



Nieuwe methoden voor het opsporen van aquatische toxiciteit voor amfibieën

ASTRID BULDER, WAGENINGEN UNIVERSITEIT, LEERSTOELGROEP TOXICOLOGIE
MERIJN SCHRIKS, WAGENINGEN UNIVERSITEIT, LEERSTOELGROEP TOXICOLOGIE
ARNO GUTLEB, WAGENINGEN UNIVERSITEIT, LEERSTOELGROEP TOXICOLOGIE
TINKA MURK, WAGENINGEN UNIVERSITEIT, LEERSTOELGROEP TOXICOLOGIE

Amfibieënpopulaties staan onder druk. Wereldwijd is gesignaleerd dat populaties achteruitgaan, ook in Nederland. Het is nog niet bekend waardoor dit komt. Naast oorzaken als habitatvernietiging en verhoogde UV-straling speelt verstoring door toxische stoffen zeer waarschijnlijk ook een rol. Amfibieën staan tijdens hun ontwikkeling direct in contact met het aquatisch milieu en de daarin voorkomende verontreinigingen. Ook hun voedselketens hebben hun oorsprong in het aquatisch milieu. Naast een algemene gevoeligheid voor toxische stoffen die alle gewervelden bezitten, blijken ze door hun complexe metamorfose extra gevoelig te zijn voor stoffen met een schildklierhormoonverstorende werking. Hierin kan enerzijds de verklaring liggen voor de achteruitgang van amfibieënpopulaties. Anderzijds kan van deze specifieke gevoeligheid gebruik gemaakt worden om de aanwezigheid van dit soort stoffen in watersystemen op te sporen. Dit kan naast het testen met levende amfibieën nu ook met een nieuw ontwikkelde snelle en specifieke in vitro test.

Van de wereldwijde achteruitgang van amfibieënpopulaties zijn de precieze oorzaken nog niet bekend. Hoewel in de Verenigde Staten duidelijke afwijkingen bij individuen zijn gezien, is dit in Nederland tot nu toe nog nauwelijks het geval. Slechts op enkele locaties zijn kikkervissen met afwijkingen gesignaleerd, zoals recentelijk in Hoogeveen. Doordat niet meer van dit soort zichtbare effecten gevonden is, bestaat het vermoeden dat de achteruitgang wordt veroorzaakt door sluipende effecten van milieuverontreinigingen. Vooral stoffen die hormoonssystemen verstoren, de zogenaamde 'Endocrine Disruptors', worden verdacht. De OECD (Organisation of Economic Cooperation and Development) en Amerikaanse EDSTAC (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee) hebben daarom inmiddels hoge prioriteit gegeven aan het testen van stoffen op potentiële hormoonverstoringen bij amfibieën.

Tot nu toe zijn vooral de aanwezigheid en effecten onderzocht van stoffen die geslachts-hormoonssystemen verstoren. In Nederland blijken deze in het aquatisch milieu aanwezig te zijn in concentraties waarbij effecten gevonden kunnen worden⁴⁾. Nog weinig aandacht

wordt echter besteed aan de aanwezigheid van stoffen die het schildklierhormoonstelsel kunnen verstoren. Schildklierhormoon reguleert de groei en ontwikkeling van alle gewervelden en voor amfibieën heeft het een zeer specifieke functie. Bij hen is de metamorfose geheel schildklierhormoon afhankelijk. Verstoring van dit systeem door toxische stoffen kan dus grote gevolgen hebben voor de ontwikkeling van deze dieren.

Ontwikkelingsstoornissen

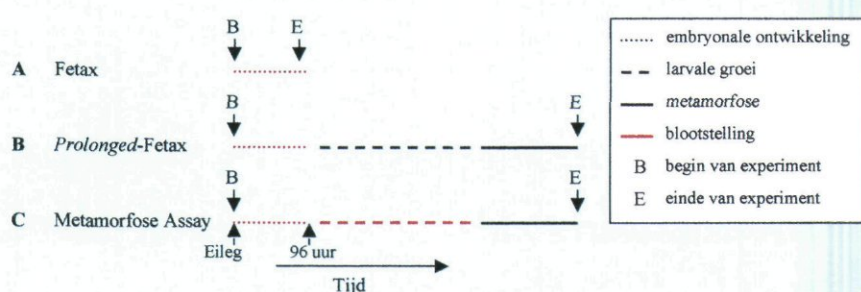
Van vrijwel alle soorten amfibieën speelt

