

## ENDOKRINE DISRUPTION BEI INVERTEBRATEN – REPRODUKTIONSTEST MIT WASSERSCHNECKEN

## ENDOCRINE DISRUPTION IN INVERTEBRATES – REPRODUCTION TEST USING AQUATIC SNAILS

### Hintergrund und Ziele

Die Exposition gegenüber Schadstoffen aus der Umwelt kann sich negativ auf die Entwicklung und Reproduktion von Organismen auswirken. Insbesondere das Hormonsystem spielt als Zielort hier eine entscheidende Rolle. Substanzen, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften das Hormonsystem von Organismen beeinflussen können, werden als sogenannte endokrine Disruptoren bezeichnet. Im Rahmen der Risikobewertung von Umweltchemikalien sind aquatische Wirbeltiere mit Fischen und Amphibien bereits im Richtlinienprogramm der OECD repräsentiert. Anders sieht es bei den aquatischen Invertebraten aus. Im Gegensatz zu der der Wirbeltiere ist die Hormonphysiologie von Invertebraten noch wenig erforscht. Die Artenvielfalt ist aber ungleich größer, was sich in unterschiedlichsten Hormonsystemen widerspiegelt. Ein OECD-Rahmenprogramm hat zum Ziel, Prüfrichtlinien zur Detektion endokriner Disruptoren auch für Invertebraten auf den Weg zu bringen. Neben den Arthropoden steht hier die große Gruppe der Mollusken im Fokus. Als geeignete Testorganismen gelten die Wasserschnecken *Potamopyrgus antipodarum* sowie *Lymnaea stagnalis*.

### Projektbeschreibung

Für die genannten Schneckenarten stehen bereits Entwürfe für Testrichtlinien zur Verfügung. Das Fraunhofer IME ist am Validierungsprozess für beide Richtlinien beteiligt. Da die Reproduktion als hormongesteuerter Prozess ein Zielort für endokrine Disruption darstellt, wird diese Lebensleistung in den Tests abgebildet. Die Schnecken werden über einen bestimmten Zeitraum mit einer potenziell hormonaktiven Testsubstanz belastet; der Reproduktionserfolg wird in Form der Nachkommenzahl gemessen. Eine Pilotstudie wurde mit *P. antipodarum* durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine in-house-Zucht auf Basis von Freilandfängen etabliert. Eine erste Studie wurde mit dem potenten Östrogen 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol (EE2) durchgeführt. In einer zweiten Studie wurde mit Fadzolol ein selektiver Aromatase-Inhibitor getestet. Die Testdauer betrug jeweils

28 Tage. Jede Teststufe wurde aus vier Gruppen à zehn Tieren zusammengesetzt. Am Testende wurden die Embryos aus der Bruttasche der adulten Tiere freipräpariert und gezählt. Zudem konnte das Entwicklungsstadium der Embryos anhand der Schalenreife bestimmt werden (Figure 1).

### Ergebnisse

Sowohl 17 $\alpha$ -Ethinylöstradiol als auch Fadzolol zeigten eine Wirkung auf das Reproduktionsverhalten von *P. antipodarum*. Für das Östrogen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der Nachkommenzahl (Figure 2). Der Aromatasehemmer dagegen bewirkte eine deutliche Abnahme. Die berechneten Effektgrößen stimmten gut mit vorhandenen Literaturdaten überein. Die Ergebnisse zeigen die hohe Empfindlichkeit der untersuchten Molluskenart gegenüber auch bei Wirbeltieren endokrin wirksamen Substanzen.

### Fazit

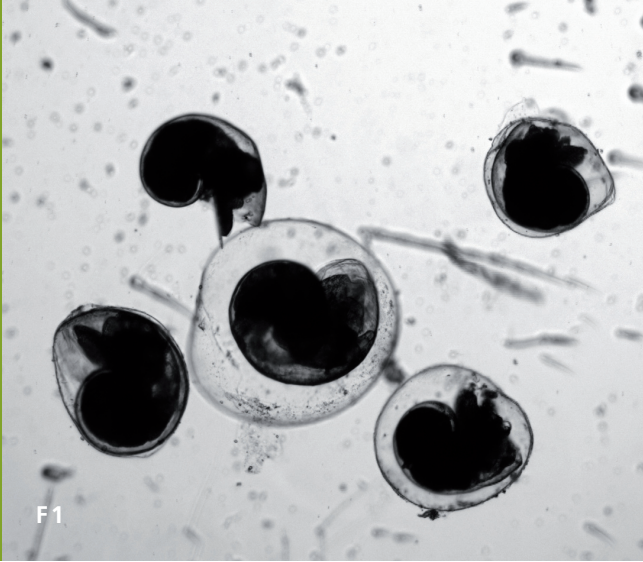
Das Testsystem konnte erfolgreich am Fraunhofer IME etabliert werden. In einem zweiten Schritt folgt nun auch *L. stagnalis*. Für beide Arten wird in 2014 ein internationales Ringtest-Programm durchgeführt, an denen das Fraunhofer IME teilnimmt.

