeren Konzentrationen, wenn auch ca. 60 µm größer als die NC-Gruppe. Dabei sind die Varianzen der Körperlängen aller Gruppen signifikant zur NC-Gruppe jedoch nicht untereinander.

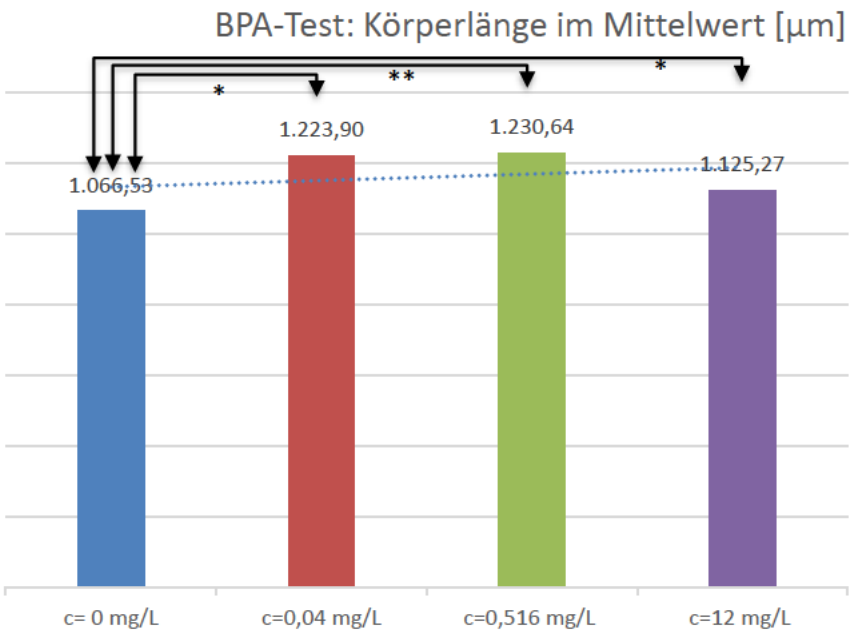


Abbildung 10: Die durchschnittliche Körperlänge nach BPA-Exposition - *signifikant (p<0,05); **hoch signifikant (p<0,01); ***höchst signifikant (p<0,001)

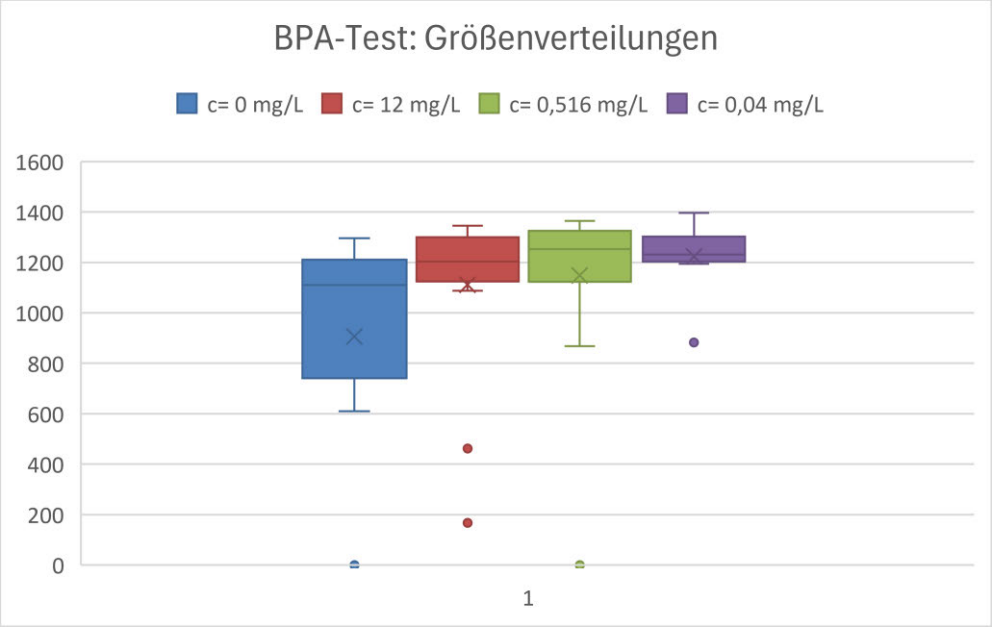


Abbildung 11: Längenverteilungen der verschiedenen BPA-Konzentrationsgruppen sortiert nach der Länge (y-Achsenbeschriftung fehlt!) Erläuterung des Box-Whisker-Plots: X = ; Box = , Whisker =) (bitte auch bei weiteren Grafiken anpassen)

Konzentration [mg/L]	**0**	**0,004**	**0,516**
0,004	0,0134		
0,516	0,0031	0,4043	
12	0,0427	0,2519	0,1576

Tabelle 3: Die verschiedenen p-Werte je Konzentration im Vergleich

4.1.2. Test Nr. 2: BPS-Test mit geringeren Konzentrationen

Bei BPS unterscheiden sich die Längen bei den eingesetzten Konzentrationen nicht signifkant. Die Längendifferenz zwischen der NC-Gruppe und der geringen Konzentration von 8 µg/L beträgt 3 µm (nicht signifikant (p=0.09172)).

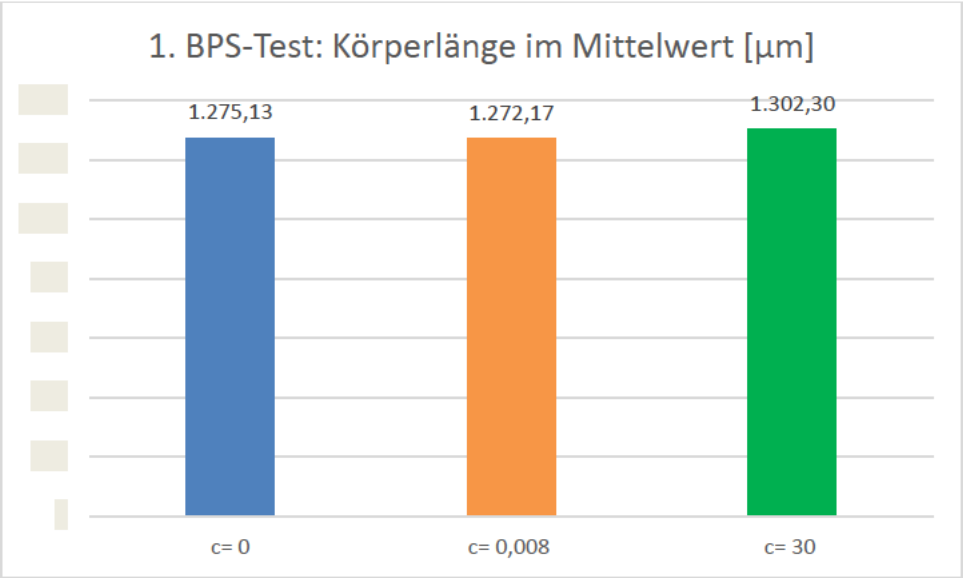


Abbildung 12: Durchschnittslängen von C. elegans bei geringeren BPS-Konzentrationen

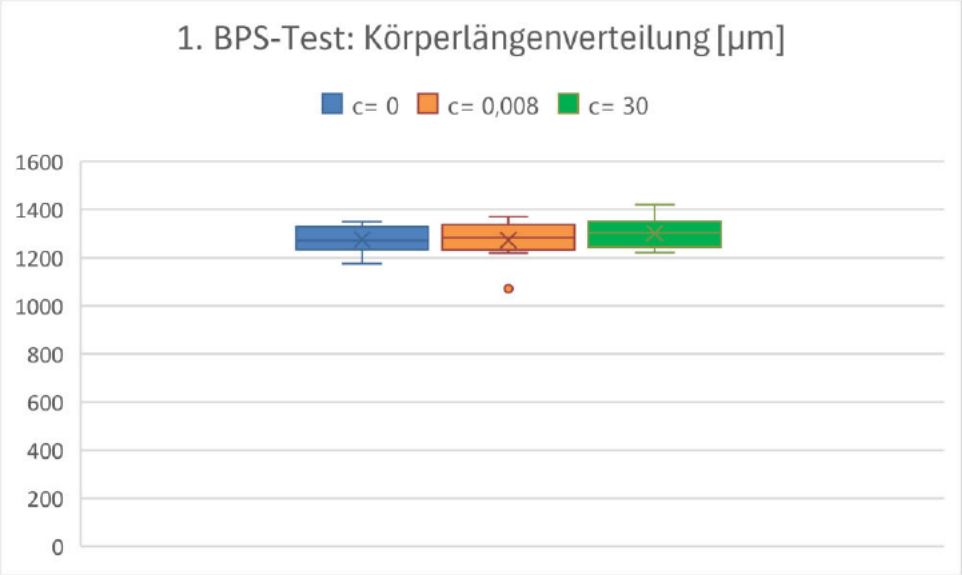
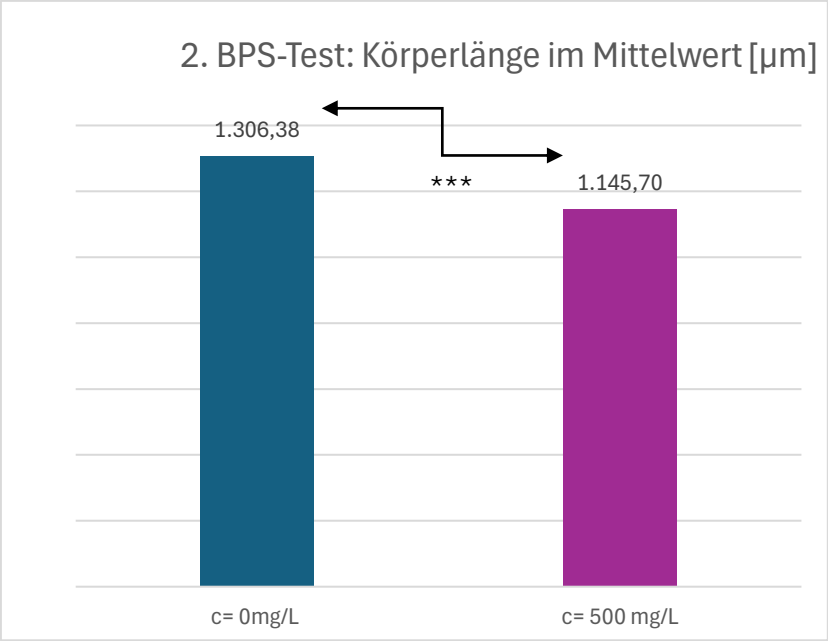


Abbildung 13: Längenverteilungen der BPS-Konzentrationsgruppen

4.1.3. Test Nr. 3: BPS mit maximaler Konzentration

Was die Längenunterschiede betrifft sind mithilfe des t-Tests signifikante Unterschiede festzustellen. Im Durchschnitt sind die mit BPS beimpften Nematoden nach Durchlauf der

juvenilen Stadien rund 150 µm signifikant (p=4,219x10^{-10}(t-Test)) kleiner als die *C. elegans*-Nematoden der NC-Gruppe.



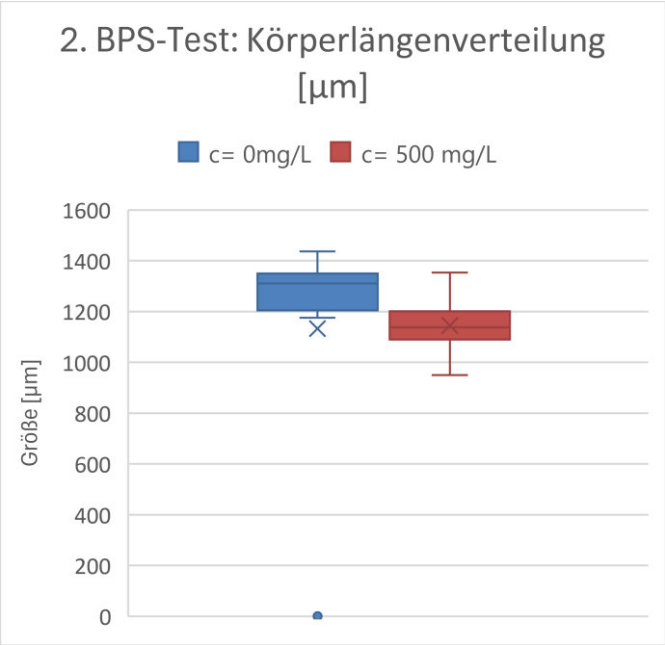


Abbildung 14 a) und b): a) Die durchschnittliche Länge nach hoher BPS-Exposition – *signifikant (p<0,05); **hoch signifikant (p<0,01); ***höchst signifikant (p<0,001)

b) Verteilung der Körperlängen über die beiden Gruppen hinweg

4.2. Head thrashes

4.2.1. Durch manuelles Zählen

4.2.1.1. Test 1: BPA-Test

Betrachtet man alle Kopfbewegungen, so hat die NC-Gruppe mit 31,2 am meisten *head thrashes*. Bei der geringsten Konzentration sind weniger als die Hälfte der Kopfbewegungen mit 14,7 messbar, während die dann mit steigender Konzentration relativ konstant im Mittel bis auf 24,3 Kopfbewegungen bei 12 mg/L zunehmen. Die Signifikanz der Unterschiede ist nach Kruskal-Wallis-Test bei allen Kopfbewegungen mit p=0,04 und bei den großen Kopfbewegungen mit 0,024 gegeben. Die Kopfbewegungen der NC-Gruppe unterscheidet sich stark signifikant von der geringsten Konzentration von 4 µg/L und signifikant von der mittleren Konzentration

von 516 µg/L, aber nicht von der höchsten Konzentration, 12 mg/L. Von dieser Gruppe unterscheidet sich lediglich signifikant die 4-µg/L-Gruppe.

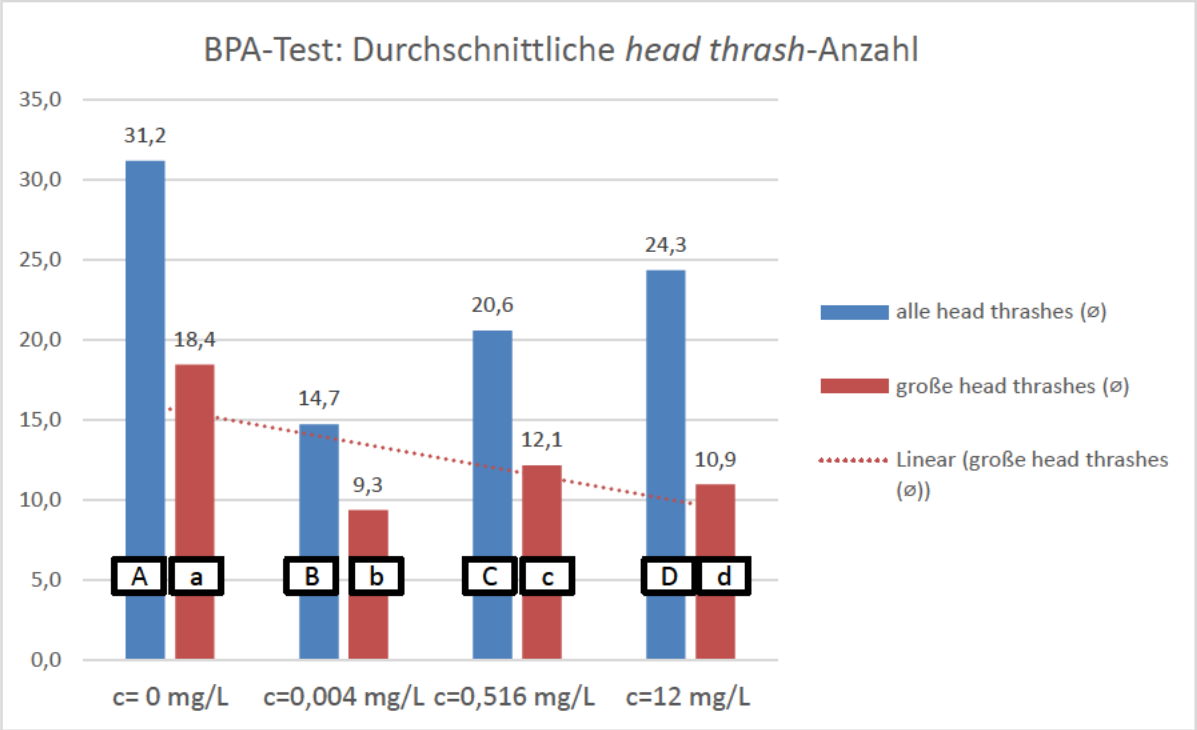


Abbildung 15: Die *Head-thrash*-Anzahl im Vergleich beim BPA-Test - Dabei sind signifikant: bei allen *head thrashes*: A-B (**), A-C (*), A-D (*); bei großen *head thrashes*: a-b (*), a-c (*)

*signifikant (p<0,05); **hoch signifikant (p<0,01); ***höchst signifikant (p<0,001)

Auch bei den großen *head thrashes* hat die NC-Gruppe am meisten Kopfbewegungen, allerdingst hat die Gruppe mit der Konzentration 516 µg/L mehr Kopfbewegungen als die höchste Konzentration. Aufgrund fehlender Normalverteilung ist eine ANOVA-Varianzanalyse nicht möglich. Stattdessen ergibt der Kruskal-Wallis-Test eine Signifikanz mit p=0,024, wobei

der Dunn-Test als Post-hoc-Test zeigt, dass Signifikanz zwischen drei Gruppen herrscht (s. Abb. 15).

