

## **Bioakkumulation und östrogenische Effekte von DDT, Arochlor 1254 und ihre 1:1 Mischung auf Zebrafisch (*Brachydanio rerio*)**

### **Zusammenfassung:**

Akkumulationsraten, Eliminationsgeschwindigkeiten und Metabolisierungswege zahlreicher Chlorierter Kohlenwasserstoffe (u.a. DDT, PCBs) wurden in der letzten Jahren ausreichend aufgeklärt. Ihre Organismenspezifischen Wirkungen waren dagegen bis in die Gegenwart Gegenstand kontroverser Diskussionen. Das gilt auch für für mögliche endokrine Wirkungen, für Beeinflussungen der Spermiohistogenese und damit auch mögliche Veränderungen der Populationsvitalität. Durch eine kritische Literatur-Recherche lässt sich auch der Nachweis erbringen, dass insbesondere bei Stoffgemischen (u.a. PCBs) zwar die rückstandsanalytisch leichter nachweisbaren diskutiert, die ökowirksamsten jedoch mangels ausreichender Laborqualitätssicherungsstandards kaum berücksichtigt wurden.

Substanzen mit östrogenen Wirkung sind ökosystemer naturgemäß von besonderem Interesse. Drei experimentell zu klärende Fragen stehen dabei im Mittelpunkt.

1. Besitzen die Chemikalien eine insbesondere männliche Geschlechtsorgane schädigende Wirkung?
2. Können bestimmte Chemikalien-Gemische männliche Östrogenrezeptoren (hER) binden und/oder aktivieren?
3. Sind bestimmte Entwicklungsstadien eines Organismus besonders empfindlich für spezifische Chemikalienwirkungen und können sie deshalb als Screening-Test-Systeme eingesetzt werden?

In vorliegender Studie wurde deshalb versucht, die Wirkungszusammenhänge von DDT und Arochlor 1254 (A 54) als Einzelsubstanzen und in 1:1-Gemischen auf östrogene Effektivität an dem Zebrafisch (*Brachydanio rerio*) zu bestimmen.

Dazu wurden zunächst in Vorversuchen unterschiedliche Konzentrationen und Gemische der Chlorierten Kohlenwasserstoffe in Kurz- und Langzeit-Expositionstests auf ihre Wirkung überprüft.

Die Konzentrationen der Mischungen lagen zwischen 0.05 µg/l und 500 µg/l und unterschieden sich voneinander um den Faktor 10. Dabei stellte sich heraus, dass Testkonzentrationen von 500µg/l für Zebrafische zu toxisch sind. Die LC50-Werte wurden für

DDT und die Chemikalienmischungen bestimmt. Die Auswertung aller Testkonzentrationen zeigte, dass die Mortalität bei den Chemikalienmischungen am höchsten war. Deshalb wurde überprüft, welche Menge der Chemikalien von der Zebrafische absorbiert wurde. Dazu wurde der „static fish test“ 305D nach der OECD-Richtlinie benutzt (Bioakkumulationstest). Nach den im Test ermittelten Daten wurden das Experiment mit vier Konzentrationen von DDT, A 54 sowie deren 1:1-Mischung, wiederum in jeweils um den Faktor 10 verstärkten Dosen zwischen 0.05 µg/l bis 50 µg/l durchgeführt. Der achttägige Test der Bioakkumulation mit DDT und A54 zeigte, dass die Zebrafische die Chemikalien aufnahmen und akkumulierten, doch stellte sich in allen Fällen kein Gleichgewicht ein. Eine Konzentration von 0.05 µg/l ertrugen die Zebrafische vor Ablauf der acht Tage; später waren die Chemikalien nicht mehr nachweisbar (NOEC-Wert). Bei allen anderen Konzentrationen stieg der Faktor der Bioakkumulation innerhalb der acht Tage (BCF8days) mit den jeweiligen Testkonzentrationen an. Die Werte des BCF8days-Tests belegten, dass Zebrafische DDT stärker als A 54 absorbierten.

Aufbauend auf diesen Analysen erfolgte die Untersuchung des Lebenszyklus der Zebrafische. Zunächst wurden die Eier verschiedenen Testkonzentratione der beiden Chemikalien und deren Mischungen ausgesetzt. Es stellte sich heraus, dass die Chemikalien signifikante Veränderungen der Brutzeit, der Pfortpflanzung und der Länge der Jungfische verursachten. Diese drei Parameter waren stramm mit dem Gehalt an Chemikalien korreliert. In allen Fällen überlebte kein Männchen eine Konzentration von 50 µg/l . Darüber hinaus ergaben sich Abweichungen zwischen der zu erwartenden und der experimentell ermittelten Länge ihrer Entwicklungsstadien, die je nach Pestizidgehalt um wenige bis viele Tage verzögert waren. Die bis zu sechswöchige Untersuchung der Entwicklungsstadien unter Einwirkung der Chemikalienmischung länger dauerte als bei reiner Pestizid-Applikation und dass die Zebrafische mehr A 54 als DDT vertrugen.

Während dieser Untersuchung wurde das Längenwachstum bestimmter Testexemplare gemessen. Mittels ANOVA lagen die F-Quotienten bei einem Freiheitsgrad von 4,4 bei 1,37, 1,65, und 0,88 für jeweils DDT, A 54 und Ihre Mischung. Das Längenwachstum der Zebrafische wurde bei höheren Testkonzentrationen stärker gehemmt und tendierte dazu, noch deutlich auszufallen, wenn sie in Testkammern aufwuchsen, die mit Chemikalienmischungen kontaminiert waren. Dass die Brutrate und der Anteil überlebender, erwachsener Männchen zurückgingen, sich die Entwicklungsstadien im Lebenszyklus verzögerten,

messbar waren und deshalb als „Konzentration unterhalb der Messschwelle“ (NOEC) einzustufen sind. Bei allen anderen Konzentrationen stieg der Faktor der Bioakkumulation innerhalb der 8 Tagen (BCF8days) mit der jeweiligen Testkonzentrationen in beiden Fällen an. Die Werte des BCF8days-Testes erwiesen, dass in dem vorgegebenen feuchten Milieu die zebrafischen DDT stärker als A54 absorbierten.