### Auftraggeber / Sponsor

Finanzierung durch Fraunhofer-Eigenmittel

### Kooperationspartner / Cooperation partner

Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Institut für Ökologie, Evolution und Diversität;  
Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Expérimentale Ecologie et Ecotoxicologie Aquatiques, Rennes, France



## Background and aims

Exposure to pollutants can negatively impact the development and reproductive capacity of many organisms, particularly by targeting the hormone system. Substances with chemical properties that affect the hormone system are known as endocrine disruptors. The risk assessment of potential endocrine disruptors under OECD test guidelines typically involves vertebrates (usually fish or amphibians) whereas invertebrates have received comparatively little attention. This is because less is known about invertebrate hormonal regulation and there is more diversity in the hormone systems of invertebrates compared to vertebrates.

The OECD framework on endocrine disruptors recommended the development of guidelines to detect potential endocrine disruptors in invertebrates, particularly arthropods and mollusks. The aquatic snails *Potamopyrgus antipodarum* and *Lymnea stagnalis* have been selected as suitable test organisms.

## Approach

Draft protocols for test guidelines already exist for both snail species. The Fraunhofer IME is involved in the validation process for both sets of guidelines. Reproduction is a major hormone-dependent parameter targeted by endocrine disruptors and is therefore the principal endpoint in these tests.

The snails are exposed to potential endocrine disruptors and the reproductive output is evaluated by counting the number of offspring. Pilot studies using an in-house *P. antipodarum* culture established from outdoor captures tested the potent estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) and the selective aromatase inhibitor fadrozole. In each case, the test duration was 28 days. Every test level comprised four groups of ten animals. At the end of the test, the embryos were separated from the brood pouch of the adult animals and counted. Egg shell development was used to assess the embryonic stage of the offspring (Figure 1).

## Results

Both 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and fadrozole affected the reproductive output of *P. antipodarum*. A dose-dependent increase in the number of embryos was observed for the estrogen (Figure 2), whereas the aromatase inhibitor induced a significant decrease in offspring. The calculated effect concentrations agreed with those reported in the literature. The results confirmed the high sensitivity of the test organism towards endocrine disruptors.

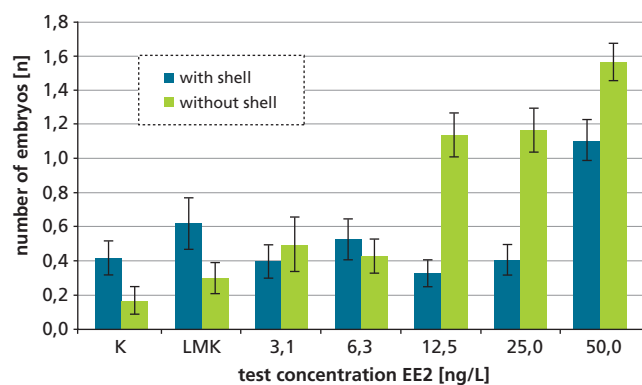


Figure 2: Number of embryos after exposure to EE2, with and without shell.

## Conclusion

The reproduction test using the aquatic snail *P. antipodarum* was successfully implemented at the Fraunhofer IME. In a next step, the second snail species (*L. stagnalis*) will be established with regard to culture and draft test protocol. In 2014, Fraunhofer IME will take part in an international ringtest program to further validate these aquatic snail reproduction tests.

## Contact / Ansprechpartner

Matthias Teigeler  
 Tel: +49 2972 302-163  
 matthias.teigeler@ime.fraunhofer.de

Figure 1: The different developmental stages of *P. antipodarum* embryos.