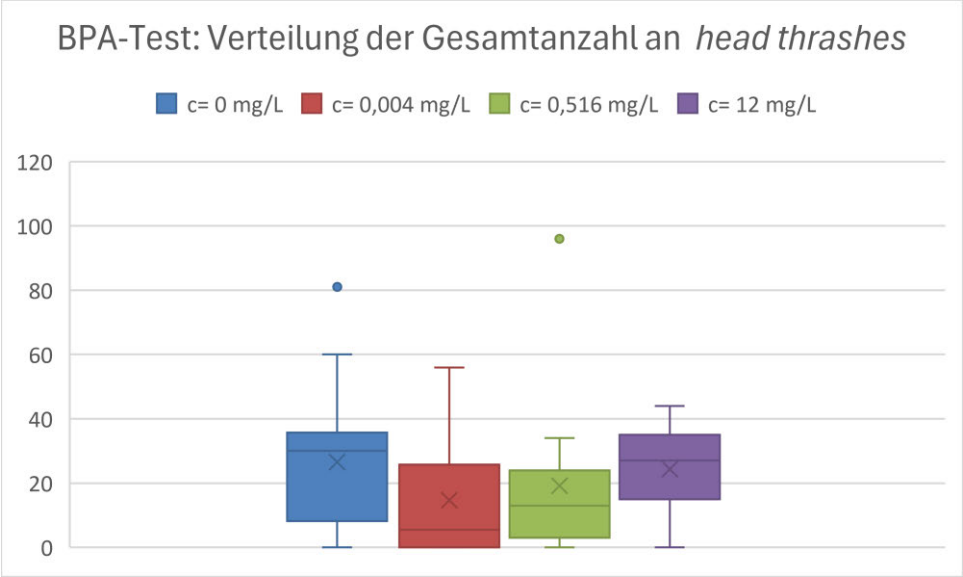


Abbildung 16: BPA-Test: Verteilung der Gesamtanzahl an *head thrashes*

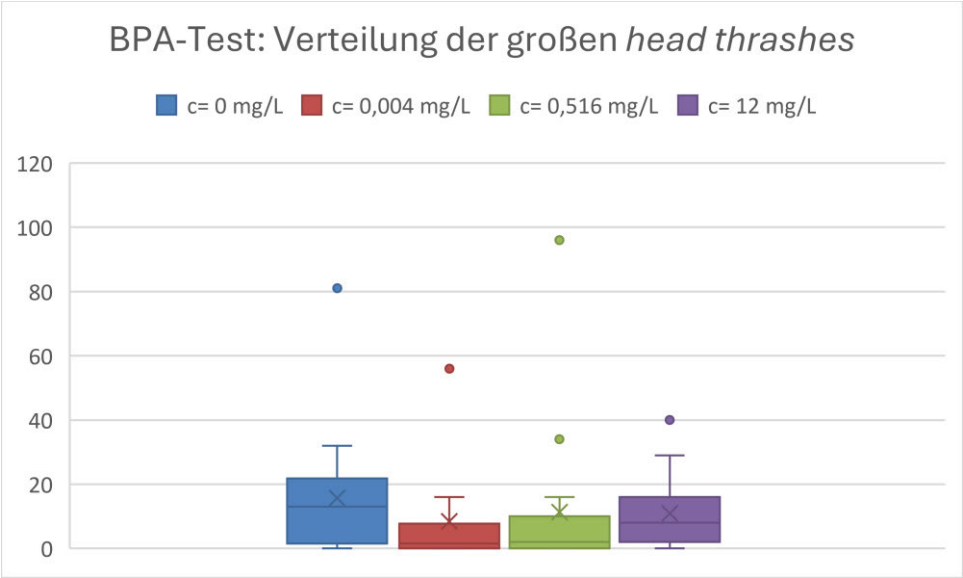


Abbildung 17: BPA-Test: Verteilung der Anzahl an großen *head thrashes*

4.2.1.2. Test 2: BPS-Test mit geringeren Konzentrationen

Bei geringeren Konzentrationen von BPS sind bei der gesamten *Head-thrash*-Auswertung keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Gruppen ist sowohl bei der gesamten Anzahl (nach Kruskal-Wallis: chi-squared = 2.7311, df = 2, p-value = 0.2552) als auch bei den großen (nach Kruskal-Wallis chi-squared = 5.7149, df = 2, p-value = 0.05742) herausgekommen.

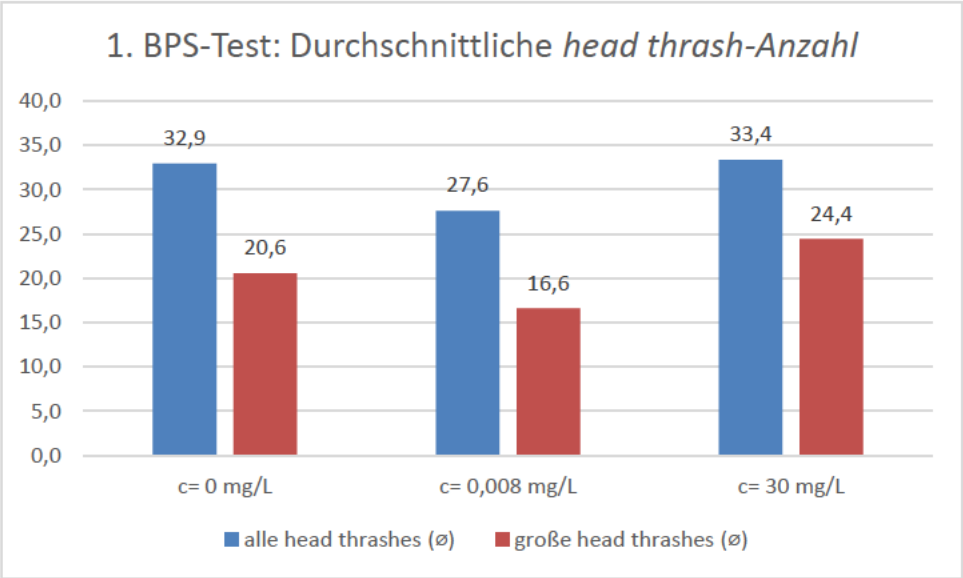


Abbildung 18: Durchschnittliche *Head-thrash*-Anzahl beim 1. BPS-Test ohne signifikante Unterschiede

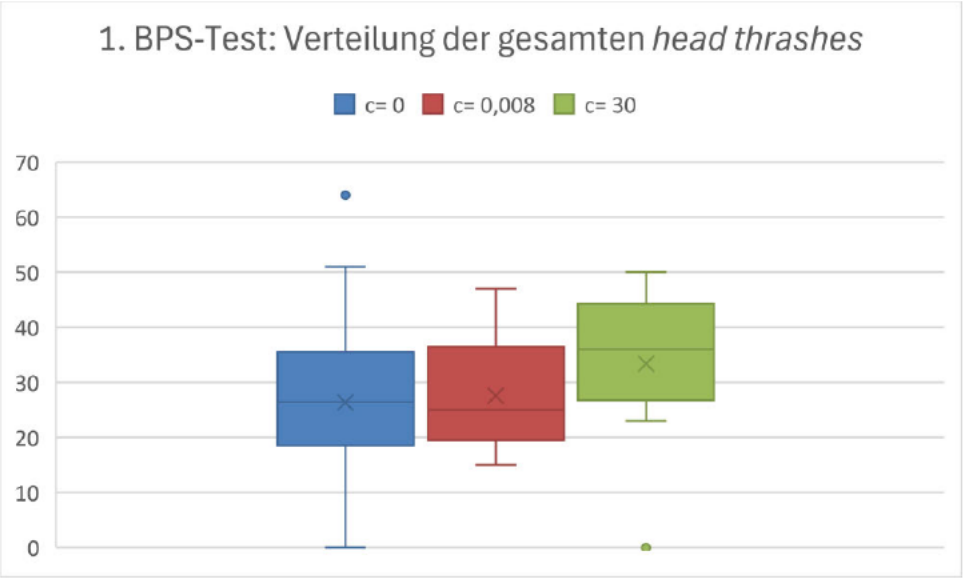


Abbildung 19: Verteilung der Anzahl der gesamten *head thrashes* beim 1. BPS-Test

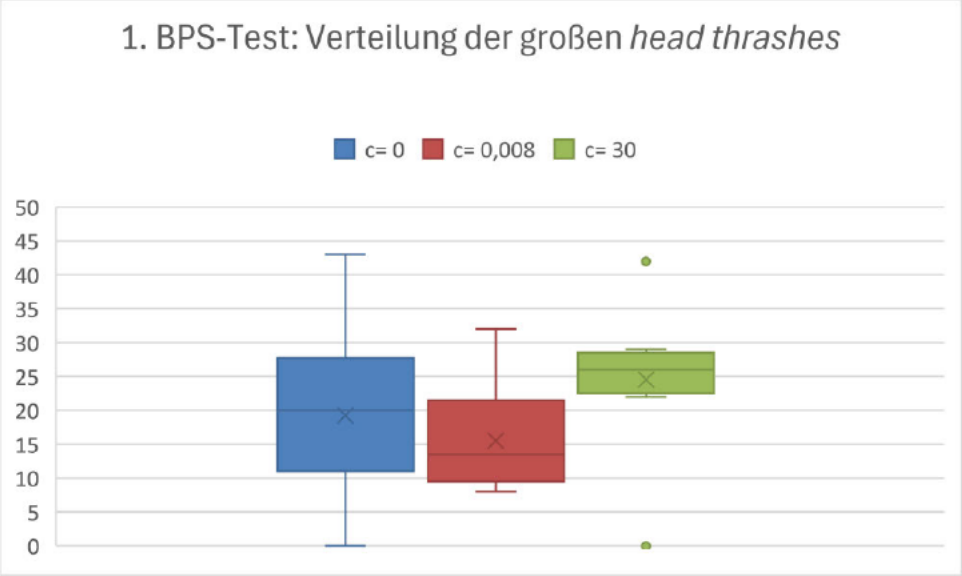


Abbildung 20: Verteilung der Anzahl der großen *head thrashes* beim 1. BPS-Test

4.2.1.3. Test 3: BPS-Test mit maximaler Konzentration

Sowohl in NC-Gruppe als auch bei der Gruppe mit 500 mg/L ist die Anzahl an allen *head thrashes* ungefähr doppelt so groß. Außerdem ist die Anzahl an *head thrashes* bei der NC-Gruppe jeweils kleiner. Was die Signifikanz betrifft, so sind lediglich die Durchschnittsmengen der gesamten *head thrashes* (p=0,012 und; bei den großen p=0,128) signifikant zueinander.

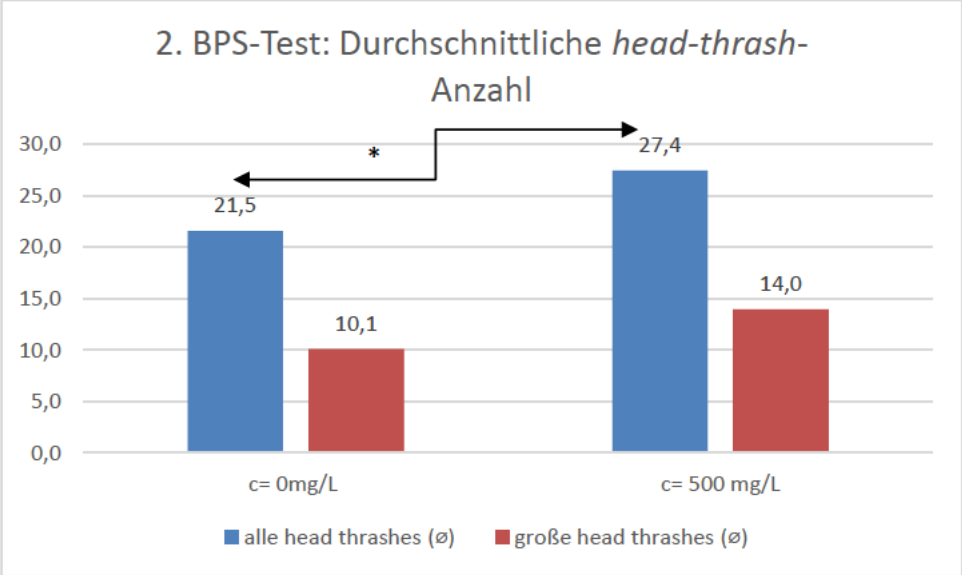


Abbildung 21: Durchschnittliche *head-thrash*-Anzahl beim 2. BPS-Test

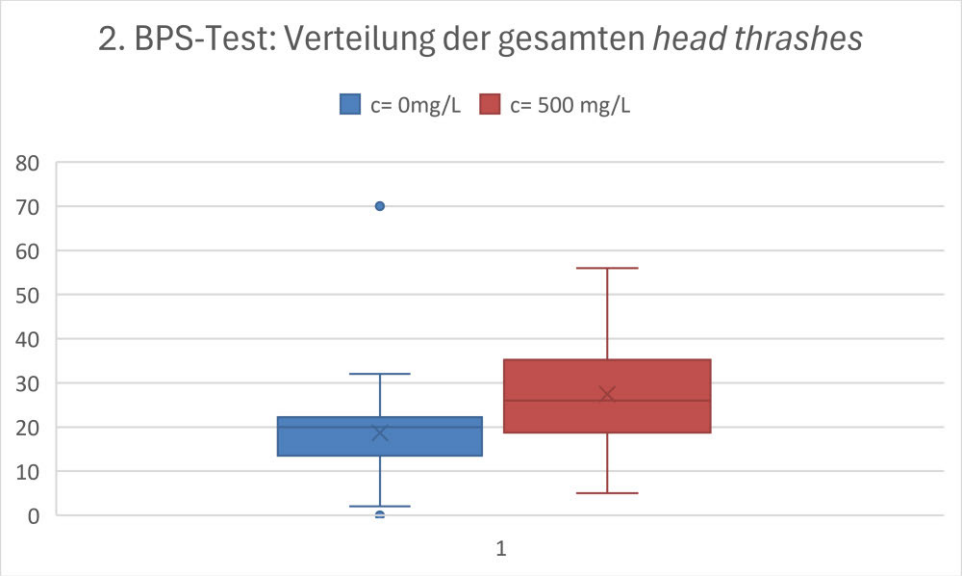


Abbildung 22: Verteilung der gesamten *Head-thrash*-Anzahl beim 2. BPS-Test

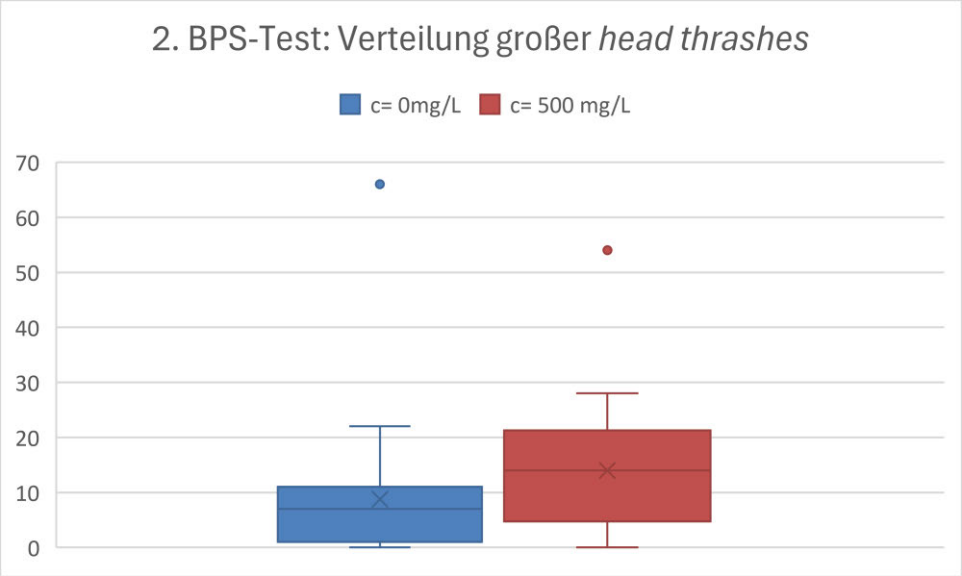


Abbildung 23: Verteilung der großen *head thrashes* beim 2. BPS-Test

4.2.2. Automatisierte *Head-thrashes*-Auswertung

4.2.2.1. Durchschnittliche Kopferkennungsquote und *„Threshold“*-Bestimmung

Der *threshold* für die gesamte Anzahl an Kopfbewegungen ist auf 7 eingestellt und der für große Kopfbewegungen entsprechend bei 14. Die Einstellung orientiert sich dabei an einem Video aus dem BPA-Testverfahren: Beim vom Well B3 gemachten Video, bei dem zu 95 % der Kopf von *C. elegans* erkannt wurde. Entsprechend wird der Wert der gesamten Anzahl an *head thrashes* aus

der visuellen Auswertung als Referenz zur Bestimmung des Grenzwertes herangezogen und das Programm erkennt mit einem *threshold* von ‚7' 28 Kopfbewegungen, während dieser Wert bei der visuellen Auswertung sich auf 33 bemisst. Das liegt nächsten verglichen mit anderen *thresholds*, die ausprobiert worden sind.

Bei BPA wird im Durchschnitt der Kopf in 49.6 % der Frames erkannt.

