

HORMOONVERSTORING BIJ DE ESTUARIENE INVERTEBRAAT *NEOMYSIS INTEGER* (CRUSTACEA; MYSIDACEA)

Verheyden Karolien

Universiteit Gent, Laboratorium voor Milieutoxicologie en Aquatische Ecologie
Jozef Plateastraat 22, B-9000 Gent
Huidig adres: Gorsendorp 31, B-3803 Sint-Truiden
E-mail: lienverheyden@hotmail.com

De problematiek van de hormoonverstoring is de laatste jaren uitgegroeid tot een intensief onderzocht en politiek geladen onderwerp met mondiaal karakter. Zowel natuurlijke als nog betrekkelijk onbekende milieuverontreinigende stoffen blijken de hormoonhuishouding van mens en dier zodanig te kunnen verstoren dat nadelige effecten op de ontwikkeling, voortplanting en overleving optreden. Tot op heden werd vooral aandacht besteed aan de impact van potentiële hormoonverstoorders op vertebraten. Dit is verwonderlijk aangezien invertebraten vaak de belangrijkste groep van organismen zijn in onze ecosystemen. Het besef is echter gegroeid dat een grondige studie naar hormoonverstoring bij invertebraten vereist is om de potentiële gevolgen ervan op het ecosysteem in te schatten, te beperken of te vermijden.

Uit de literatuurstudie blijkt het gebrek aan fundamentele kennis aangaande hormoonwerking bij invertebraten. Dit hiaat maakt de studie naar de effecten van potentiële endocriene verstoorders op invertebraten tot een complex onderzoeksgebied. Bovendien is er weinig geweten over de aanwezigheid en verspreiding van deze endocrien verstorende stoffen in water, waterbodems en biota, en zijn er momenteel nauwelijks testmethoden of biomarkers beschikbaar voor de detectie van endocriene verstoring bij invertebraten. Nochtans werden de laatste jaren reeds een aantal eindpunten naar voor geschoven als biomarkers voor hormoonverstoring bij invertebraten.

Zo werden in het kader van dit afstudeerwerk het energie- en steroïdmetabolisme van de estuariene aasgarnaal *Neomysis integer* (Crustacea; Mysidacea) bestudeerd en gevalideerd als subletale, suborganismale biomarkers voor blootstelling aan hormoonverstorende stoffen.

In een eerste fase werd aan de hand van laboratoriumexperimenten met *N. integer* gepoogd een inschatting te maken van de invloed van geslacht- en leeftijdspecifieke aspecten en de voedselbeschikbaarheid op hormonaal gestuurde processen, namelijk het energie- en steroïdmetabolisme van *N. integer*.

Om de potentiële variabiliteit gerelateerd aan geslacht en leeftijd van het testorganisme te minimaliseren werd getracht een leeftijdspecifieke kweek op te starten van *N. integer*. Verschillende vrouwelijke en mannelijke organismen werden hiertoe afgezonderd in een apart aquarium. Ten gevolge van biofilmvorming in dit aquarium en een vertraging van de voortplanting van *N. integer* werd de poging om een leeftijdspecifieke kweek op deze wijze op te starten gestaakt en werd naar alternatieven gezocht. Aangezien reeds uitgebreid onderzoek is verricht naar de groei van *N. integer*, werd ervan uitgegaan dat

een selectie van leeftijdspecifieke organismen op basis van de lengte of het gewicht kan geschieden. Bij elk experiment werd getracht met juvenielen van ongeveer dezelfde lichaamslengte te werken en werd voor elk organisme een gewichtsanalyse uitgevoerd. Om de leeftijd optimaal in rekening te brengen is het in de toekomst aangewezen ook een exacte lengtebepaling uit te voeren op de blootgestelde organismen. De methodiek voor deze lengtebepaling werd reeds succesvol gebruikt in het kader van dit afstudeerwerk en biedt dus perspectieven voor toekomstige experimenten.

