

## **IN VITRO EMBRYOGENESE VAN NEOMYSIS INTEGER (CRUSTACEA: MYSIDACEA) ALS POTENTIËLE INDICATOR VOOR ENDOCRIENE VERSTORING**

Bruwiere Stijn

Onderzoeksgroep Mariene Biologie, Universiteit Gent  
Krijgslaan 281 (S8), B-9000 Gent  
Onderzoeksgroep Milieutoxicologie, Universiteit Gent  
Jozef Plateastraat 22, B-9000 Gent  
Huidig adres: Driesstraat 62, B-9050 Ledeborg  
E-mail: stijn.bruwiere@ugent.be

Een endocriene verstoorder is een exogene substantie die een nadelige invloed heeft op een levend organisme of op zijn nakomelingen door de rechtstreekse interactie met zijn hormonaal of endocrien systeem. Processen zoals groei, vervelling, reproductie, ontwikkeling, osmoregulatie, feromoonproductie en nog enkele andere aspecten van de (invertebraten)fysiologie staan onder hormonale controle en kunnen dus potentieel beïnvloed worden. In aquatische milieus komen een groot aantal potentiële endocriene verstoorders terecht. Deze zijn afkomstig uit huishoudelijke en industriële lozingen van afvalwater, het gebruik van agrochemicaliën, de verontreiniging van bodems en afvalwater, de scheepvaart, dumpingen en atmosferische uitval.

Het onderzoek naar de impact van endocriene verstoorders op het milieu werd de laatste jaren sterk opgevoerd. Naast ecologische en de economische belangen van de industrie mengt ook de politieke wereld zich in deze problematiek (Colborn *et al.*, 1996, Depledge and Billingham, 1999, Krimsky, 2000). Het mogelijke effect van endocriene verstoring op zowel invertebraten, vertebraten en uiteindelijk op aspecten van de volksgezondheid zoals een verhoogd risico op borstkanker en een verminderde vruchtbaarheid bij mannen, is daarom dringend aan een wetenschappelijke evaluatie toe. Niettegenstaande invertebraten 95% van alle diersoorten vertegenwoordigen (Barnes, 1980) wordt er relatief weinig inspanning geleverd naar onderzoek over hun bijdrage in de signalisatie van potentiële endocriene verstoorders van het milieu. Omgevingstoxicologen nemen nu algemeen aan dat de invertebraten belangrijk zijn voor ecotoxicologische testen (ECETOC, 1996) en voor het opvolgen van de veranderingen in omgevingscondities (LeBlanc and Bain, 1997).

Er zijn goede argumenten om Crustacea als testorganisme te kiezen om de impact van endocriene verstoorders te bepalen: (1) ze komen zeer algemeen voor in zoetwater, estuaria en ondiepe kustwateren, (2) ze vormen belangrijke schakels in aquatische voedselwebben, (3) ze zijn gevoelig aan de effecten van endocriene verstoring (US-EPA 2002a), (4) hun endocriene systemen zijn relatief goed gekend (De Fur *et al.*, 1999). Bij de Crustacea werden al enkele stoffen als endocriene verstoorder geïdentificeerd. Zware metalen zoals cadmium (Bodar *et al.*, 1990) en selenium (Schultz *et al.*, 1980) hebben een nadelig effect op de hormonale regulatie van de metamorfose bij de crustaceeën.

Het pesticide methopreen werd als significante endocriene verstoorder geïdentificeerd

bij de vervelling, groei en reproductie van estuariene crustaceeën (McKenney and Matthews, 1990, McKenney and Celestial, 1996, Lawrence and Poulter, 2002).

Estuaria behoren tot de meest productieve ecosystemen van het mariene milieu. Endocrien versturende stoffen uit het grond- en oppervlaktewater komen via de estuaria uiteindelijk in zee terecht. Door de sterk fluctuerende abiotische factoren (saliniteit, temperatuur, opgeloste hoeveelheid zuurstof, turbiditeit,...) die in estuaria heersen, ondervinden de aanwezige organismes een zekere stress. De impact van endocriene verstoring op estuariene organismes zou dan ook relatief groter zijn dan de impact op zuiver mariene organismen. In West-Europese estuaria is de brakwateraasgarnaal *Neomysis integer* (Mysidacea) omwille van zijn abundant voorkomen en zijn belangrijke positie in het voedselweb een geschikte kandidaat voor ecotoxicologische testen. Daarnaast is er een goede kennis over zijn voorkomen, populatiedynamica, voeding, groei en is er een kweekprotocol beschikbaar (Mees *et al.*, 1994, Fockedey *et al.*, 1999, US-EPA 2002a, Verslycke *et al.*, 2004).