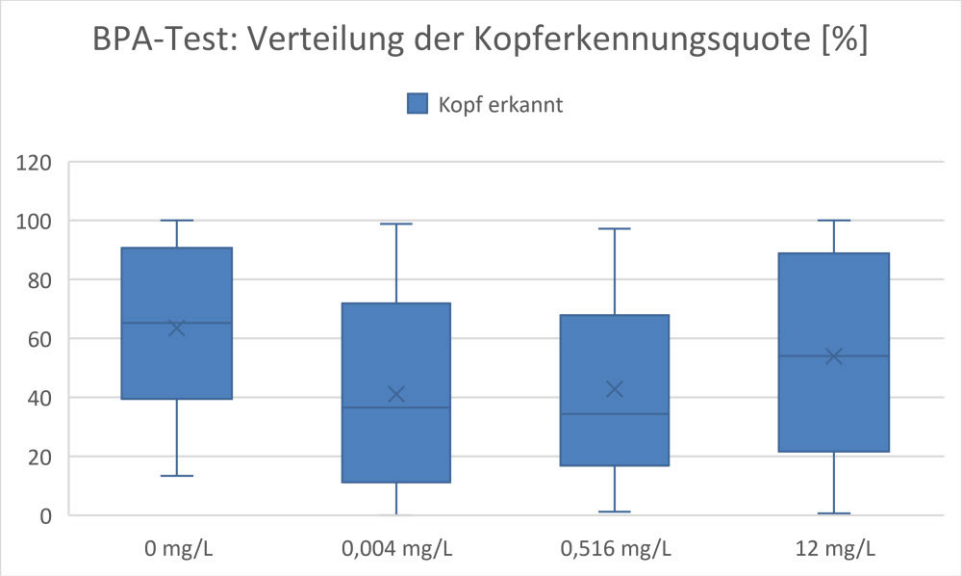
Beim BPS-Test mit mehreren Konzentrationen bemisst sich diese Quote auf 36,15 % und beim Test mit nur einen hohen BPS-Konzentration liegt sie bei 35,76 %.

4.2.2.2. Verteilung der Kopferkennungsquoten sowie Unterschiede bei der Auswertung

Dabei geben die Kastendiagramme die Verteilung an (s. Abb 24 bis 26). Die durchschnittliche Kopferkennungsquote ist beim horizontalen Strich innerhalb des Kastens ersichtlich. Während beim BPA-Test Kopferkennungsquoten (KEQ) von 0 bis über 95 % bei jeder Gruppe ersichtlich sind, variieren die Werte beim 1. BPS-Test bei den Gruppen mit BPS-Konzentration zwischen 0 und 60 % und beim 2. BPS-Test zwischen 0 und knapp unter 90 %.

Beim BPA-Test bleiben 29 (12: NC-Gruppe; 4: 0,004 mg/L; 5: 0,516 mg/L; 8: 12 mg/L) Probenergebnisse zurück, wenn man nur jene berücksichtigt, die über 50 % Kopferkennung aufweisen, während beim 1. BPS-Test es insgesamt 10 (7: NC-Gruppe: 3: 0,008 mg/L; 0:30 mg/L) und beim 2. BPS-Test bei beiden Gruppen 16 (jeweils 8) sind.

Abbildung 24: Verteilung der Kopferkennungsquote beim BPA-Test [%]: x= Median, _____ = Mittelwert



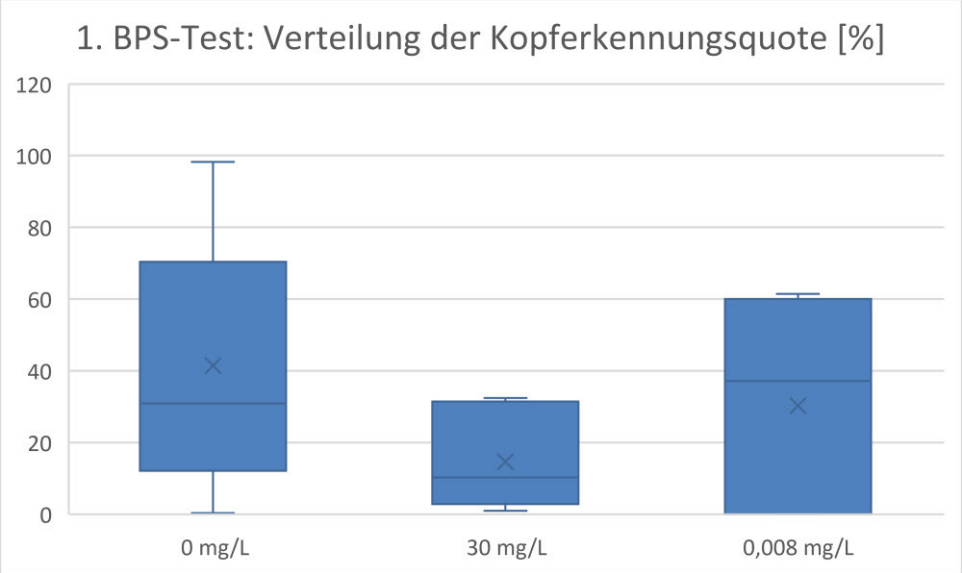


Abbildung 25: Verteilung der Kopferkennungsquote beim 1. BPS-Test [%]: x= Median, _____ = Mittelwert

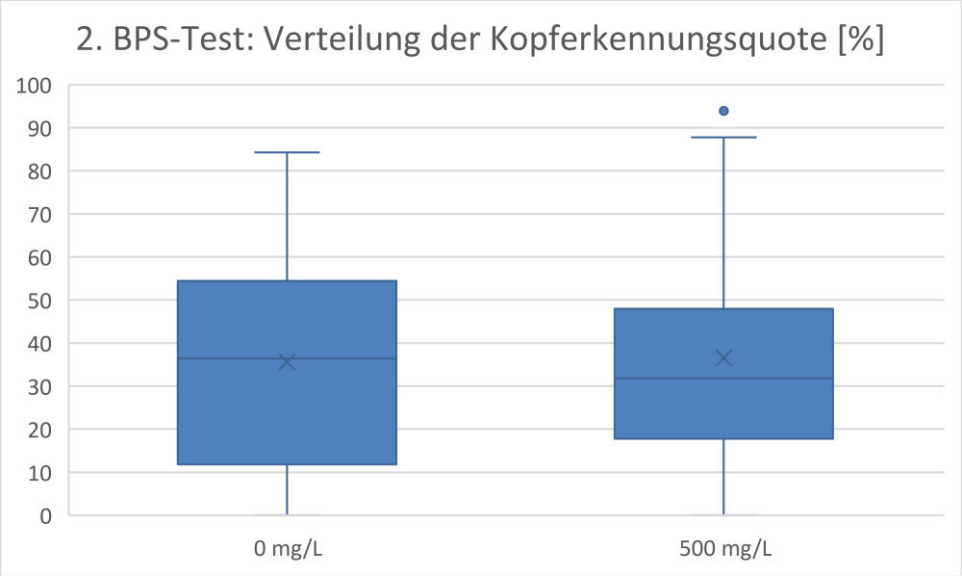


Abbildung 26: Verteilung der Kopferkennungsquote beim 1. BPS-Test [%]: x= Median, _____ = Mittelwert

Beim BPA-Test unterscheidet sich bei der Konzentration von 0,516 mg/L am meisten die *Head-thrash*-Anzahl, wenn man die gesamte Anzahl mit der kompletten KEQ mit einer KEQ von über 50 % vergleicht. Hier beträgt der Unterschied gut 21 *head thrashes* und prozentual nimmt die *Head-thrash*-Anzahl zur eingegrenzten KEQ hin um fast 55 % zu. Die analysierte Probengruppengröße fällt dabei von 14 auf 5 ab. Bei dem großen *head thrashes* nimmt die Zahl um 2,7 bei der gleichen Gruppe zu. Bei der großen Konzentration findet auch ein Zuwachs bei Eingrenzung der KEQ statt, während bei den kleinen bzw. nicht vorhandenen Konzentration eine leichte Abnahme an *head thrashes* zu verzeichnen ist.

Beim ersten ersten BPS-Test, also dem mit mehreren Konzentrationen, ist zwar genauso eine Zunahme bei der NC-Gruppe und bei der mit 0,008 mg/L an *head thrashes* zu beobachten, wenn die KEQ eingegrenzt wird. Jedoch fällt bei der Eingrenzung der KEQ bei der höchsten Konzentration alle Auswertungsergebnisse weg, sodass keine Werte verglichen werden können.

Beim 2. BPS-Test nimmt die Anzahl an *head thrashes* ausnahmslos zu, wenn die KEQ eingegrenzt wird.

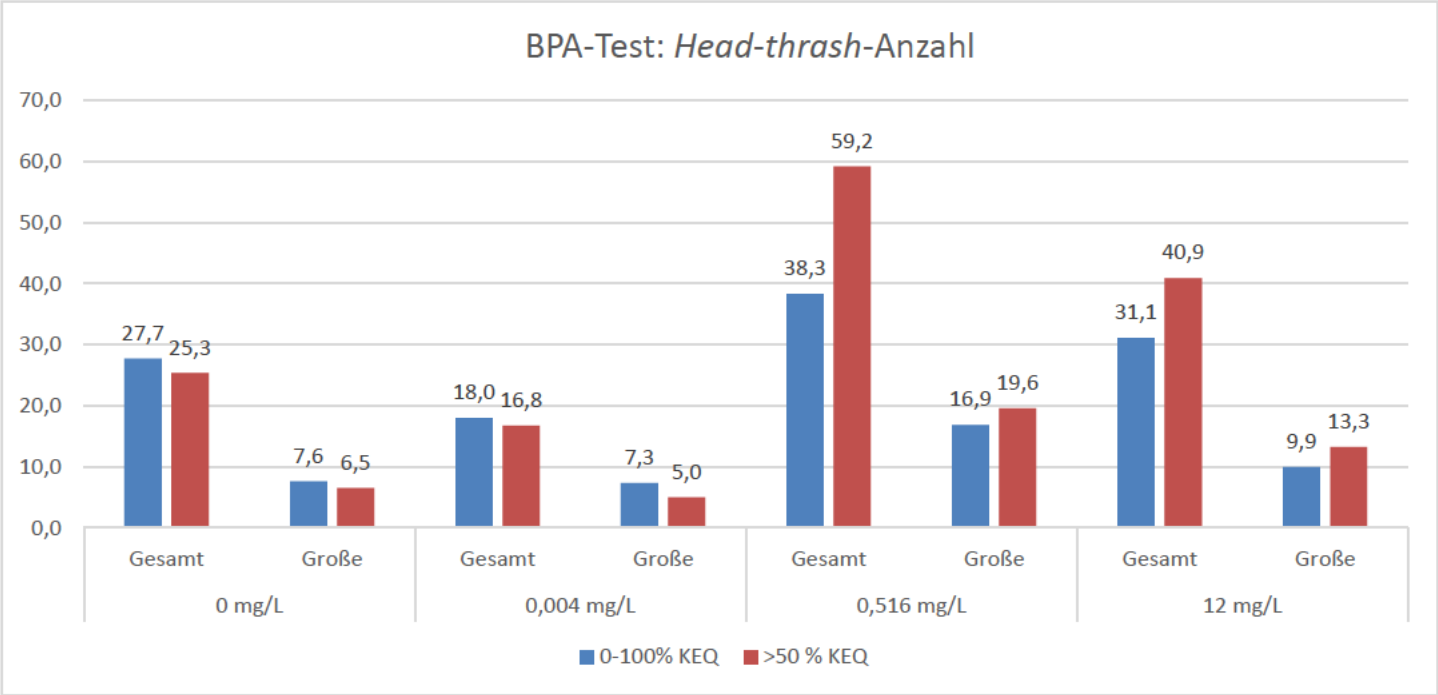


Abbildung 27: *Head-thrash*-Anzahl im Durchschnitt beim BPA-Test, einmal mit allen Auswertungen und einmal mit lediglich den Auswertungen mit über 50-prozentiger Kopferkennungsquote

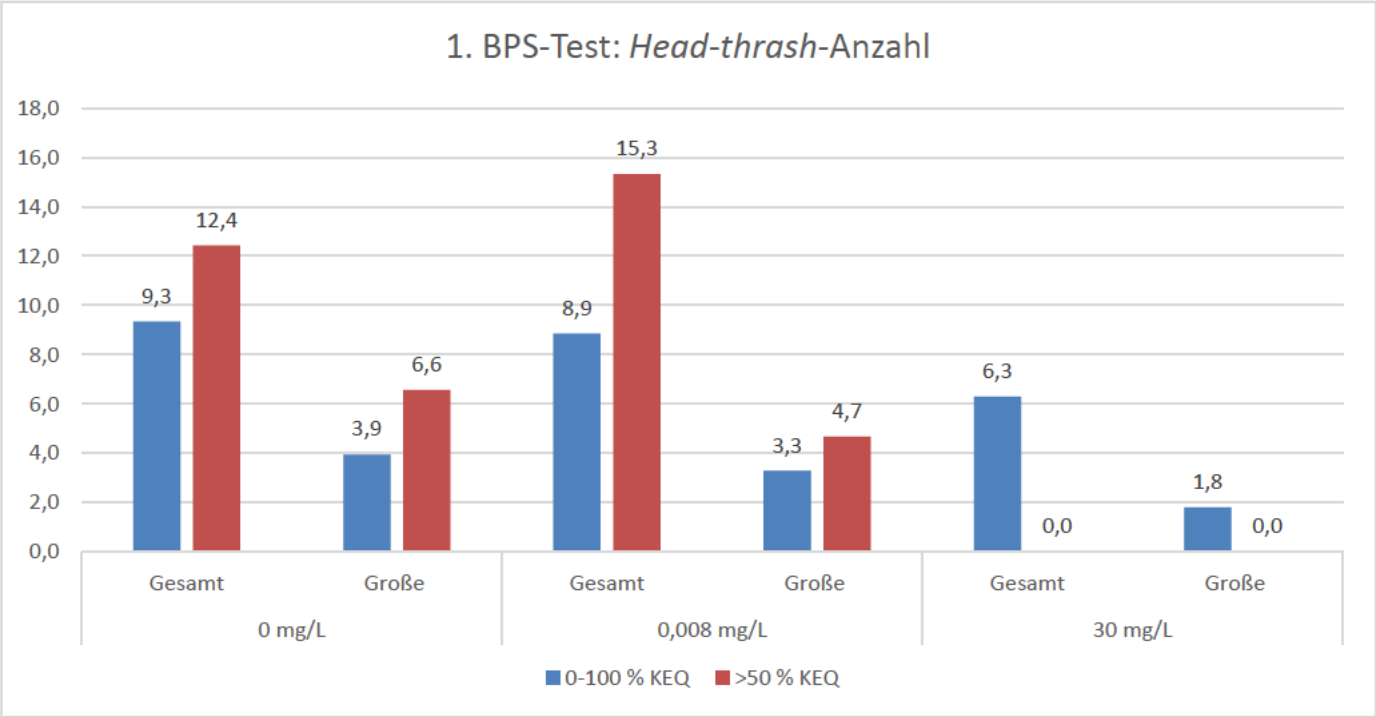


Abbildung 28: *Head-thrash*-Anzahl im Durchschnitt beim 1. BPS-Test, einmal mit allen Auswertungen und einmal mit lediglich den Auswertungen mit über 50-prozentiger Kopferkennungsquote

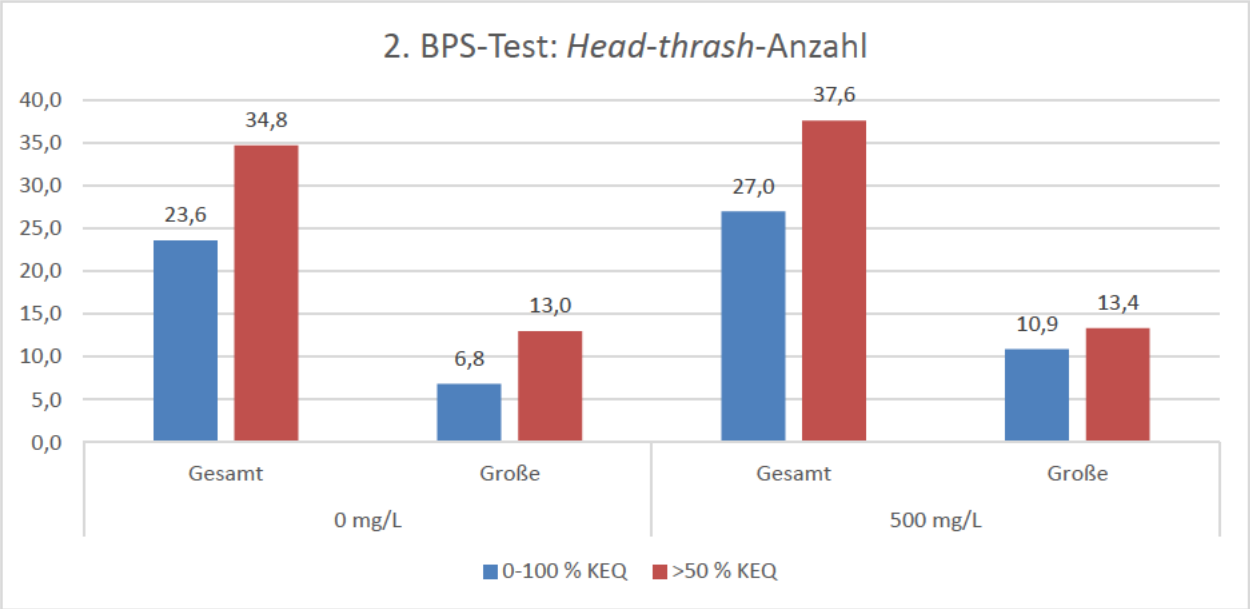


Abbildung 29: *Head-thrash*-Anzahl im Durchschnitt beim 2. BPS-Test, einmal mit allen Auswertungen und einmal mit lediglich den Auswertungen mit über 50-prozentiger Kopferkennungsquote

4.2.2.3. Automatisierte der visuellen *Head-thrashes*-Auswertung gegenübergestellt

Hierbei wird das komplette Spektrum an Auswertungsergebnissen (KEQ=0-100 %) für die Algorithmus-Auswertung herangezogen. Bei BPA ist in der *Head-thrash*-Auswertung mittels Programms der Unterschied zwischen visueller und automatisierter Auswertung, wie dem Diagramm (Abb. 30) zu entnehmen ist, bei der gesamten Anzahl an *head thrashes* bei der Gruppe mit 0,516 mg/L entsprechend mit +17,7 bei den gesamten *head thrashes* und +4,8 bei den großen *head thrashes* am größten. Sonst nimmt die *Head-thrash*-Anzahl bei den ersten beiden Gruppen bis auf eine Ausnahme leicht ab. Nur bei den großen *head thrashes* bei der NC-Gruppe nimmt die Zahl von 18,4 auf 7,6 um 10,8 (-58,7 %) ab. Bei der hohen Konzentration nimmt die Gesamtanzahl um 6,8 zu, während die Anzahl der großen Kopfbewegungen um 1 abnimmt. Beim 1. BPS-Test ist die Zahl der *head thrashes* bei jeder Gruppe in der automatisierten Auswertungsvariante kleiner als in der visuellen Variante. Beim 2. BPS-Test ist die Anzahl zwischen den Auswertungsmethoden relativ ähnlich (bei der Gesamtanzahl bei NC-

Gruppe +2,1 und bei 500mg/L-Gruppe -0,4 – bei großer Kopfbewegung bei NC-Gruppe -3,3 und bei 500mg/L-Gruppe -3,1).