Met het oog op langere blootstellingen, waarbij de effecten van potentiële hormoonverstoorders op de reproductie en populatieparameters bijvoorbeeld zouden geëvalueerd worden, leek het interessant het effect van verschillende voedingsregimes van *N. integer* op de cellulaire energie allocatie (CEA) te bestuderen. Drie voedingsregimes werden getest, namelijk geen voeding, 100 en 150 *Artemia franciscana* per organisme per dag. De beide geteste *Artemia*-concentraties hadden geen significant verschillend effect op de energie-opname van *N. integer*, maar waren wel significant verschillend van de niet-gevoederde organismen. Aangezien *Artemia* nauplii op relatief eenvoudige wijze kunnen toegediend worden, lijkt het in de toekomst aangewezen met gevoederde organismen te werken. Dit zal leiden tot een meer realistische inschatting van de effecten van toxicanten op de energie-opname, maar biedt evenzeer potentieel om de voedselopname-efficiëntie te kwantificeren.

In een tweede fase werd met behulp van acute toxiciteitstesten de gevoeligheid van *N. integer* voor testosteron, methopreen, nonylfenol, flutamide, fenoxycarb, precocene, ethinylestradiol en chloorpyrifos getoetst. Uit deze experimenten kon geconcludeerd worden dat *N. integer* in vergelijking met andere aquatische organismen minstens even gevoelig is en deze gevoeligheid significant beïnvloed wordt door de blootstellingsduur.

Uitgaande van de gegenereerde toxiciteitsdata, werden in een volgende fase 96u-blootstellingen opgezet met subletale concentraties aan testosteron (een vertebraat androgeen), methopreen (een juveniel hormoon-analoog) en nonylfenol (een vertebraat oestrogeen-analoog). Effecten van deze toxicanten op het energiemetabolisme van *N. integer* werden bestudeerd uitgaande van de cellulaire energie allocatie (CEA). Deze analyse is gebaseerd op de meting van veranderingen in de energie allocatie in het testorganisme en meet de energiereserves (suikers, eiwitten en vetten) en het energieverbruik (cellulaire respiratie). Na 96u-blootstelling aan testosteron (TST) werden geen significante effecten waargenomen ten opzichte van niet-blootgestelde organismen op de afzonderlijke energiefracties en de totale beschikbare energie. Wegens een foutieve analyse van de elektronen transport (ETS)-activiteit waren de data voor het energieverbruik niet beschikbaar en konden geen eenduidige conclusies getrokken worden uit dit experiment. Methopreen en nonylfenol hadden analoge effecten op het energiemetabolisme van *N. integer*. Voor beide stoffen werd een duidelijke dosis-respons relatie van de CEA waargenomen, waarbij hogere blootstellingsconcentraties gepaard gaan met een afname van de CEA, voornamelijk door een stijging van de energieconsumptie. Een toename van de energievraag ten gevolge van toxische stress, wordt in eerste instantie gecompenseerd door meer energie op te slaan, maar deze compensatie voldoet niet op lange termijn of bij extreme abiotische of toxische stress na acute blootstellingen. Uit deze experimenten blijkt dat effecten op de CEA toxicant-specifiek zijn, en dus meer stoffen zouden moeten bestudeerd worden. Naar de toekomst toe is het eveneens aangewezen chronische

blootstellingen uit te voeren, om de subletale effecten op de energie allocatie van *N. integer* beter te kunnen evalueren. Het zou bovendien interessant zijn de voedselopname-efficiëntie in deze experimenten te incorporeren.

Voor methopreen en nonylfenol werden eveneens de subletale effecten op het testosteronmetabolisme onderzocht. Na de 96u-blootstelling werden de testorganismen *in vivo* blootgesteld aan exogeen toegediend testosteron waarna de verschillende testosteronmetabolieten geïdentificeerd en gekwantificeerd werden via HPLC-MS. Bij methopreen-blootgestelde organismen werden alle monohydroxy (OH)-metabolieten van testosteron in het medium teruggevonden en niet in extracten van gehomogeniseerde organismen. Bij nonylfenol-blootgestelde organismen werden geringe concentraties OH-metabolieten van testosteron ook in het organisme teruggevonden. In beide experimenten was het aandeel van het reductief testosteronmetabolisme groter dan dit van het oxidatief metabolisme. Subletale effecten op het testosteronmetabolisme van *N. integer* blijken volgens deze experimenten hoofdzakelijk gerelateerd aan hydroxylatie en reductie van testosteron.