In natuurlijke omstandigheden gebeurt de embryonale ontwikkeling bij de Mysidacea in een broedkamer (marsupium). Gezien doorheen het opake marsupium de ontwikkeling moeilijk te volgen is, werd een *in vitro* methodiek opgesteld voor de embryogenese van *Neomysis integer*. Dit biedt de mogelijkheid om de morfologie en de duur van de opeenvolgende ontwikkelingsstadia gedetailleerd te beschrijven. In een tweede luik werden de gecombineerde effecten van temperatuur en saliniteit op embryologische eindpunten onderzocht. Een empirische determinatie van de optimale temperatuurs- en saliniteitscondities is immers noodzakelijk wanneer men onder laboratoriumomstandigheden de reproductie en de ontwikkeling optimaal wil laten verlopen. Ten slotte werd de test gevalideerd door de embryo's bloot te stellen aan een endocrien versturende stof (methopreen) en door de meest gevoelige eindpunten aan te duiden.

Adulte vrouwtjes van *Neomysis integer* met rijpe ovaria werden geselecteerd en door adulte mannetjes bevrucht. Na drie dagen werden de embryo's uit het marsupium verwijderd en *in vitro* tot ontwikkeling gebracht. Er werd aangetoond dat de *in vitro* embryogenese gevoelig verbeterd kan worden (in overleving en ontwikkelingsduur) door het water continu in beweging te houden door horizontale rotatie op een schudtafel (80 rpm). Dit positieve effect was het duidelijkst merkbaar tijdens de laatste ontwikkelingsfase (postnaupliaire larven).

Na een gedetailleerde morfologische studie werden de 3 ontwikkelingsstadia voor *Neomysis integer* duidelijk afgebakend: het embryologisch stadium I, het naupliair stadium II en het postnaupliair stadium III. De volgende eindpunten van de embryologie werden vooropgesteld: het overlevingspercentage per dag, het "percentage survival days" (Jones, 1972), het percentage hatching tot juveniel, de duur van ieder ontwikkelingsstadium en de afmetingen van de embryo's.

De eindpunten werden bij 12 verschillende temperatuurs- en saliniteitscombinaties opgevolgd. De bevindingen uit dit onderzoek bevestigen de stelling dat de saliniteit een zeer beperkte invloed heeft op de ontwikkelingsduur, maar wel sterk de kans tot een succesvolle embryologische ontwikkeling beïnvloedt. De ontwikkelingsduur wordt daarentegen hoofdzakelijk door de temperatuur bepaald. Er kan voor *Neomysis integer* met dalende temperatuur een significante toename van de ontwikkelingsduur

vastgesteld worden. Door een "response surface model" te fitten kon het optimum voor de *in vitro* embryogenese rond 15 PSU bepaald worden. Opmerkelijk, gezien de meeste populaties van *Neomysis integer* in een lagere saliniteitszone leven in Europese estuaria. Een mogelijke verklaring voor dit fenomeen kan gezocht worden in een competitief voordeel van het leven in de lagere saliniteitszone (lagere predatiedruk, betere voedingsomstandigheden). Een mogelijke osmotische regulatie binnenin het marsupium of het optreden van seizoensale migraties van adulte wijfjes naar de optimale saliniteitszone voor de embryologische ontwikkeling moeten verder onderzocht worden.

Bij de hormonale regulatie van de metamorfose en de reproductie bij Insecta is er naast de initiërende functie van de ecdysteroiden ook de aanwezigheid van het juveniel hormoon (JH) vereist. Deze hormonen staan in voor de embryologische ontwikkeling, met name de regulatie van de vervellingen binnen het ei en tijdens de larvale groei (Sbrenna, 1991, Riddiford, 1994). Sommige insecticiden, zoals methopreen, zijn synthetische analogen van het JH. Methopreen werd reeds als endocriene verstoorder bij de reproductie en de ontwikkeling van andere Mysidacea geïdentificeerd (McKenney and Celestial, 1996).

In deze studie met *Neomysis integer* zorgen blootstellingen van 1 en 100  $\mu\text{g}$  methopreen/l voor een lager hatchingspercentage en bij blootstellingen vanaf 0.01  $\mu\text{g}$  methopreen/l wordt een vertraagde ontwikkeling van stadium II en III waargenomen. Deze twee eindpunten zijn zeer geschikt voor de signalisatie van endocriene verstoring bij de embryogenese van *Neomysis integer*.