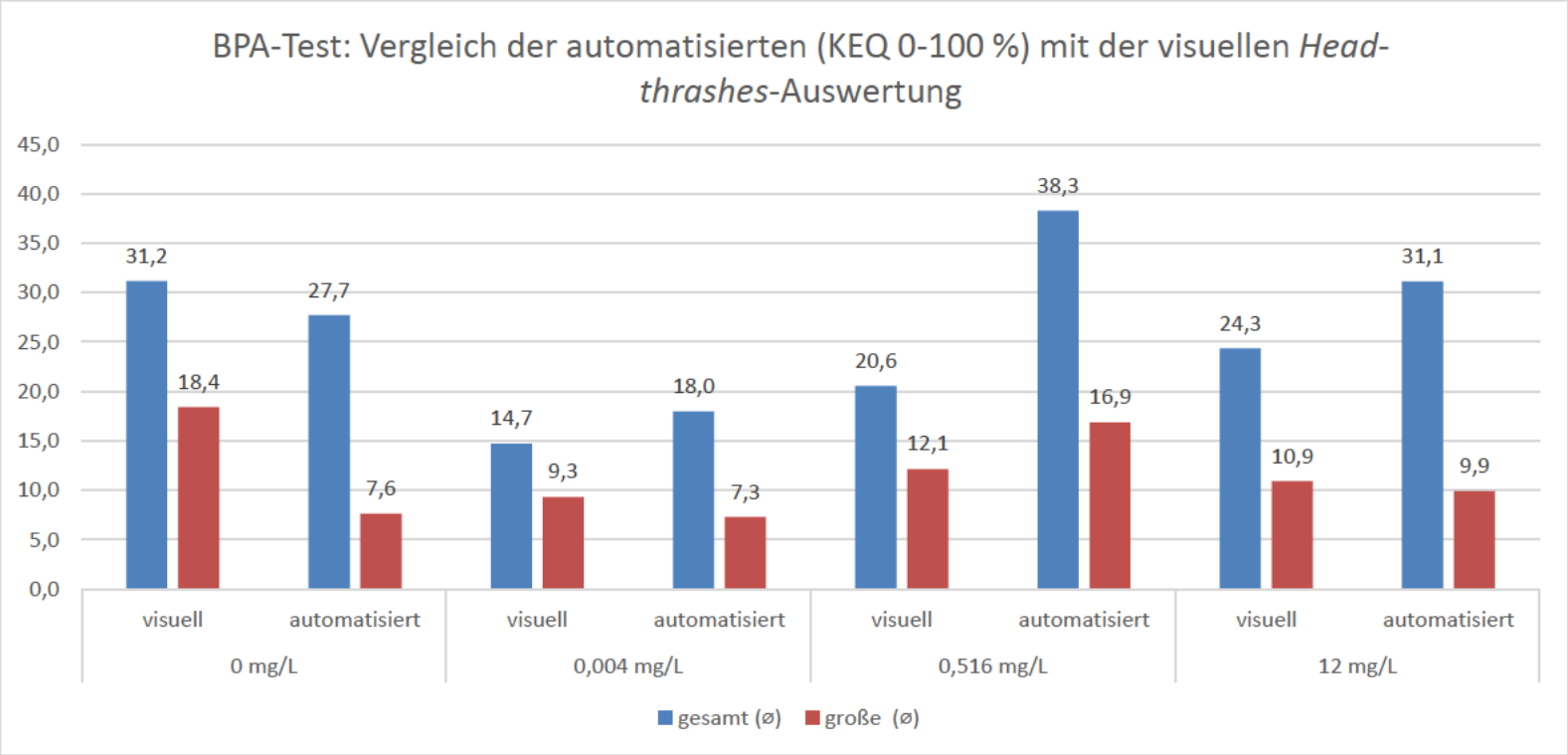


Abbildung 30: Auswertung der *head thrashes* beim BPA-Test einmal nach visueller Auswertung und einmal mithilfe des Pythonprogramms über die verschiedenen Konzentrationsgruppen hinweg

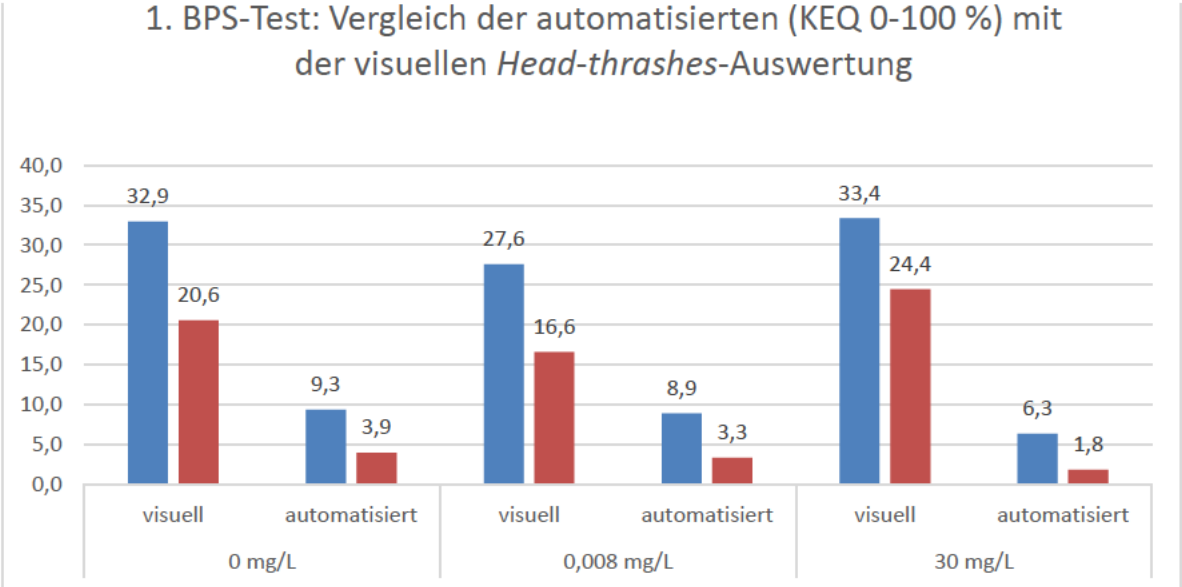


Abbildung 31: Auswertung der *head thrashes* beim 1. BPS-Test einmal nach visueller Auswertung und einmal mithilfe des Pythonprogramms über die verschiedenen Konzentrationsgruppen hinweg

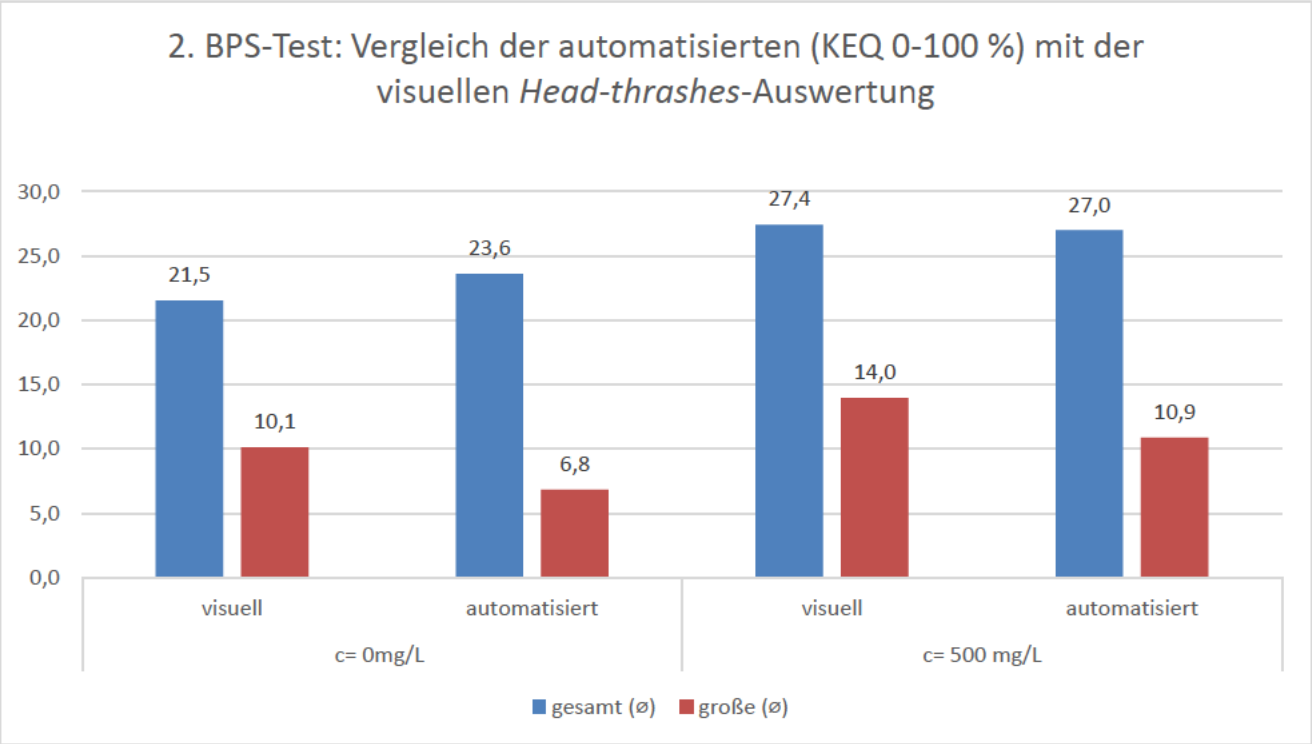


Abbildung 32: Auswertung der *head thrashes* beim 2. BPS-Test einmal nach visueller Auswertung und einmal mithilfe des Pythonprogramms über die verschiedenen Konzentrationsgruppen hinweg

5. Diskussion

5.1. Einordnung der Ergebnisse

5.1.1. Längenvarianz

Bei Exposition gegenüber BPA ist insgesamt in der Tendenz eine leichte Zunahme der Länge der Nematoden zu erkennen, wobei diese vor allem durch eine stärkere Zunahme bei den geringen Konzentrationen (4 und 516 µg/L) gekennzeichnet ist. Diese Tendenz könnte mit einer Hormesis erklärbar sein, also dass die geringen Konzentrationen das Wachstum stimulieren und die größere Konzentration dieses inhibiert. Außerdem steht BPA im Verdacht Obesität auszulösen, was insbesondere durch die Arbeit García-Espiñeira et al. 2018 bekräftigt worden ist, indem bei dieser Arbeit die Längen-Breite-Ratio mit zunehmender BPA-Konzentration (von 0 über 11,4, 114 µg/L, … bis hin zu 1,14 g/L) tendenziell zugenommen hat, genauso wie eine Fettanreicherung in den Körpern erkannt werden konnte. Genauso wurde auch eine größere Länge bei den Konzentrationsgruppen als bei der NC-Gruppe gemessen. Dieses Ergebnis steht mehr mit den Testergebnissen dieser Arbeit im Einklang. Dabei könnte die zusätzliche Energie

durch Fettanreicherung mittels BPA-Einwirkung eine zusätzliche Erklärung dafür sein, warum die mit BPA beimpften Nematoden länger sein könnten.

Andererseits stellen andere Studien einen linearen abnehmenden Zusammenhang zwischen *„body length“* und steigender Konzentration fest, wie z.B. bei Wang et al. (2019): Die Körpergröße nimmt im Vergleich zur NC-Gruppe mit steigender Konzentration von 2 µM (entspricht ca. 440 µg/L) bis hin zu 44 mg/L ausnahmslos konstant ab. Bei längerer Exposition (72 Stunden) ist die Längenabnahme noch ausgeprägter. Missachtet man die Länge der NC-Gruppe ist die Tendenz einer Körperlängenabnahme mit steigender Konzentration auch zu verzeichnen. Entsprechende Ergebnisse erzielen Kucharíková et al. (2023) und Hyun et al. (2021) nicht nur für BPA, sondern auch für BPS. Kucharíková et al.. Sie stellten dies sogar bei noch geringeren Konzentrationen von 0,1 µM (≙ 22 µg/L BPA und 25 µg/L BPS) bis hin zu 5 µM (≙ 220 mg/L BPA und 250 mg/L BPS) fest. Der dabei gefundene Körperlängenrückgang bemisst sich auf ca. 25 % bei beiden Expositionen.

Dies steht im Gegensatz zu dem ersten durchgeführten BPS-Versuch mit geringen Konzentrationen. Da ist vorliegend sogar eine Längenzunahme von 1272 µm bis hin zu 1302 µm zu verzeichnen.

Im Einklang steht der mit signifikanten Ergebnissen erzielte zweite Test mit der maximalen BPS-Konzentration: Hier ist ein Längenrückgang von etwas unter 10 % bei BPS die Folge. Jedoch ist die Konzentration von Hyun et al. (2021) halb so groß und der Effekt deutlich ausgeprägter.

5.1.2. *Head thrashes*

Im Folgenden wird bei der Zahl der jeweiligen Art von *head thrashes* die durchschnittliche Anzahl gemeint.

Betrachtet man bei BPA lediglich die Tendenz dieser mit einer Trendlinie, so ist sowohl bei allen, aber noch mehr bei den großen *head thrashes* eine abnehmende Anzahl ersichtlich, was sich in andere Studienergebnisse einreihen würde. Hingegen atypisch erscheinen die Ergebnisse der *head thrashes*, wenn man sich die Anzahlverteilungen im Detail anschaut: Die Kopfbewegungen sind zwar bei der größten Konzentration um 22 % kleiner als die der NC-Gruppe. Aber bei den weiteren Gruppen wird die Anzahl mit abnehmender Konzentration noch kleiner als bei der höchsten Konzentration, was nicht im Einklang mit anderen Studien steht.

Bei BPS tritt sowohl bei dem ersten Test als auch beim zweiten Test ein anderes Phänomen auf. Zwar ist im Vergleich zur NC-Gruppe bei der niedrigsten Konzentration von 8 µg/L die

Kopfbewegungsanzahl um etwas weniger als 20 % kleiner. Aber bei größer werdenden Konzentrationen, das heißt sowohl bei 30 mg/L als auch bei 500 mg/L ist die Anzahl an totalen *head thrashes* größer als die NC-Gruppe: bei 30 mg/L um gut 25 % und bei 500 mg/L sogar um 28 %. Auch das steht im Widerspruch mit vorangegangen Arbeiten.

Eine mögliche Erklärung für die größere Anzahl an *head thrashes* bei größer werdenden Konzentrationen könnte mit einer Stresszunahme erklärbar sein. Jedoch müssten andere wissenschaftliche Arbeiten dieses Phänomen auch unterstreichen, was jedoch nicht der Fall ist.

Lediglich die Ergebnisse von McDonough et al. (2021) legen nahe, dass nicht unbedingt eine abnehmende Anzahl an Kopfbewegungen mit höheren Konzentrationen auftreten muss. Hier ist bei der geringeren Konzentration von ca. 25 µg/L und 250 µg/L im Vergleich zur NC-Gruppe ein Anstieg der Anzahl *head thrashes* zu verzeichnen. Außerdem trat bei McDonough et al. (2021) das Phänomen auf, dass beim Testverfahren mit BPA-Exposition aus dieser Arbeit aufgetreten ist. Es herrschte nämlich kein linearer Zusammenhang zwischen *head-thrash*-Anzahl und Konzentration, sondern mit zunehmenden Konzentrationen von ca. 1,25 mg/L und 2,5 mg/L ist die Anzahl leicht unter das Niveau der NC-Gruppe gesunken. Hier beim BPS-Testverfahren mit niedrigeren Konzentrationen ist jedoch ein Anstieg der Kopfbewegungsanzahl bis zur mehr als zehnmal so hohen maximalen Konzentration aufgetreten, sodass auch kein Einklang mit der wissenschaftlichen Arbeit von McDonough et al. (2021) festgestellt werden kann.