In een laatste fase werden het energie- en steroïdmetabolisme gevalideerd met behulp van zowel laboratorium- als veldexperimenten. De CEA-test werd gevalideerd met behulp van de Scope for Growth (SfG)-assay, een gekende fysiologische biomarker. In een blootstellingsexperiment met chloorpyrifos, werden zowel effecten van blootstellingsconcentratie als -duur geëvalueerd. Er werd een significante correlatie waargenomen tussen de *in vitro* en *in vivo* respiratiemetingen van blootgestelde *N. integer*, wat erop duidt dat de ETS-meting een goed alternatief is voor de minder praktische en duurdere *in vivo* respiratiemeting. Bovendien bleken de toxicant-geïnduceerde wijzigingen van het energieverbruik van *N. integer* de bepalende factor voor wijzigingen in de CEA en de SfG. De stelling dat eindpunten op een lager niveau van biologische organisatie een hogere gevoeligheid bezitten, werd in dit experiment bevestigd, aangezien de cellulaire effecten van de CEA bij lagere concentraties optraden dan de supracellulaire effecten zoals deze in de SfG werden bepaald. Uitgaande van de gegenereerde resultaten in dit validatie-experiment en vooral door de hogere gevoeligheid van de CEA-respons, kan deze test als mogelijk alternatief of complementaire biomarker dienen voor de SfG.

Het *in situ* gebruik van biomarkers van het energiemetabolisme, en meer specifiek de CEA, en het testosteronmetabolisme, werd bestudeerd aan de hand van veldexperimenten met *N. integer* op de Westerschelde. Weliswaar werden enkel de CEA-analyses in het kader van dit afstudeerwerk besproken. Zowel seizoenale als plaatsgebonden variaties op de energie allocatie van *N. integer* werden geëvalueerd over de periode van 2001-2003. Het meest uitgesproken effect werd waargenomen op het energieverbruik, de fysiologische respons die ook bij laboratoriumblootstellingen de meest gevoelige bleek. In het stroomopwaarts gelegen gebied van het Schelde-estuarium, in de buurt van Antwerpen, werd een significante toename van het energieverbruik waargenomen. Deze zone wordt gekenmerkt door uiterst lage concentraties aan opgeloste zuurstof, waardoor *N. integer* hier vroeger nooit werd waargenomen. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt echter dat *N. integer* stroomopwaarts migreert door de verbeterde zuurstofconcentraties gedurende de voorbije jaren. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt bovendien dat deze migratie mogelijks leidt tot belangrijke pollutiegebonden effecten op de energie allocatie van *N.*

integer. Seizoenale effecten op het energiemetabolisme van *N. integer* in de Westerschelde waren veel minder uitgesproken en voornamelijk gerelateerd aan de biologie van deze soort in de Westerschelde. Een opvallende daling van de energie allocatie in de winter ten opzichte van deze in de lente en de zomer werd waargenomen. Hierbij werd verondersteld dat effecten van toxische stress zich waarschijnlijk het sterkst zullen laten gevoelen in de lente en de zomer wanneer de energievraag, voornamelijk voor reproductie, beduidend hoger is, dan bijvoorbeeld in de winter.

Uit laboratoriumexperimenten was reeds gebleken dat de CEA-test en de *in vivo* biotransformatie van exogeen toegediend testosteron goede perspectieven bieden als biomarkers voor de bepaling van toxische en abiotische stress op het energie- en steroïdmetabolisme van *N. integer*. Uit deze veldexperimenten blijkt dat de CEA ook *in situ* potentieel heeft als biomarker ter detectie van toxische effecten op het energiemetabolisme van *N. integer*. De resultaten van het veldexperiment voor de testosteronmetabolisatie door *N. integer* zijn momenteel nog niet beschikbaar. Uit de laboratoriumexperimenten is echter gebleken dat deze biomarker vermoedelijk ook bruikbaar is voor de detectie van effecten op het testosteronmetabolisme van *N. integer* in het veld. De slaagkans van dergelijke veldexperimenten zal echter afhankelijk zijn van een voldoende uitgebreide dataset met 'normale waarden', verkregen uit fundamenteel onderzoek in het laboratorium en in het veld zodat langetermijneffecten kunnen ingeschat worden en kunnen onderscheiden worden van natuurlijke variatie.