De embryologische ontwikkeling van *Neomysis integer* gebeurt in een relatief korte tijdsspanne (gemiddeld 15-16 dagen bij 16°C en 15 PSU). Het is een kritische periode in de levenscyclus, waar effecten door endocrien verstorende stoffen een grote impact kunnen hebben op de populatiedynamica van de soort ('critical time window'). Er werd met succes een methodiek opgesteld voor de *in vitro* embryogenese van *Neomysis integer*. Door de optimale temperatuurs- en saliniteitscondities te bepalen en de gebruikte eindpunten te evalueren, werd uiteindelijk een test verkregen die potentiële endocriene verstoorders op een efficiënte en snelle manier zou kunnen screenen. In het kader van dit eindwerk kon de opgestelde test slechts voor één endocriene verstoorder worden gevalideerd. Er is dus nood aan verder en meer uitgebreid wetenschappelijk onderzoek.

## References

- Barnes R.D. 1980. Invertebrate Zoology. W.B. Saunders, Philadelphia, PA.
- Bodar C. W. M., P.A. Voogt and D.I. Zandee. 1990. Ecdysteroids in *Daphnia magna*: their role in moulting and reproduction and their levels upon exposure to cadmium. *Aq. Tox.* 17: 339-350.
- Colborn T., D. Dumanoski and J.P. Myers. 1996. Our stolen future. Penguin Books, New York NY, 1-306.
- DeFur P.L., M. Crane, C. Ingersoll and L. Tattersfield. 1999. Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing, and Assessment. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, pp 1-303.

- Depledge M. H. and Z. Billingham. 1999. Ecological relevance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Mar. Pollut. Bull.* 39: 32-38.
- ECETOC: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. (1996).
- Environmental oestrogens. A compendium of test methods. Brussels, Belgium: ECETOC Document No. 33.
- Fockedey N. and J. Mees. 1999. Feeding of the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* in the maximum turbidity zone of the Elbe, Westerschelde and Gironde estuaries.
- Jones M.B. 1972. Effects of salinity on the survival of the Jaera albifrons Leach group of Species (Crustacea: Isopoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 9: 231-237.
- Krimsky S. 2000. Hormonal chaos. John Hopkins University Press, Baltimore, M.D., 1-284.
- Lawrence A.J. and C. Poulter. 1996. The potential role of the estuarine amphipod *Gammarus Duebeni* in sub-lethal ecotoxicology testing. *Water Sci. Technol.* 34: 93-100.
- LeBlanc G. A. and L.J. Bain. 1997. Chronic toxicity of environmental contaminants: Sentinels and biomarkers. *Environ Health Perspect* 105: 65-80.
- McKenney C. L. Jr. and D.M. Celestial. 1996. Modified survival, growth and reproduction in an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) exposed to a juvenile hormone analogue through a complete life cycle. *Aquatic Toxicol.* 35: 11-20.
- Mc Kenney C. L. Jr. and E. Matthews. 1990. Alterations in the energy metabolism of an Estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) as indicators of a stress from chronic pesticide Exposure. *Mar. Environ. Res.* 30: 1-19.
- Mees, J., Z. Abdulkerim and O. Hamerlynck. 1994. Life history, growth and production of *Neomysis integer* in the Westerschelde estuary (SW Netherlands). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 109: 43-57.
- Riddiford L. M. 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General Considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect. Physiol.* 24: 213-274
- Sbrenna G. 1991. Roles of morphogenetic hormones in embryonic cuticle deposition Arthropods. In: Gupta, A. P., editor. *Morphogenetic hormones of arthropods*. New Brunswick N. J. Rutgers Univ. Pr. P44-80.
- Schultz T., S.R. Freeman and J.N. Dumont. 1980. Uptake, depuration and distribution of selenium in *Daphnia* and its effects on survival and ultrastructure. *Arch. Env. Contamination & Tox.* 9: 23-40.
- US-EPA. 2002a. Draft detailed review paper on mysid life cycle toxicity test, EPA/68-W-01-023, Battelle, Columbus, OH, pp. 1-70.
- Verslycke T.A., N. Fockedey, C.L. McKenney Jr., S.D. Roast, M.B. Jones, J. Mees and C.R. Janssen. 2004. Mysids as potential test organisms for the evaluation of environmental endocrine disruption: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23 (5): 1219-1234.