5.2. Auswertung mittels Python-Programm

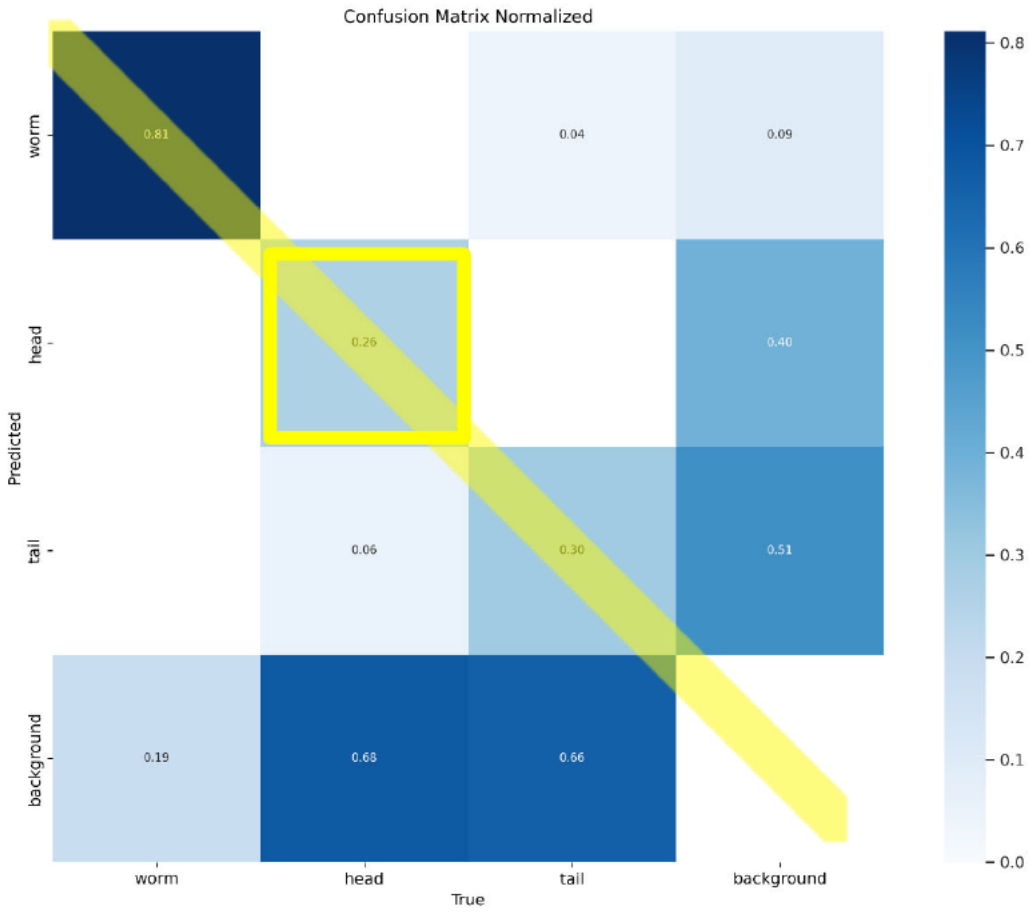


Abbildung 33: Die sogenannte "confusion matrix normalized" nach YOLOv8-Training mit Erkennungswahrscheinlichkeiten bzw. Unterscheidungsmöglichkeiten: Farbe des Blautones gibt enstsprechend der Skala (rechts) die Identifizierungswahrscheinlichkeit (gelbe Diagonale) bzw. Unterscheidungswahrscheinlichkeit zwischen den Parametern (sonstige Werte) an

Mit YOLO ist die Erkennung des Fadenwurms zumindest zuverlässiger. So konnte mit einem Trainingsvorgang (s. 3.3.2.3.) der Fadenwurm durch das Programm erkennbar gemacht werden. Allerdings sind bisher rund 110 Bilder in das Trainingsprogramm eingeflossen. Dies könnten zu wenig sein, sodass die Zahl angehoben werden sollte. Denn nach dem

Training sollten die Werte in der Diagonale der *„confusion matrix normalized“* allesamt über 0,5 sein, damit eine Identifizierung gewährleistet werden kann. Dies gelingt beim Fadenwurm mit 75-prozentiger Wahrscheinlichkeit.

Bei manchen Bildern ist eine Erkennung mittels des trainierten YOLO-Programms aber bis über 80 % möglich. Das verdeutlicht, wie unterschiedlich die Bilder in ihrem Kontrast und ihrer Helligkeit bzw. zusammengefasst ihrer Erkennbarkeit sind.

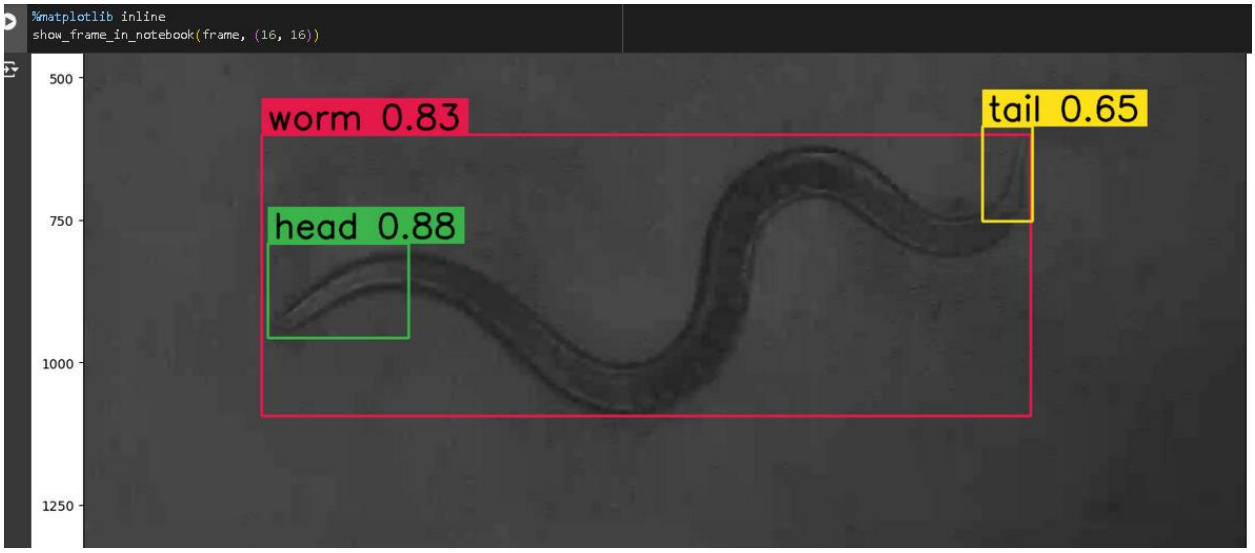


Abbildung 34: Erkennung des *C. elegans*-Wurmes auf einem Video mit guter Qualität mittels YOLOv8 und mithilfe von Roboflows Code und YouTube-Anleitung (Skalski 2023b, 00:08:59, 2023a)

Das unterstreicht auch nochmal das Kopfbewegungszählprogramm. Denn im Schnitt wird bei mehr als der Hälfte der Frames bei den meisten Videos kein Kopf erkannt. Außerdem ist die Verteilung der Videos, bei denen, wo auf den meisten Frames ein Kopf erkannt wird, und bei denen, wo auf den meisten Frames kein Kopf erkannt wird, stark polarisiert verteilt. Das bedeutet entweder es ist bei über 80 % der Frames kein Kopf zu sehen oder auf den meisten Frames ist ein Kopf ersichtlich, was den KEQ-Verteilungskastendiagrammen zu entnehmen ist.

Gerade die NC-Gruppe beim BPA-Test scheint in ihrer Bildqualität besser dazustehen.

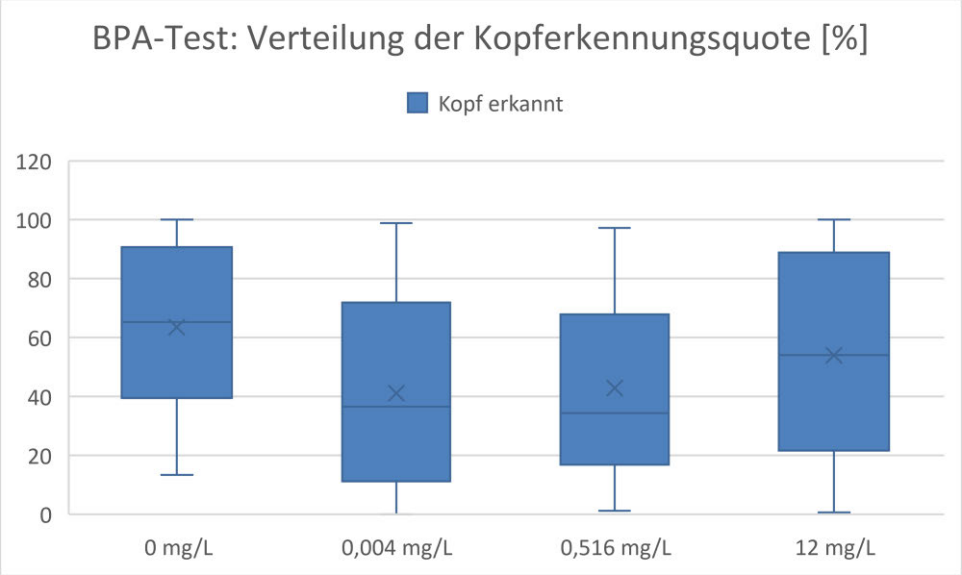


Abbildung 35: Die stark variierende Verteilung der Kopferkennungsquoten innerhalb des BPA-Tests indiziert eine variierende Bildqualität und ein erhöhtes Trainingspotential

Neben der unterschiedlichen sowie mangelnden Bildqualität in Form von zu schwacher Beleuchtung und Kontrast, kann aber auch das angesprochene Trainingsdefizit für die Varianz an Kopferkennungserfolgen verantwortlich sein.

Entsprechend sind die Ergebnisse und auch zukünftige Ergebnisse, die mit diesem ähnlichen Algorithmus gemacht worden sind, mit Vorsicht zu genießen. Die Aussagekraft ist jedoch aufgrund der Varianz der KEQs nicht vorhanden.

5.3. Sonstige Beobachtungen

Ansonsten ist bemerkenswert, dass selbst bei einer so hohen Konzentration von 500 mg/L BPS wie im dritten Test keine letalen Auswirkungen zu beobachten sind. Bei BPA liegt der akute LC_{50}-Wert nach 24 Stunden nämlich zwischen 304 und 349 mg/L (Ura et al. 2002) und nach 96 h sogar bei 0,96 und 2.7 mg/L (Mathieu-Denoncourt et al. 2016). Allerdings liegt die akute Toxizität nach 24 h bei BPS bei über 500 mg/L, was die geringe Sterberate erklären könnte (Xiao et al. 2019).

5.4. Fehlerursachen

Jedoch scheinen als Ursache für die erzielten Ergebnisse auch bestimmte Fehler plausibel.

5.4.1. Systematische Fehlerquellen

Die Phase, in der die Resultate aufgezeichnet werden, könnte kritisch sein. Zwar steht eine Exposition über 72 Stunden nicht im Widerspruch mit allen Arbeiten (Vgl. (Wang et al. 2023b)), aber die meisten anderen Arbeiten messen die Kopfbewegungen bereits nach 24 oder 48 Stunden. Hinzukommt, dass in der kritischen Phase des Screenings manche Nematoden ersichtlich mit der Eiablage begonnen hatten, was einen Einfluss auf die *head thrashes* genommen haben könnte. Insgesamt beobachtet Zhang et al. (2022) einen Rückgang der Kopfbewegungen mit zunehmendem Alter. Berücksichtigt man, dass das Screening auch Zeit kostet (von einer bis zu zweieinhalb Stunden), kann während des Aufzeichnens der ersten Wells im Vergleich mit den zuletzt aufgenommenen die Anzahl aufgrund dessen abnehmen.

Der Testaufbau ist so in den Wells angeordnet, dass die NC-Gruppe zuerst, gefolgt von der größten Konzentration und schließlich die geringste Konzentration getestet wird. Und eben deshalb könnte die größte Konzentration eine höhere Zahl an *head thrashes* besitzen.

Dieser Aufbau gekoppelt mit der langen Aufnahmezeit kann sich auch auf die Körperlängenentwicklung auswirken. Denn die Organismen könnten in dieser Zeit weiterwachsen. Eigentlich sollte gerade in diesem Stadium das Wachstum nicht so stark sein, aber es kann nicht ausgeschlossen werden.

Eine simultane Aufzeichnung aller Wells wäre ein Lösungsansatz, ist jedoch mit dem Leica-Mikroskop-Apparat leider nicht in der notwendigen Vergrößerung möglich.

Außerdem könnte auch für die *head thrashes* eine randomisierte Anordnung der Konzentrationsverteilung über die Wells die mögliche Fehlerursache in seiner Wirkung ein wenig minimieren. Genauso sollte eine frühere Auswertungsperiode ausprobiert werden, auch wenn dann eine etwas länger anhaltende Exposition entsprechend nicht gegeben wäre.

5.4.2. Statistische Fehlerquellen

Abbildung 36: Ein C. elegans-Nematode der NC-Gruppe bei BPA mit einer Körperlänge von 610 µm gefangen von Partikeln – Möglicherweise Überreste von Kulturerneuerungen oder Cholesterin oder dergleichen

Als statistische Fehlerquellen kann bspw. die unzureichende Auflösung vorheriger Organismen sein. Wie bei Methoden beschrieben ist, wird für die Kultivierung unter Zugabe von Natriumhydroxid und Bleiche durch „Vortexen“ die Auflösung der Nematoden verlangt, sodass nur die Eier zurückbleiben. Was bei Betrachtung der Wells im Nachhinein auffiel, war, dass in manchen Wells mehr Partikel sichtbar waren als in anderen. Möglich ist, dass dies zusätzliches Futter ist oder ihn in seiner Fortbewegung hindert. Das kann randomisiert zu Fehlern bei den *head thrashes* geführt und den Fadenwurm in seinem Wachstum beeinträchtigt haben.

Des Weiteren erfolgt die visuelle Auswertung der Kopfbewegungen unter Verwendungen der Sinnesorgane. Dabei sind logischerweise Täuschungen dieser möglich. Außerdem sind große Kopfbewegungen oft relativ in ihrem Umfang an die vorher ersichtlichen Kopfbewegungen des

Nematodenexemplars geknüpft. Dies kann zu Verzerrungen beim Vergleich der Nematoden untereinander kommen.

Ein weiterer Faktor, der die Täuschung der Sinnesorgane begünstigt haben könnte, sind die variierenden und teilweise schwachen Lichtverhältnisse.

Diese Fehlerquelle ist noch wahrscheinlicher eine Ursache für die unzureichende Messung der Kopfbewegungen mittels Python-Algorithmus, weil hier nicht in jedem Frame des jeweiligen zu analysierenden Videos die Erkennung durch YOLO erfolgreich war.

Die schwächeren Lichtverhältnisse wurden aufgrund der Fotosensitivität von *C. elegans* gewählt, sollten aber in der Zukunft überdacht werden.

5.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Ob nun BPS eine Substitution von BPA darstellt, die am Ende bereut werden könnte, weil sie sich als ähnlich schadhaft herausstellt, kann durch die angestellten Versuche nicht vollständig bestätigt werden.

Einerseits kann nämlich die Verteilung der Körperlängen dazu keine eindeutigen Ergebnisse liefern. Zwar wirken sich ökologisch relevante Konzentrationen von BPS in den angestellten Experimenten nicht signifikant auf die Körperlängenentwicklung des Testorganismus *C. elegans* aus und so könnte ein ausbleibender Effekt auf *C. elegans* tendenziell vermutet werden. Allerdings ist diese These dadurch zu relativieren, dass die Größenverteilung auch bei BPA in den umweltrelevanten Konzentrationsbereichen keine Wachstumsreduktion, sondern im Gegenteil eine Wachstumszunahme indiziert, was entgegen vieler Studien steht.

Erst bei einer hohen Konzentration an BPS, die sogar letal wirken müsste, werden signifikant kleinere Körperlängen bei der Konzentrationsgruppe offensichtlich.

Andererseits legt der Parameter der *head thrashes* in dieser Arbeit eine Tendenz nahe, dass bei BPS im Vergleich zu BPA weniger eine Einschränkung der Vitalität durch Exposition bei umweltrelevanten Konzentrationen gegeben ist. Denn bei dieser Art von Konzentrationen nimmt bei BPS die Anzahl der *head thrashes* sogar zu, während sie bei BPA abnimmt.

Entsprechend ist in Hinsicht auf die Frage, inwieweit die endokrin-disruptive Eigenschaft von BPA und vermeintlicherweise BPS sich auf die Parameter der Körperlänge und der *head thrashes* auswirkt, keine eindeutige Beantwortung möglich. Betrachtet man lediglich die

Resultate dieser Arbeit, würden die Parameter somit nicht die Funktion von *„phenotypical anchorpoints“* bei der Genexpressionsanalyse bereitstellen.

6. Fazit

Allerdings kann abschließend festgehalten werden, dass auch wenn diese Arbeit keine eindeutigen Ergebnisse liefern konnte, es genügend wissenschaftliche Studien gibt, die einen Zusammenhang zwischen Verhaltensänderungen bei *C. elegans*, konkret der Körperlänge und den *Head-thrashes*, und der Exposition zum endokrin-disruptiven BPA sowie zu weiteren Bisphenolen wie BPS, bei denen endokrin-disruptive Eigenschaften im Raum stehen, nahelegen. Zur Validierung dieser Forschungen, die zum großen Teil aus China kommen und somit eine größere geographische Diversität der Studien nicht vorliegt, sollte zunehmend weiter geforscht werden. Dies sollte auch geschehen, damit in der Genforschung weitere Erkenntnisse gemacht werden können, für welche Genexpression jene Verhaltensparameter der Lokomotion aussagekräftig sind. Diese Arbeit hat es umso mehr aufgezeigt, wie wichtig es ist, dass die Testverfahren schnell verlaufen, wie es zum Beispiel durch simultane Aufzeichnung der Wells geschehen könnte, damit mögliche Fehlerursachen minimiert werden können. Dafür ist unter anderem ein Fortschritt in der Aufzeichnungstechnik bzw. eine Verbesserung der Bedingungen notwendig. Entweder sollte nämlich die Kamera ein helleres Bild entstehen lassen oder aber es die nötige Helligkeit derart gewährleistet werden, dass jeder einzelne Nematode immer der gleichen Lichtintensität aufgrund der Photosensitivität, weshalb ein potenzieller Fehler entstehen könnte, ausgesetzt ist.

