

LEBENSZYKLUSSTUDIEN MIT FISCHEN: STATISCHE VS. DURCHFLUSSEXPOSITION

FISH LIFE CYCLE TESTS STATIC VS. FLOW-THROUGH EXPOSURE

Hintergrund und Ziele

Die Belastung aquatischer Systeme mit Schadstoffen ist charakterisiert durch zeitliche und räumliche Variabilität von Substanzkonzentrationen. In der Risikoabschätzung versucht man dies durch zeitlich gewichtete Durchschnittskonzentrationen zu adressieren. Bei endokrin wirksamen Substanzen ist das oftmals problematisch, da die gegenüber der Belastung empfindlichsten Lebensphasen und die Phasen, in denen sich der Effekt ausprägt, verschieden sein können. Im beschriebenen Projekt wurden zwei Lebenszyklusstudien (Life Cycle Test, LCT) mit dem Zebraquarienfisch (*Danio rerio*) durchgeführt. Als Prüfsubstanz diente Fulvestrant (anti-östrogenes Krebstherapeutikum). Die Studien hatten das Ziel, die empfindlichen populationsrelevanten Endpunkte gegenüber einem Anti-Östrogen zu detektieren und die Dauer und Schwere einer Wirkung nach Kurzzeitexposition zu charakterisieren.

Projektbeschreibung

Um die Empfindlichkeit nach einmaliger Applikation mit einer bewusst hoch gewählten Konzentration (Peak) des Anti-Östrogens zu untersuchen, wurde zunächst ein LCT in einem statischen Wasser-Sedimentsystem (Figure 1) durchgeführt. Bei Testbeginn wurden drei verschiedene Lebensstadien (befruchtete Eier, juvenile sowie adulte, laichfähige Tiere) gleichzeitig mit einer Peak-Konzentration von Fulvestrant belastet. Die Verwendung von künstlichem Sediment gewährleistete die Stabilität der Wasserqualität über den gesamten Testzeitraum von ca. 140 Tagen. Ein weiterer LCT wurde unter kontinuierlicher Belastung in einem Durchflusssystem (Figure 2) durchgeführt. Auf Basis der Ergebnisse aus dem statischen Test wurden mit Hilfe von Betrachtungen zur Bioakkumulationsfähigkeit der Substanz die Testkonzentrationen für den Durchflusstest abgeleitet. Hierzu wurden Daten zur Abnahme der Substanz aus der Wasserphase und Daten zur Lipophilie der Testsubstanz verwendet. In einem abschließenden Vergleich wurde die Empfindlichkeit der populationsrelevanten Endpunkte unter den verschiedenen Expositionsbedingungen untersucht.

Ergebnisse

Bezogen auf die Initialkonzentration war die Durchflusstudie hinsichtlich der Wirkschwelle etwa 50fach empfindlicher als die Studie mit Peak-Belastung (DT_{50} : 16 h). Über gemittelte Konzentrationen und Einbeziehung der Bioakkumulation wurden die Wirkschwellen unter kontinuierlicher Exposition dennoch sehr gut abgeschätzt. Unter Peak-Belastung waren die Überlebensrate der frühen Lebensstadien und die Befruchtungsrate die empfindlichsten Endpunkte (Figure 3); im Durchfluss kam die Eizahl hinzu. Wachstum und Entwicklungsgeschwindigkeit waren nicht beeinträchtigt. Eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses, wie in einer Studie des Fraunhofer IME für das Anti-Östrogen Tamoxifen beobachtet, trat unter den getesteten Expositionsbedingungen nicht auf.

Fazit

Anti-Östrogene wirken intrinsisch am stärksten auf die Befruchtungsrate und die larvale Überlebensrate der Folgegeneration. Wirkungen auf die Befruchtungsrate erholen sich nach Abklingen der Exposition schnell. Das statische Versuchssystem eignet sich allgemein gut für einen Vergleich der Endpunktrelevanz bei Peak-Belastungen, etwa durch Passage von Kläranlagenabflüssen oder infolge Pflanzenschutzmittelapplikationen. Endokrine Wirkungen durch Kurzzeit- und Dauerbelastungen sind über die Einbeziehung der Akkumulation gut miteinander vergleichbar.