Dieser Studie folgte die Untersuchung des Lebenszyklus der zebrafischen; als Einstieg setzte ich deren Eier verschiedenen Testkonzentrationen der beiden Chemikalien und deren Mischung aus. Es stellte sich heraus, dass die Chemikalien signifikante Variationen in ihrer Brutzeit, der Fortpflanzung und der Länge der Jungfischen verursachen. Diese drei Parameter waren eng mit dem Gehalt an Chemikalien verknüpft; die Fischen sich also gegenüber höheren Konzentrationen empfindlicher zeigten. In allen Fällen überlebte kein Männchen eine Konzentration von  $50\mu\text{g/l}$ . Auch gab es Abweichungen zwischen der gewöhnlich zu erwartenden und der experimentell ermittelten Länge ihrer Entwicklungsstadien, die je nach Pestizidgehalt um wenige bis viele Tage verzögert waren. Die bis zu 6wöchige Untersuchung der Entwicklungsstadien der F-II Generation wies auf, dass die Ausbildung der verschiedenen Entwicklungsstadien unter Einwirkung der Chemikalienmischung länger dauerte als wenn die Pestizide pur verabreicht wurden und die zebrafischen mehr A54 als DDT vertrugen. Während dieser Untersuchung wurde das Längenwachstum bestimmter Testexemplare gemessen. Zum Vergleich der Ergebnisse lagen mit Hilfe der Fehlerrechnung (ANOVA) die F-Quotienten bei einem Freiheitsgrad von (4,4) bei 1.37, 1.65, und 0.88 für jeweils DDT, A54 und ihre Mischung. Das Längenwachstum der zebrafischen wurde bei höheren Testkonzentrationen stärker gehemmt und tendierte dazu, noch deutlicher auszufallen, wenn sie in Testkammern aufwuchsen, die mit der Chemikalienmischung kontaminiert waren.

Daß die Brutrate und der Anteil überlebender, erwachsener Männchen zurückgingen, sich die Entwicklungsstadien im Lebenszyklus verzögerten, die Population abnahm und das Wachstum der Testorganismen durch die Chemikalien und deren Mischung gehemmt wurden, könnte möglicherweise der Erkrankung der männlichen Geschlechtsorgane zurückgeführt werden. Deshalb wurden die Qualität und Quantität der Spermien, die die mit den Chemikalien kontaminierten männlichen zebrafische während der Paarung ausschieden, innerhalb gewisser Zeiträume untersucht. Nach den Methoden von Leong (1988) und Shapiro et al (1994) wurde jeweils nach 24 Stunden, 2 Wochen, einem bzw. zwei Monaten eine Probe entnommen. Sie zeigte, dass die Abnahme der gemessenen Spermienzahl mit der Chemikalienexposition zunahm, Konzentration der Testchemikalien und Einwirkzeit

bestimmen danach Anzahl, Aktivität und Lebensdauer der Spermien. Diese Abnahme steigt bei Pestizid-Gemischen signifikant an.

Um mehr über die Ursachen der Spermien-Degeneration herauszufinden, wurden Untersuchungen zur Hodenstruktur und Spermatogenese durchgeführt. Hierzu wurden Schnitte des Hodengewebes in EPON-812-Kunstharz eingeschlossen und halbdünne bzw. extrem dünne Schichten herausgeschnitten. Diese wurden licht bzw. elektronenmikroskopisch untersucht.

Unter dem Lichtmikroskop ließ sich eine Verminderung des Spermatidengehaltes im Lobulärlumen der Hoden deutlich erkennen. Diese Verminderung des Spermagehaltes fiel umso stärker aus, je höher die Testkonzentrationen und die Einwirkzeit waren. Ebenfalls schrumpften unter Einwirkung der Chemikalien der deferente Kanal, was den Raum zwischen den Lobulärlumen weitete und bei höheren Konzentrationen noch deutlicher abgrenzte und vergrößerte. Auf diesem Stand der Untersuchung wurde der Grund für die Abnahme der Spermatogenese elektronenmikroskopisch vertieft. Dadurch konnte gezeigt werden, dass noch nach zwei Monate Einwirkzeit der Chemikalien auf der letzten Stufe der Spermatogenese hauptsächlich als primäre Spermatiden vorlagen, dagegen aber nur wenige und manchmal sogar keinerlei sekundäre oder tertiäre Spermatiden, was die Anzahl der Mitochondrien reduzierte. Weiterhin wurde entdeckt, dass es keine heterophagen Vakuolen gab, deren Gegenwart im Zytoplasma ein Anzeichen phagozytischer Aktivität gegen Keimbestandteile wäre.

Allgemein könnte das Fehlen phagozytischer Aktivität, die eine wichtige Rolle in der Reifung der Spermatiden spielt, der Grund des Mangels an Spermatiden im Lumen sein. Schließlich mag sich also die Abnahme der Aktivität und Lebensspanne der Spermien, die bei den oben genannten Paarungen abgesondert wurden, dadurch erklären, dass die Entwicklung der Zytoplasma-Organzellen, wie beispielweise die Mitochondrien, gehemmt ist.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass DDT und A 54 synergetisch wirken können und Krankheiten an den Geschlechtsorganen männlicher Zebrafische, Reduktion ihres Wachstums und nachteilige Veränderungen in der Spermatogenese verursachen.