Damit eine Objektivierung der Auswertung durch eine Algorithmusmethode entstehen und somit noch eine mögliche Fehlerursache wegfallen kann, ist zudem ein umfangreicheres Sammeln an Trainingsdaten notwendig, also ein Sammeln an Bildern mit dazugehörigen korrekt durchgeführten Labeln. Außerdem wären *„Pose-estimation“* und *„Segmentation“* (konkret SAM-2) wahrscheinlich gute Optionen, um die Erkennung des Kopfes von C. elegans zu gewährleisten (Pose 2023; SAM 2 (Segment Anything Model 2) 2024). Ersteres Verfahren ist in seiner Umsetzung ausprobiert worden, erachtete sich aber aufgrund von Fehlern der Kopferkennung als unzureichend. Zweiteres Verfahren funktioniert genauso durch bestimmtes Labeln in Form von Polygonstrukturen und wurde im Ansatz ausprobiert, erachtete sich aber für den Rahmen dieser Arbeit als zu umfangreich.

IV. Anhang

1. Programmtext zur Extraktion eines Frames als Bild

Zur Optimierung wurde der KI-Chatbot ChatGPT 4.0 verwendet.

```
#Zurverfügungstellung der Google-Drive-Cloud
From google.colab import drive
drive.mount('/content/gdrive')

import cv2
import os
import re

# Die Definition der Ordner in den Pfadwegen, wo die Videos entnommen und die Bilder gespeichert werden sollen
videos_path = '/content/gdrive/My Drive/YOLO/Pose-estimation_labeling/Head_thrashes/BPS/Test 3'
output_path = '/content/gdrive/My Drive/YOLO/Normal_labeling/data/images/val'


# Durchlauf durch alle Videos:
for video_file in os.listdir(videos_path):
    if video_file.endswith(('.mp4')):
        video_path = os.path.join(videos_path, video_file)
        cap = cv2.VideoCapture(video_path)

        # Auswahl eines bestimmten Frames:
        cap.set(cv2.CAP_PROP_POS_FRAMES, 30)

        # Extraktion des 2. und 3. Buchstabens zwischen "Project_" und "_day4", damit das Well zur Identifikation zurückbleibt
        match = re.search(r'Project_(.{2,3})_day4', video_file)
        if match:
            new_name_part = match.group(1)  # Der extrahierte Teil des Namens
            # Einlesen des bestimmten Frames
            success, frame = cap.read()
            if success:
                # Speicherung des Frames als Bild mit BPS als Vortitel, entsprechend BPA bei BPA-Videos
                image_name = f"BPS_{new_name_part}.jpg"
                cv2.imwrite(os.path.join(output_path, image_name), frame)

        cap.release()

print("30th frames extracted and saved!")
```

2. Codes zur Durchführung des YOLOv8-Trainings

a) Trainings-Code

```
#Erreichbarmachung der Google-Drive-Cloud
from google.colab import drive
drive.mount('/content/gdrive')

#Speicherort für YOLO-Dateien
ROOT_DIR = '/content/gdrive/My Drive/YOLO/Normal_labeling'

#Installation von Ultralytics
!pip install ultralytics

#Import der notwendigen Bibliotheken
import os
from ultralytics import YOLO

#Laden des abzuwendenden "models"
model = YOLO("yolov8n.pt")

# Anwendung des "models" auf die zu trainierenden Bilder
results = model.train(data=os.path.join(ROOT_DIR, "google_colab_config.yaml"), epochs=150)

#Speichern der Trauiningsresultate
import locale
def getpreferredencoding(do_setlocale = True):
    return "UTF-8"
locale.getpreferredencoding = getpreferredencoding
!scp -r /content/runs '/content/gdrive/My Drive/YOLO'
```

b) Config.yaml-Datei

```
path: ../gdrive/My Drive/YOLO/Normal_labeling/data
train: ../images/train
val: ../images/val

names:
 0: worm
 1: head
 2: tail
```

Das GitHub-Repository wurde sowohl für die Erstellung des Codes als auch für das Erstellen der Config.YAML-Datei verwendet (Felipe T. 2023a)

3. Programmtext zum Zählen der Kopfbewegungen

Zur Optimierung wurden die KI-Chatbots „Gemini“ und „ChatGPT 4.0“ hinzugezogen

```
from google.colab import drive

drive.mount('/content/gdrive')

!pip install ultralytics

!pip install pandas openpyxl

import cv2
from ultralytics import YOLO
import os
import pandas as pd
import numpy as np
from multiprocessing import Pool

# YOLOv8-Modellpfad
model_path = '/content/gdrive/My Drive/YOLO/runs/detect/train6/weights/best.pt'

def process_video_with_tracking(video_path, movement_threshold=7, frame_step=1):
    model = YOLO(model_path)
    cap = cv2.VideoCapture(video_path)
    total_movements = 0
    large_movements = 0
    frame_count = 0
    previous_center = None
    no_head_count = 0

    while cap.isOpened():
        ret, frame = cap.read()
        if not ret:
            break

        frame_count += 1
        if frame_count % frame_step != 0:
            continue

        frame = cv2.resize(frame, (0, 0), fx=0.5, fy=0.5)

        results = model.track(source=frame, persist=True)

        highest_conf = 0
        best_box = None

```

```
44.         for result in results:
45.             for box in result.boxes:
46.                 if box.cls == 1 and box.conf > highest_conf:
47.                     highest_conf = box.conf
48.                     best_box = box
49.
50.         if best_box is not None:
51.             center_x = int(best_box.xywh[0][0])
52.             center_y = int(best_box.xywh[0][1])
53.             current_center = np.array([center_x, center_y])
54.
55.             if previous_center is not None:
56.                 distance = np.linalg.norm(current_center - previous_center)
57.
58.                 if distance > movement_threshold:
59.                     total_movements += 1
60.                     if distance > movement_threshold * 2:
61.                         large_movements += 1
62.
63.             previous_center = current_center
64.         else:
65.             no_head_count += 1
66.             previous_center = None
67.
68.     cap.release()
69.     no_head_percentage = (no_head_count / frame_count) * 100
70.
71.     return video_path, total_movements, large_movements, no_head_percentage
72.
73. def run_analysis(video_folder_path, output_excel_path):
74.     video_files = [os.path.join(video_folder_path, f) for f in os.listdir(video_folder_path) if
    f.endswith('.mp4')]
75.
76.     with Pool(processes=4) as pool:
77.         results = pool.map(process_video_with_tracking, video_files)
78.
79.     df = pd.DataFrame(results, columns=['Video Name', 'Kopfbewegungen', 'Große
    Kopfbewegungen', 'Kein Kopf (%)'])
80.     df['Video Name'] = df['Video Name'].apply(lambda x: os.path.basename(x))
81.     df.to_excel(output_excel_path, index=False)
82.
83.     print(f"Alle Videos wurden verarbeitet. Ergebnisse in {output_excel_path} gespeichert.")
84.
85. # Hauptprogramm
86. video_folder_path = '/content/gdrive/My Drive/YOLO/Pose-
    estimation_labeling/Head_thrashes/BPA'
87. output_excel_path = '/content/gdrive/My Drive/YOLO/fr1_th7_head_movements_results.xlsx'
88. run_analysis(video_folder_path, output_excel_path)
```

4. Statistische Auswertungen

Die folgenden Ausgaben wurden mithilfe von R erstellt und über RStudio ausgegeben.

4.1. Längensignifikanzen

4.1.1. BPA-Test

4.1.1.1. Kruskal-Wallis

```
Kruskal-Wallis rank sum test
data:  Auswertung_BPA$Size by Auswertung_BPA$Concentration
Kruskal-Wallis chi-squared = 8.9003, df = 3, p-value = 0.03065
```

4.1.1.2. Post-hoc-Test: Dunn-Test

```
Col Mean-|
Row Mean |          0      0.004      0.516
---------+--------------------------------
   0.004 |  -2.213350
         |    0.0134*
         |
   0.516 |  -2.721988  -0.242244
         |    0.0032*     0.4043
         |
      12 |  -1.719747   0.668381   1.004178
         |     0.0427     0.2519     0.1576
```

4.1.2. 1. BPS-Test

Es bestehen keine Signifikanzen nach keinem Verfahren (Abschließend Kruskal-Wallis: p=0,5525)

4.1.3. 2. BPS-Test: Maximale BPS-Konzentration

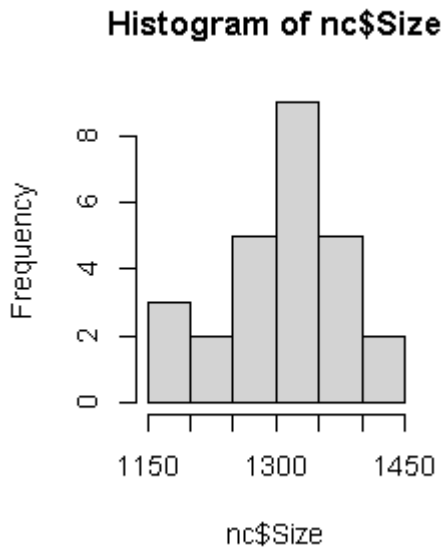
4.1.3.1. T-Test

Überprüfung auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und Histogramme, die eine ungefähre Normalverteilung belegen:

Shapiro-Wilk normality test

data: nc$Size

W = 0.96362, p-value = 0.4677

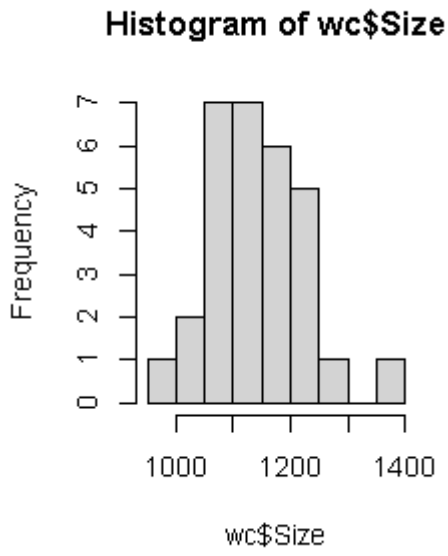


> shapiro.test(wc$Size)

Shapiro-Wilk normality test

data: wc$Size

W = 0.98443, p-value = 0.927



Beide Konzentrationsgruppem sind somit normalverteilt, weil die 0-Hypothese jeweils nicht verworfen werden kann, die aussagen würde, dass die Normalverteilung gegeben ist. Eine Widerlegung wäre erst der Fall, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 ist.

Descriptive statistics by group

group: 0

	vars	n	mean	sd	median	trimmed	mad	min	max	range	skew	kurtosis	se
X1	1	26	1306.38	73.4	1317	1307.05	78.58	1175	1437	262	-0.17	-1	14.4

---

group: 500

	vars	n	mean	sd	median	trimmed	mad	min	max	range	skew	kurtosis	se
X1	1	30	1145.7	83.18	1138	1147.17	83.03	950	1353	403	0	0.02	15.19

Die Varianzen müssen zudem homogen sein, was dann der Fall ist, wenn diese ungefähr gleich sind. Das wird vorliegend angenommen, da die Division der beiden Quadrate der Standardabweichung folgendes ergibt: $\frac{\sigma^2_{500\ mg/L}}{\sigma^2_{0\ mg/L}} = \frac{83{,}18^2}{73{,}4^2} = 1{,}28.$

Das bestätigt auch nochmal der Fligner-Killeen-Test:

Fligner-Killeen test of homogeneity of variances

data: Size by Concentration

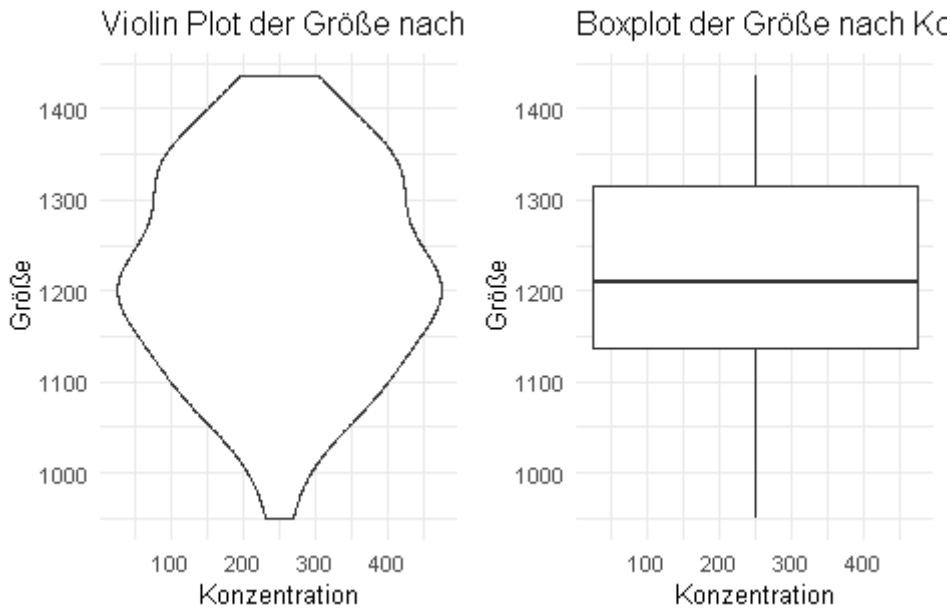
Fligner-Killeen:med chi-squared = 0.053237, df = 1, p-value = 0.8175

Two Sample t-test

data: Auswertung_BPS_3$Size by Auswertung_BPS_3$Concentration

t = 7.6097, df = 54, p-value = 4.219e-10

Der T-Test sagt aus, dass die Größen sich aufgrund des recht hohen t-Wertes und des sehr geringen p-Wertes signifikant unterscheiden.



4.2. Signifikanzen bei den *head thrashes*

4.2.1. BPA-Test

4.2.1.1. Alle Kopfbewegungen

4.2.1.1.1. Kruskal-Wallis-Test

Nach dem Kruskal-Wallis-Test kamen folgende Werte heraus:

Kruskal-Wallis chi-squared = 8.0773, df = 3, p-value = 0.04444 **.**

4.2.1.1.2. Post-hoc-Test: Dunn-Test

```
                              Comparison of x by group
                                   (No adjustment)
Col Mean-|
Row Mean |          0       0.04        0.5
---------+--------------------------------
    0.04 |   2.529009
         |    0.0057*
         |
     0.5 |   2.033676  -0.661567
         |    0.0210*     0.2541
         |
      12 |   0.809985  -1.765944  -1.202946
         |     0.2090     0.0387     0.1145
```

4.2.1.1.3. Große Kopfbewegungen

Nach dem Kruskal-Wallis-Test kamen folgende Werte heraus:

Kruskal-Wallis chi-squared = 9.4611, df = 3, p-value = 0.02375.

4.2.1.1.3.1. Post-hoc-Test: Dunn-Test

```
Col Mean-|
Row Mean |          0      0.004      0.516
---------+--------------------------------
   0.004 |   2.599501
         |    0.0047*
         |
   0.516 |   2.558888  -0.271607
         |    0.0053*     0.3930
         |
      12 |   1.492378  -1.242630  -1.062522
         |     0.0678     0.1070     0.1440
```

4.2.2. 1. BPS-Test mit mehreren Konzentrationen

Es ist weder bei der gesamten Anzahl an *head thrashes* noch bei den großen *head thrashes* eine Signifikanz gegeben, der Kruskal-Wallis-Test ergab folgendes:

Kruskal-Wallis rank sum test für die gesamte Anzahl an *head thrashes*:

#data: BPS_1$ht by BPS_1$Concentration

Kruskal-Wallis chi-squared = 2.7311, df = 2, p-value = 0.2552

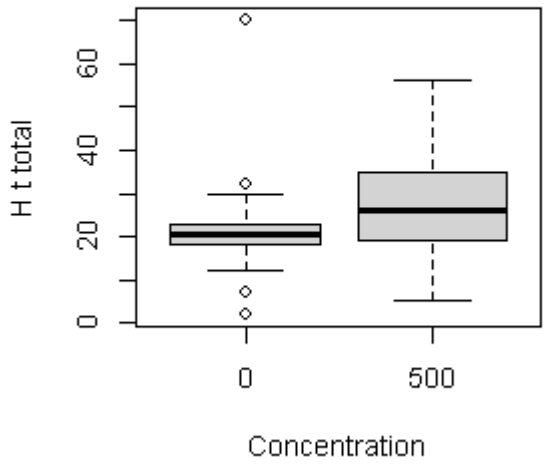
Kruskal-Wallis rank sum test für die Anzahl an großen *head thrashes*:

Kruskal-Wallis chi-squared = 5.7149, df = 2, p-value = 0.05742

4.2.3. 2. BPS-Test mit maximaler Konzentration

4.2.3.1. Gesamte Anzahl an Kopfbewegungen

4.2.3.1.1. Mann-Whitney-U-Test



Wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: httotal by Concentration

W = 236, p-value = 0.01158

p-Wert unter 0,05 → Damit signifikanter Unterschied

4.2.3.1.2. Einordnung des p-Wertes

Einordnung des Wertes durch Errechnung des R-Wertes:

$z = -2.524627$

$$r = \left|\frac{z}{\sqrt{n}}\right| = \left|\frac{-2.524627}{\sqrt{56}}\right| = 0{,}337$$

Da dieser Wert zwischen 0,3 und 0,5 liegt, handelt es sich um einen mittelmäßig starken Effekt nach der Skala von Jacob Cohen (Hopkins 2002).