Auftraggeber / Sponsor

Umweltbundesamt, FKZ 3709 65 405

Ansprechpartner / Contact

Dipl.-Ing. Matthias Teigeler

Tel: +49 2972 302 -163

matthias.teigeler@ime.fraunhofer.de



Background and aims

The impact of substances on aquatic systems is characterized by temporal and spatial changes in concentration. Such changes must be taken into account in risk evaluations by comparing intrinsic toxicity data with time-weighted average exposure concentrations. This is challenging, particularly when evaluating endocrine-effective substances, because the time windows of effect setting (relevant exposure) and the expression of effects (relevant endpoint observation) may vary. We therefore carried out two zebrafish (*Danio rerio*) life cycle tests (LCTs) using the model anti-estrogen fulvestrant to determine the most sensitive population-relevant endpoints and to characterize the exposure time and manifestation of effects. Fulvestrant, which is used in cancer therapy, was selected as a model substance based on pre-test results and extensive literature research.

Approach

The sensitivity of zebrafish to a single, high-dose application of the model substance was determined in a LCT set up in a static water sediment system (Fig. 1). Fish at three different life stages (fertilized eggs, 4-week-old juveniles and spawning adults) were simultaneously exposed to different peak concentrations of fulvestrant. Artificial sediment was used to ensure the stability of both physical and chemical parameters during the study, which lasted for approximately 140 days. Another LCT was then carried out under continuous exposure in a flow-through system (Fig. 2), to focus on the intrinsic toxicity of the anti-estrogen. The concentrations used in the flow-through test were derived by considering the results of the static test and the bioconcentration kinetics of the test substance, including dissipation from the water body and lipophilicity. The sensitivity of the population-relevant endpoints under different exposure conditions was assessed in the final evaluation.

Results

When related to the initial concentrations, the effect thresholds were more sensitive by a factor of 50 under flow-through conditions than after peak exposure (dt_{50} : 16 h). However, by using time-weighted average concentrations and taking the bioconcentration into account, it was possible to predict the effect thresholds accurately under continuous exposure. After peak exposure, the survival rates of the early life stages and the fertilization rate were the most sensitive endpoints (Fig. 3). Fecundity was also a sensitive endpoint under flow-through conditions. Growth and development time were not affected. A shift in the sex ratio, as previously observed for the anti-estrogen Tamoxifen citrate, was not observed within the fulvestrant concentration range we tested.

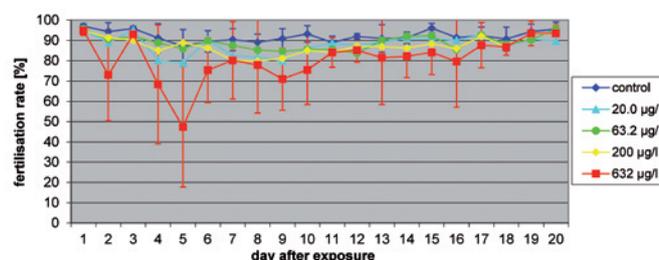


Figure 3: Fish Full Life Cycle Test in a static water sediment system: Effect on fertilization rate after peak exposure to fulvestrant.

Conclusion

Anti-estrogens intrinsically affect fertility in adults and larval survival in the filial generation. Effects on the fertilization rate recover quickly when exposure declines. Generally, a static study design is appropriate when comparing the relevance of different endpoints after peak exposure, e.g. following pesticide application or passage through sewage treatment plant effluents. By including kinetic data it is possible to compare endocrine effects caused by short-term and continuous exposure.

Figure 1 and 2: Fish exposure devices at the Fraunhofer IME: Static water sediment system (1), Flow-through system (2).