4.2.3.2. Große Kopfbewegungen

Nach dem Mann-Whitney-U-Test liegt keine Signifikanz vor (W = 309.5, p-value = 0.1283).

Literaturverzeichnis

Ali, M.; Brownstone, Y. S. (1976): A study of phosphoglycerate kinase in human erythrocytes. I. Enzyme isolation, purification and assay. In: *Biochimica et biophysica acta* 445 (1), S. 74–88. DOI: 10.1016/0005-2744(76)90161-3.

Allran, John W.; Karasov, William H. (2001): Effects of atrazine on embryos, larvae, and adults of anuran amphibians. In: *Enviro Toxic and Chemistry* 20 (4), S. 769–775. DOI: 10.1002/etc.5620200411.

Ana Rodríguez Bernaldo de Quirós; Antía Lestido Cardama; Raquel Sendón; Verónica García Ibarra (2019): Food Contamination by Packaging: Migration of Chemicals from Food Contact Materials. In: Ana Rodríguez Bernaldo de Quirós, Antia Lestido Cardama, Raquel Sendón und Verónica García Ibarra (Hg.): Food contamination by packaging. Migration of chemicals from food contact materials. Berlin, Boston: De Gruyter. Online verfügbar unter https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/9783110648065/html.

Antebi, Adam (2018a): Nuclear receptor signal transduction in C. elegans. In: Adam Antebi (Hg.): WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]: WormBook. Online verfügbar unter https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19758/.

Antebi, Adam (Hg.) (2018b): WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]: WormBook.

Bajard, Lola; Adamovsky, Ondrej; Audouze, Karine; Baken, Kirsten; Barouki, Robert; Beltman, Joost B. et al. (2023): Application of AOPs to assist regulatory assessment of chemical risks - Case studies, needs and recommendations. In: *Environmental Research* 217, S. 114650. DOI: 10.1016/j.envres.2022.114650.

Besaratinia, Ahmad (2023): The State of Research and Weight of Evidence on the Epigenetic Effects of Bisphenol A. In: *International Journal of Molecular Sciences* 24 (9). DOI: 10.3390/ijms24097951.

BfG (2022): Standardarbeitsanweisung SOP 3-14. Wachstums- und Reproduktionshemmtest von Caenorhabditis elegans in 96 well Mikrotiterplatten. BfG.

Bjerregaard, Lisette B.; Korsgaard, Bodil; Bjerregaard, Poul (2006): Intersex in wild roach (Rutilus rutilus) from Danish sewage effluent-receiving streams. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64 (3), S. 321–328. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.05.018.

BMUV (2023): Fünf-Punkte-Plan zum Schutz vor hormonell schädigenden Stoffen. Online verfügbar unter https://www.bmuv.de/fileadmin/Daten_BMU/Download_PDF/Chemikaliensicherheit/fuenf_punkte_plan_hormonell_schaedigende_stoffe_bf.pdf, zuletzt geprüft am 05.09.2024.

Broué, Florence; Liere, Philippe; Kenyon, Cynthia; Baulieu, Etienne-Emile (2007): A steroid hormone that extends the lifespan of Caenorhabditis elegans. In: *Aging cell* 6 (1), S. 87–94. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2006.00268.x.

Carneiro, Tiago; Da Medeiros Nobrega, Raul Victor; Nepomuceno, Thiago; Bian, Gui-Bin; Albuquerque, Victor Hugo C. de; Filho, Pedro Pedrosa Reboucas (2018): Performance Analysis of Google Colaboratory as a Tool for Accelerating Deep Learning Applications. In: *IEEE Access* 6, S. 61677–61685. DOI: 10.1109/ACCESS.2018.2874767.

Chae, Yooeun; Hong, Sang Hee; An, Youn-Joo (2020): Photosynthesis enhancement in four marine microalgal species exposed to expanded polystyrene leachate. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189, S. 109936. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109936.

Chauve, Laetitia; Le Pen, Jérémie; Hodge, Francesca; Todtenhaupt, Pia; Biggins, Laura; Miska, Eric A. et al. (2020): High-Throughput Quantitative RT-PCR in Single and Bulk C. elegans Samples Using Nanofluidic Technology. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (159). DOI: 10.3791/61132.

Clotfelter, Ethan D.; Bell, Alison M.; Levering, Kate R. (2004): The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. In: *Animal Behaviour* 68 (4), S. 665–676. DOI: 10.1016/j.anbehav.2004.05.004.

Cohen, Jennifer D.; Sundaram, Meera V. (2020): C. elegans Apical Extracellular Matrices Shape Epithelia. In: *Journal of Developmental Biology* 8 (4), S. 23. DOI: 10.3390/jdb8040023.

Colborn, T.; vom Saal, F. S.; Soto, A. M. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. In: *Environmental Health Perspectives* 101 (5), S. 378–384. DOI: 10.1289/ehp.93101378.

Computer Vision Annotation Tool (2024). Online verfügbar unter https://app.cvat.ai/projects, zuletzt aktualisiert am 20.09.2024, zuletzt geprüft am 25.09.2024.

Cunningham, Katherine A.; Bouagnon, Aude D.; Barros, Alexandre G.; Lin, Lin; Malard, Leandro; Romano-Silva, Marco Aurélio; Ashrafi, Kaveh (2014): Loss of a neural AMP-activated kinase mimics the effects of elevated serotonin on fat, movement, and hormonal secretions. In: *PLOS Genetics* 10 (6), e1004394. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004394.

DeBardeleben, Hilary K.; Lopes, Lindsey E.; Nessel, Mark P.; Raizen, David M. (2017): Stress-Induced Sleep After Exposure to Ultraviolet Light Is Promoted by p53 in Caenorhabditis elegans. In: *Genetics* 207 (2), S. 571–582. DOI: 10.1534/genetics.117.300070.

Deutscher Bundestag (2016): Dokumentation. Zu Definition, Wirkweise, Vorkommen und Debatte endokriner Disruptoren. WD 8: Umwelt, Naturschutz, Reaktorsicherheit, Bildung und Forschung (WD 8 - 3000 – 057/16). Online verfügbar unter https://www.bundestag.de/resource/blob/439062/84b2d0f29d71aa91759fc6284873e0e6/WD-8-057-16-pdf.pdf, zuletzt geprüft am 05.09.2024.

Dodds, Edward C.; Lawson, W. (1936): Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. In: *Nature* 137 (3476), S. 996. DOI: 10.1038/137996a0.

Domingues, Rafael R.; Wiltbank, Milo C.; Hernandez, Laura L. (2023): The antidepressant fluoxetine (Prozac®) modulates estrogen signaling in the uterus and alters estrous cycles in mice. In: *Molecular and cellular endocrinology* 559, S. 111783. DOI: 10.1016/j.mce.2022.111783.

ECHA (2020): The use of bisphenol A and its alternatives in thermal paper in the EU during 2014 - 2022. June 2020. Helsinki: ECHA.

ECHA (2023a): Liste der für eine Zulassung in Frage kommenden besonders besorgniserregenden Stoffe. Online verfügbar unter https://echa.europa.eu/de/candidate-list-table/-/dislist/details/0b0236e187e72809, zuletzt aktualisiert am 24.04.2024, zuletzt geprüft am 24.04.2024.

ECHA (2023b): Substance Information - 4,4'-sulphonyldiphenol. Online verfügbar unter https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.001.137, zuletzt aktualisiert am 06.09.2023, zuletzt geprüft am 02.09.2024.

ECHA (2024): Substance Information - 4,4'-isopropylidenediphenol. Online verfügbar unter https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.001.133#IUPAC_NAMEScontainer, zuletzt aktualisiert am 30.04.2024, zuletzt geprüft am 28.08.2024.

Europäische Kommission (14.01.2011): über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen. Verordnung (EU) Nr. 10/2011. Fundstelle: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A02011R0010-20200923. Online verfügbar unter https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A02011R0010-20200923, zuletzt geprüft am 24.04.2024.

Europäische Kommission (12.12.2016): Verordnung - 2016/2235 - EN - EUR-Lex. zur Änderung von Anhang XVII der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) hinsichtlich Bisphenol A. Online verfügbar unter https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2016.337.01.0003.01.DEU, zuletzt geprüft am 24.04.2024.

Europäische Kommission (14.02.2018): über die Verwendung von Bisphenol A in Lacken und Beschichtungen, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, und zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 10/2011 hinsichtlich der Verwendung dieses Stoffes in Lebensmittelkontaktmaterialien aus Kunststoff. Verordnung (EU) 2018/213. Online verfügbar unter https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A32018R0213, zuletzt geprüft am 24.04.2024.

European Environment Agency (Hg.) (2023): Human exposure to Bisphenol A in Europe. Online verfügbar unter https://www.eea.europa.eu/publications/peoples-exposure-to-bisphenol-a/, zuletzt aktualisiert am 01.04.2024, zuletzt geprüft am 28.04.2024.

Farris, F. F. (2014): Obesogens. In: Philip Wexler (Hg.): Encyclopedia of Toxicology. 3rd ed. Burlington: Elsevier Science, S. 633–636. Online verfügbar unter https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123864543012343.

Felipe T. (2023a): GitHub-repository - computervisioneng/train-yolov8-custom-dataset-step-by-step-guide. google_colab-Variante. Online verfügbar unter https://github.com/computervisioneng/train-yolov8-custom-dataset-step-by-step-guide, zuletzt geprüft am 25.09.2024.

Felipe T. (Regie) (2023b): Train Yolov8 object detection on a custom dataset | Step by step guide | Computer vision tutorial. Weitere Beteiligte: "Computer Vision Engineer". Video. Online verfügbar unter https://www.youtube.com/watch?v=m9fH9OWn8YM&t=1287s, zuletzt geprüft am 25.09.2024.

Fenske, Martina; Segner, Helmut (2004): Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (Danio rerio). In: *Aquatic Toxicology* 67 (2), S. 105–126. DOI: 10.1016/j.aquatox.2003.10.008.

Fent, Karl (2013): Ökotoxikologie. Umweltchemie - Toxikologie - Ökologie. 4., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme.

García-Espiñeira, María Cecilia; Tejeda-Benítez, Lesly Patricia; Olivero-Verbel, Jesus (2018): Toxic Effects of Bisphenol A, Propyl Paraben, and Triclosan on Caenorhabditis elegans. In: *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 (4). DOI: 10.3390/ijerph15040684.

Gaworecki, Kristen M.; Klaine, Stephen J. (2008): Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. In: *Aquatic Toxicology* 88 (4), S. 207–213. DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.04.011.

Gerald, Carresse; Deshazo, Boris; Patterson, Hayden; Spence, Porché (2022): Growth and chemotaxis of nematodes reduced upon exposure to Third Fork Creek surface water. In: *Environ Sci Eur* 34 (1), S. 9. DOI: 10.1186/s12302-021-00579-8.

Geraudie, Perrine; Gerbron, Marie; Minier, Christophe (2017): Endocrine disruption effects in male and intersex roach (Rutilus rutilus, L.) from French rivers: An integrative approach based on subcellular to individual responses. In: *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 211, S. 29–36. DOI: 10.1016/j.cbpb.2017.05.006.

Gimeno, Sylvia; Allan, Dawn; Paul, Kai; Remuzat, Pauline; Collard, Marie (2024): Are current regulatory log Kow cut-off values fit-for-purpose as a screening tool for bioaccumulation potential in aquatic organisms? In: *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* 147, S. 105556. DOI: 10.1016/j.yrtph.2023.105556.

GitHub (2024): GitHub - ultralytics/ultralytics: NEW - YOLOv8 🚀 in PyTorch > ONNX > OpenVINO > CoreML > TFLite. Online verfügbar unter https://github.com/ultralytics/ultralytics, zuletzt aktualisiert am 26.09.2024, zuletzt geprüft am 26.09.2024.

Golshan, Mahdi; Alavi, Sayyed Mohammad Hadi (2019): Androgen signaling in male fishes: Examples of anti-androgenic chemicals that cause reproductive disorders. In: *Theriogenology* 139, S. 58–71. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.07.020.

Google Colab (2024). Online verfügbar unter https://colab.research.google.com/, zuletzt aktualisiert am 25.09.2024, zuletzt geprüft am 25.09.2024.

Hayes, Tyrone B.; Collins, Atif; Lee, Melissa; Mendoza, Magdelena; Noriega, Nigel; Stuart, A. Ali; Vonk, Aaron (2002): Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (8), S. 5476–5480. DOI: 10.1073/pnas.082121499.

Hobert, Oliver (2018): Neurogenesis in the nematode Caenorhabditis elegans. In: Oliver Hobert (Hg.): WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]: WormBook. Online verfügbar unter https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK116086/.

Hope, Ian A. (Hg.) (1999): C. elegans. A practical approach. Oxford: Oxford Univ. Press (The practical approach series, 213). Online verfügbar unter http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0602/99037600-d.html.

Hopkins, Will G. (2002): New View of Statistics: Effect Magnitudes. Online verfügbar unter https://sportsci.org/resource/stats/effectmag.html#cohen, zuletzt aktualisiert am 30.09.2024, zuletzt geprüft am 30.09.2024.

Hu, Lian; Yang, Zhi; Pan, Xiaojie; Zhao, Na; Peng, Jianhua; Wan, Chengyan (2017): Use of fish species from different trophic levels to control algae and water quality: An enclosure experiment in eutrophic area of Xiaojiang River. In: *PLoS ONE* 12 (3), e0171953. DOI: 10.1371/journal.pone.0171953.

HU, Ya-Ou; Wang, Yang; YE, Bo-Ping; WANG, Da-Yong (2008): Phenotypic and behavioral defects induced by iron exposure can be transferred to progeny in Caenorhabditis elegans. In: *Biomedical and Environmental Sciences* 21 (6), S. 467–473. DOI: 10.1016/S0895-3988(09)60004-0.

Hyun, Moonjung; Rathor, Laxmi; Kim, Hye-Jin; McElroy, Taylor; Hwang, Kwang Hyun; Wohlgemuth, Stephanie et al. (2021): Comparative toxicities of BPA, BPS, BPF, and TMBPF in the nematode Caenorhabditis elegans and mammalian fibroblast cells. In: *Toxicology* 461, S. 152924. DOI: 10.1016/j.tox.2021.152924.

Irvine, Elizabeth (2020): Developing Valid Behavioral Indicators of Animal Pain. In: *Philosophical Topics* 48 (1), S. 129–154. Online verfügbar unter https://www.jstor.org/stable/48628589.

Jenny, Jean-Philippe; Anneville, Orlane; Arnaud, Fabien; Baulaz, Yoann; Bouffard, Damien; Domaizon, Isabelle et al. (2020): Scientists' Warning to Humanity: Rapid degradation of the world's large lakes. In: *Journal of Great Lakes Research* 46 (4), S. 686–702. DOI: 10.1016/j.jglr.2020.05.006.

Kar, Supratik; Sepúlveda, Maria S.; Roy, Kunal; Leszczynski, Jerzy (2017): Endocrine-disrupting activity of per- and polyfluoroalkyl substances: Exploring combined approaches of ligand and structure based modeling. In: *Chemosphere* 184, S. 514–523. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.06.024.

Kermoysan, Goulwen de; Joachim, Sandrine; Baudoin, Patrick; Lonjaret, Matthieu; Tebby, Cleo; Lesaulnier, François et al. (2013): Effects of bisphenol A on different trophic levels in a lotic experimental ecosystem. In: *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 144-145, S. 186–198. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.09.034.

Kidd, Karen A.; Blanchfield, Paul J.; Mills, Kenneth H.; Palace, Vince P.; Evans, Robert E.; Lazorchak, James M.; Flick, Robert W. (2007): Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (21), S. 8897–8901. DOI: 10.1073/pnas.0609568104.

Kucharíková, Soňa; Hockicková, Patrícia; Melnikov, Kamila; Bárdyová, Zuzana; Kaiglová, Alžbeta (2023): The Caenorhabditis elegans cuticle plays an important role against toxicity to bisphenol A and bisphenol S. In: *Toxicology Reports* 10, S. 341–347. DOI: 10.1016/j.toxrep.2023.02.013.

Lai, C. H.; Chou, C. Y.; Ch'ang, L. Y.; Liu, C. S.; Lin, W. (2000): Identification of novel human genes evolutionarily conserved in Caenorhabditis elegans by comparative proteomics. In: *Genome Research* 10 (5), S. 703–713. DOI: 10.1101/gr.10.5.703.

Li, C.; Nelson, L. S.; Kim, K.; Nathoo, A.; Hart, A. C. (1999): Neuropeptide gene families in the nematode Caenorhabditis elegans. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 897 (1), S. 239–252. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07895.x.

Lipsitch, Marc; Tchetgen Tchetgen, Eric; Cohen, Ted (2010): Negative controls: a tool for detecting confounding and bias in observational studies. In: *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 21 (3), S. 383–388. DOI: 10.1097/EDE.0b013e3181d61eeb.

Long, Hui-Qiang; Gao, Jin; He, Shu-Qing; Han, Jian-Fang; Tu, Yu; Chen, Na (2023): The role of crm-1 in ionizing radiation-induced nervous system dysfunction in Caenorhabditis elegans. In: *Neural Regeneration Research* 18 (6), S. 1386–1392. DOI: 10.4103/1673-5374.357908.

Long, Shengxing; Zhang, Ting; Fan, Jingjing; Li, Can; Xiong, Kangning (2020): Responses of phytoplankton functional groups to environmental factors in the Pearl River, South China. In: *Environ Sci Pollut Res* 27 (34), S. 42242–42253. DOI: 10.1007/s11356-020-08344-9.

Ludwig-Müller, Jutta; Gutzeit, Herwig (2014): Biologie von Naturstoffen. Synthese, biologische Funktionen und Bedeutung für die Gesundheit. Stuttgart: Ulmer (UTB Biologie, Biochemie, Evolution, Pharmakologie, 4028).

Magalhaes Filho, C. Daniel de; Henriquez, Brian; Seah, Nicole E.; Evans, Ronald M.; Lapierre, Louis R.; Dillin, Andrew (2018): Visible light reduces C. elegans longevity. In: *Nature communications* 9 (1), S. 927. DOI: 10.1038/s41467-018-02934-5.

Magner, Daniel B.; Wollam, Joshua; Shen, Yidong; Hoppe, Caroline; Li, Dongling; Latza, Christian et al. (2013): The NHR-8 nuclear receptor regulates cholesterol and bile acid homeostasis in C. elegans. In: *Cell Metabolism* 18 (2), S. 212–224. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.07.007.

Mallinckrodt, Craig H.; Detke, Michael J.; Prucka, William R.; Ruberg, Stephen J.; Molenberghs, Geert (2010): Considerations for Using Positive Controls in Phase 2 Clinical Trials of Central Nervous System Disorders. In: *Drug Information J* 44 (4), S. 431–441. DOI: 10.1177/009286151004400407.

Mathieu-Denoncourt, Justine; Wallace, Sarah J.; Solla, Shane R. de; Langlois, Valerie S. (2016): Influence of Lipophilicity on the Toxicity of Bisphenol A and Phthalates to Aquatic Organisms. In: *Bull Environ Contam Toxicol* 97 (1), S. 4–10. DOI: 10.1007/s00128-016-1812-9.

Matyash, V.; Geier, C.; Henske, A.; Mukherjee, S.; Hirsh, D.; Thiele, C. et al. (2001): Distribution and transport of cholesterol in Caenorhabditis elegans. In: *Molecular Biology of the Cell* 12 (6), S. 1725–1736. DOI: 10.1091/mbc.12.6.1725.

McDonough, Callie M.; Guo, Daniel J.; Guo, Tai L. (2021): Developmental toxicity of bisphenol S in Caenorhabditis elegans and NODEF mice. In: *NeuroToxicology* 87, S. 156–166. DOI: 10.1016/j.neuro.2021.09.006.

Mekenyan, Ovanes (2010): In silico toxicology. Principles and applications. Cambridge: RSC Publ. Royal Soc. of Chemistry (Issues in toxicology, 7). Online verfügbar unter https://books.rsc.org/books/edited-volume/1314/In-Silico-Toxicology.

Mersha, Mahlet D.; Sanchez, Karla R.; Temburni, Murali K.; Dhillon, Harbinder S. (2018): Long-term Behavioral and Reproductive Consequences of Embryonic Exposure to Low-dose Toxicants. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (133). DOI: 10.3791/56771.

Mimoto, Ai; Fujii, Madoka; Usami, Makoto; Shimamura, Maki; Hirabayashi, Naoko; Kaneko, Takako et al. (2007): Identification of an estrogenic hormone receptor in Caenorhabditis elegans. In: *Biochemical and biophysical research communications* 364 (4), S. 883–888. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.10.089.

MKUEM Rheinland-Pfalz (2012): Bisphenol-A und Weichmacher. Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Energie und Mobilität des Landes Rheinland-Pfalz. Online verfügbar unter https://mkuem.rlp.de/themen/umweltschutz-/-umwelt-und-gesundheit/gesundheitlicher-umweltschutz/bisphenol-a-und-weichmacher, zuletzt aktualisiert am 25.01.2012, zuletzt geprüft am 24.04.2024.

Mnif, Wissem; Hassine, Aziza Ibn Hadj; Bouaziz, Aicha; Bartegi, Aghleb; Thomas, Olivier; Roig, Benoit (2011): Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. In: *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8 (6), S. 2265–2303. DOI: 10.3390/ijerph8062265.

Moggs, Jonathan G.; Tinwell, Helen; Spurway, Tracey; Chang, Hur-Song; Pate, Ian; Lim, Fei Ling et al. (2004): Phenotypic anchoring of gene expression changes during estrogen-induced uterine growth. In: *Environmental Health Perspectives* 112 (16), S. 1589–1606. DOI: 10.1289/txg.7345.

M'Rabet, Charaf; Pringault, Olivier; Zmerli-Triki, Habiba; Ben Gharbia, Héla; Couet, Douglas; Kéfi-Daly Yahia, Ons (2018): Impact of two plastic-derived chemicals, the Bisphenol A and the di-2-ethylhexyl phthalate, exposure on the marine toxic dinoflagellate Alexandrium pacificum. In: *Marine Pollution Bulletin* 126, S. 241–249. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.10.090.

Murata, Daisuke; Nomura, Kazuko H.; Dejima, Katsufumi; Mizuguchi, Souhei; Kawasaki, Nana; Matsuishi-Nakajima, Yukari et al. (2012): GPI-anchor synthesis is indispensable for the germline development of the nematode Caenorhabditis elegans. In: *Molecular Biology of the Cell* 23 (6), S. 982–995. DOI: 10.1091/mbc.E10-10-0855.

Muth-Köhne, Elke; Wenzel, Andrea; Teigeler, Matthias; Windshügel, Björn Anselm; Keminer, Oliver; Chachulski, Laura; Kohler, Manfred (2020): Bewertung des endokrinen Potenzials von Bisphenol Alternativstoffen in umweltrelevanten Verwendungen. Abschlussbericht. Unter Mitarbeit von Franziska Kaßner. Dessau-Roßlau: Umweltbundesamt (Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit, 2019, 123). Online verfügbar unter http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:gbv:3:2-1058487.

Peterson, Nicholas D.; Cheesman, Hilary K.; Liu, Pengpeng; Anderson, Sarah M.; Foster, Kyle J.; Chhaya, Richa et al. (2019): The nuclear hormone receptor NHR-86 controls anti-pathogen responses in C. elegans. In: *PLOS Genetics* 15 (1), e1007935. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007935.

Pose (2023), 12.11.2023. Online verfügbar unter https://docs.ultralytics.com/de/tasks/pose/, zuletzt geprüft am 28.09.2024.

PubChem (2024): Bisphenol A. Online verfügbar unter https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A, zuletzt aktualisiert am 15.09.2024, zuletzt geprüft am 15.09.2024.

Rand, J. B.; Johnson, C. D. (1995): Genetic pharmacology: interactions between drugs and gene products in Caenorhabditis elegans. In: *Methods in cell biology* 48, S. 187–204. DOI: 10.1016/s0091-679x(08)61388-6.

Reininger, Natalie; Oehlmann, Jörg (2024): Regrettable substitution? Comparative study of the effect profile of bisphenol A and eleven analogues in an in vitro test battery. In: *Environ Sci Eur* 36 (1), S. 1–17. DOI: 10.1186/s12302-024-00900-1.

Rodgers-Gray, T. P.; Jobling, S.; Kelly, C.; Morris, S.; Brighty, G.; Waldock, M. J. et al. (2001): Exposure of juvenile roach (Rutilus rutilus) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. In: *Environmental science & technology* 35 (3), S. 462–470. DOI: 10.1021/es001225c.

Rodrigues, Daniela Teixeira; Padilha, Heloísa Aiolfi; Soares, Ana Thalita Gonçalves; Souza, Maria Eduarda Oliveira de; Guerra, Matteus Teixeira; Ávila, Daiana Silva (2024): The Caenorhabditis elegans neuroendocrine system and their modulators: An overview. In: *Molecular and cellular endocrinology* 586, S. 112191. DOI: 10.1016/j.mce.2024.112191.

SAM 2 (Segment Anything Model 2) (2024), 30.07.2024. Online verfügbar unter https://docs.ultralytics.com/de/models/sam-2/#zero-shot-generalization, zuletzt geprüft am 28.09.2024.

Schinkmann, K.; Li, C. (1992): Localization of FMRFamide-like peptides in Caenorhabditis elegans. In: *The Journal of comparative neurology* 316 (2), S. 251–260. DOI: 10.1002/cne.903160209.

Schöpel, Miriam; Herrmann, Christian; Scherkenbeck, Jürgen; Stoll, Raphael (2016): The Bisphenol A analogue Bisphenol S binds to K-Ras4B--implications for 'BPA-free' plastics. In: *FEBS Letters* 590 (3), S. 369–375. DOI: 10.1002/1873-3468.12056.

Skalski, Piotr (2023a): how-to-track-and-count-vehicles-with-yolov8. YOLOv8 Tracking and Counting. Roboflow. GitHub. Online verfügbar unter https://github.com/roboflow/notebooks/blob/main/notebooks/how-to-track-and-count-vehicles-with-yolov8.ipynb, zuletzt aktualisiert am 10.10.2023, zuletzt geprüft am 29.09.2024.

Skalski, Piotr (2023b): Track & Count Objects using YOLOv8 ByteTrack & Supervision - YouTube. Roboflow. YouTube. Online verfügbar unter https://www.youtube.com/watch?v=OS5qI9YBkfk&t=18s, zuletzt aktualisiert am 20.01.2023, zuletzt geprüft am 29.09.2024.

Smith, Ewan St John; Lewin, Gary R. (2009): Nociceptors: a phylogenetic view. In: *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 195 (12), S. 1089–1106. DOI: 10.1007/s00359-009-0482-z.

21.10.2021: Standardarbeitsanweisung SOP 3-09.

Teigeler, Matthias (2021): Wirkmuster hormonaktiver Substanzen im Zebrabärbling (Danio rerio). Neue methodische Bewertungsansätze unter Berücksichtigung unterschiedlicherBelastungsszenarien. RWTH Aachen. Online verfügbar unter http://publications.rwth-aachen.de/record/826327/files/826327.pdf, zuletzt geprüft am 01.09.2024.

Theus, Meredith E.; Michaels, Julia; Fey, Samuel B. (2023): Interactive effects of temperature and bisphenol A on phytoplankton growth and community structure. In: *Conserv Physiol* 11 (1), coad021. DOI: 10.1093/conphys/coad021.

Touroutine, Denis; Fox, Rebecca M.; Stetina, Stephen E. von; Burdina, Anna; Miller, David M.; Richmond, Janet E. (2005): acr-16 encodes an essential subunit of the levamisole-resistant nicotinic receptor at the Caenorhabditis elegans neuromuscular junction. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (29), S. 27013–27021. DOI: 10.1074/jbc.M502818200.

Townsend, Colin R. (2009): Ökologie. 2. Aufl. 2009. Nachdruck 2014. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum (SpringerLink Bücher).

Umweltbundesamt (2010): Bisphenol A. Massenchemikalie mit unerwünschten Nebenwirkungen. Online verfügbar unter https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/3782.pdf, zuletzt geprüft am 22.04.2024.

Umweltbundesamt (2021): Bisphenol A. Online verfügbar unter https://www.umweltbundesamt.de/themen/chemikalien/chemikalien-reach/stoffgruppen/bisphenol-a#besorgniserregende-eigenschaften, zuletzt aktualisiert am 17.04.2024, zuletzt geprüft am 17.04.2024.

Umweltbundesamt (2022a): „PARC“: EU-Forschungspartnerschaft zur Risikobewertung von Chemikalien startet. 400 Millionen Euro für Projekte zum Schutz der menschlichen Gesundheit und der Umwelt. Gemeinsame Pressemitteilung von Umweltbundesamt und Bundesinstitut für Risikobewertung. Online verfügbar unter https://www.umweltbundesamt.de/presse/pressemitteilungen/parc-eu-forschungspartnerschaft-zur-risikobewertung, zuletzt aktualisiert am 28.04.2024, zuletzt geprüft am 28.04.2024.

Umweltbundesamt (2022b): Beschränkungsvorschlag BPA und Bisphenole mit ähnlicher Besorgnis. Umweltbundesamt. Online verfügbar unter https://www.umweltbundesamt.de/themen/chemikalien/chemikalien-reach/stoffe-ihre-eigenschaften/stoffe-uebersicht/beschraenkungsvorschlag-bpa-bisphenole-aehnlicher#undefined, zuletzt aktualisiert am 12.12.2022, zuletzt geprüft am 24.04.2024.

Ura, Kazuhiro; Kai, Toshinori; Sakata, Sachiko; Iguchi, Taisen; Arizono, Koji (2002): Aquatic Acute Toxicity Testing Using the Nematode Caenorhabditis elegans. In: *Journal of Health Science* 48 (6), S. 583–586. DOI: 10.1248/jhs.48.583.

Wang, Dayong; Shen, Lulu; Wang, Yang (2007): The phenotypic and behavioral defects can be transferred from zinc-exposed nematodes to their progeny. In: *Environmental Toxicology and Pharmacology* 24 (3), S. 223–230. DOI: 10.1016/j.etap.2007.05.009.

Wang, Siting; Ning, Hongmei; Wang, Xinrui; Chen, Lingli; Hua, Liushuai; Ren, Fei et al. (2023a): Exposure to bisphenol A induces neurotoxicity associated with synaptic and cytoskeletal dysfunction in neuro-2a cells. In: *Toxicology and industrial health* 39 (6), S. 325–335. DOI: 10.1177/07482337231172827.

Wang, Yun; Gai, Tingting; Zhang, Lianfeng; Chen, Liangwen; Wang, Shunchang; Ye, Tao; Zhang, Weiru (2023b): Neurotoxicity of bisphenol A exposure on Caenorhabditis elegans induced by disturbance of neurotransmitter and oxidative damage. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 252, S. 114617. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.114617.

Ward, J. L.; Korn, V.; Auxier, A. N.; Schoenfuss, H. L. (2020): Temperature and Estrogen Alter Predator-Prey Interactions between Fish Species. In: *Integrative organismal biology (Oxford, England)* 2 (1), obaa008. DOI: 10.1093/iob/obaa008.

White, J. G.; Southgate, E.; Thomson, J. N.; Brenner, S. (1986): The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 314 (1165), S. 1–340. DOI: 10.1098/rstb.1986.0056.

Winkler, Juliane; Liu, Pengyuan; Phong, Kiet; Hinrichs, Johanna H.; Ataii, Nassim; Williams, Katherine et al. (2022): Bisphenol A replacement chemicals, BPF and BPS, induce protumorigenic changes in human mammary gland organoid morphology and proteome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (11), e2115308119. DOI: 10.1073/pnas.2115308119.

Xiao, Xiang; Zhang, Xiaowei; Zhang, Caiqin; Li, Jie; Zhao, Yansheng; Zhu, Ying et al. (2019): Toxicity and multigenerational effects of bisphenol S exposure to Caenorhabditis elegans on developmental, biochemical, reproductive and oxidative stress. In: *Toxicology research* 8 (5), S. 630–640. DOI: 10.1039/c9tx00055k.

Yang, Yun; Zhang, Xiangru; Jiang, Jingyi; Han, Jiarui; Li, Wanxin; Li, Xiaoyan et al. (2022): Which Micropollutants in Water Environments Deserve More Attention Globally? In: *Environmental science & technology* 56 (1), S. 13–29. DOI: 10.1021/acs.est.1c04250.

Yokosawa, Rikuou; Noma, Kentaro (2024): A nuclear hormone receptor nhr-76 programs age-dependent chemotaxis decline in C. elegans. In: *bioRxiv*, 2024.08.30.609799. DOI: 10.1101/2024.08.30.609799.

Zhang, Hui; Chen, Weiyang (2023): Automated recognition and analysis of body bending behavior in C. elegans. In: *BMC Bioinformatics* 24 (1), S. 175. DOI: 10.1186/s12859-023-05307-y.

Zhang, Hui; Gao, Shan; Chen, Weiyang (2022): Automated recognition and analysis of head thrashes behavior in C. elegans. In: *BMC Bioinformatics* 23 (1), S. 87. DOI: 10.1186/s12859-022-04622-0.

Zhao, Yunli; Yang, Ruilong; Rui, Qi; Wang, Dayong (2016): Intestinal Insulin Signaling Encodes Two Different Molecular Mechanisms for the Shortened Longevity Induced by Graphene Oxide in Caenorhabditis elegans. In: *Sci Rep* 6 (1), S. 24024. DOI: 10.1038/srep24024.

Zhou, Dong (2018): Ecotoxicity of bisphenol S to Caenorhabditis elegans by prolonged exposure in comparison with bisphenol A. In: *Enviro Toxic and Chemistry* 37 (10), S. 2560–2565. DOI: 10.1002/etc.4214.

Zhou, Dong; Yang, Jie; Li, Hui; Lu, Qiang; Liu, Yong-di; Lin, Kuang-Fei (2016): Ecotoxicological evaluation of low-concentration bisphenol A exposure on the soil nematode Caenorhabditis elegans and intrinsic mechanisms of stress response in vivo. In: *Enviro Toxic and Chemistry* 35 (8), S. 2041–2047. DOI: 10.1002/etc.3349.

Zimmerman, Emily K.; Cardinale, Bradley J. (2014): Is the relationship between algal diversity and biomass in North American lakes consistent with biodiversity experiments? In: *Oikos* 123 (3), S. 267–278. DOI: 10.1111/j.1600-0706.2013.00777.x.