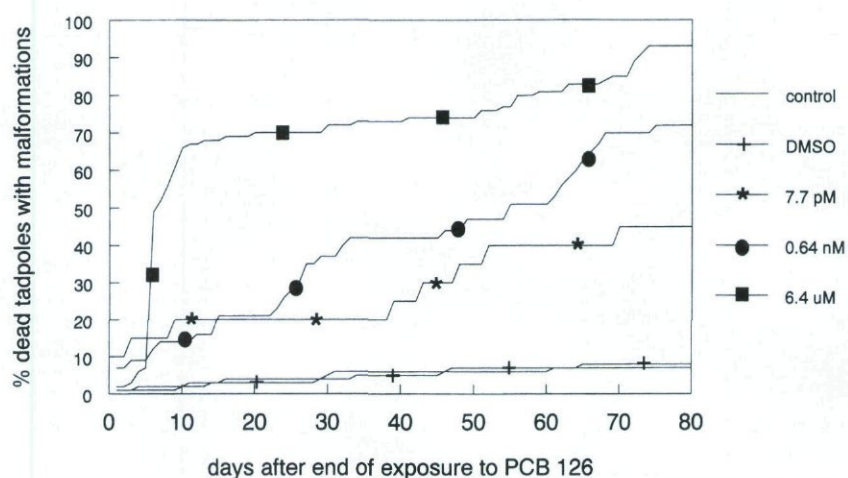
zich een groot deel van de ontwikkeling zich af in het water. Na het embryonale stadium ontwikkelen de dieren zich tot een herbivore kikkervis, aangepast aan het aquatische leven. Via de metamorfose veranderen de dieren daarna in een terrestrische carnivoor. Hierna groeit het dier verder uit tot een volwassen individu. De gehele ontwikkeling staat onder invloed van een stijgende concentratie schildklierhormoon, maar specifiek is dat op een gegeven moment een enorme schildklierhormoonpiek de metamorfose induceert. Het schildklierhormoon zorgt vervolgens voor een goede coördinatie van dit complexe ontwikkelingsproces, zodat bijvoorbeeld eerst poten aanwezig zijn voordat de staart verdwijnt. Verstoring van deze fijne regulering kan leiden tot grote nadelige effecten voor het dier. Bij afwezigheid van de schildklierhormoonpiek vindt geen metamorfose plaats en groeit de larve door zonder in een volwassen dier te veranderen. Verlaging van de piek kan tot subtielere effecten leiden zoals een vertraagde ontwikkeling. Uiteindelijk kan dan wel een goed ontwikkeld organisme ontstaan, maar de vertraging kan in het veld tot grote gevolgen leiden. Tijdens de metamorfose eet een larve niet en is deze traag en dus kwetsbaar voor predatie. Ook kan het zijn dat na een latere voltooiing van de metamorfose het voedselaanbod veranderd is en niet meer geschikt voor kleine kikkers of salamanders. Verlenging van de ontwikkelingsperiode kan daarom zeer nadelig zijn voor de populatie, zonder dat er afwijkingen aan individuen te zien zijn.

In vivo testen

In het laboratorium van de leerstoelgroep Toxicologie van de Wageningen Universiteit zijn door blootstelling aan lage concentraties van vervuilde stoffen zowel duidelijk zichtbare ontwikkelingsstoornissen als vertraging in de ontwikkeling van amfibieën aangetoond. De testen die hiervoor ontwikkeld zijn, zijn afgeleid van de standaard FETAX-test (Frog Embryonic Teratogenesis Assay - Xenopus). Deze wordt gebruikt om effecten van stoffen op de vroege ontwikkeling van amfibieën te testen. Hiervoor worden embryo's van de Zuid-Afri-

Afb. 1: Schematische weergave van de 'Fetax' (a), de 'prolonged-Fetax' (b) en de 'Metamorfose-Assay' (c).





Afb. 2: Percentage dode kikkervissen van *X. laevis* met misvormingen na 96 uur blootstelling aan PCB 126 van stadium 13 tot 46 ('prolonged-Fetax'). Afwijkingen in ontwikkeling zijn oedeemvorming, verkorting kop/staart lengte en vertraging ontwikkeling maag-darmkanaal.

kanse klauwpad (*Xenopus laevis*) na eileg gedurende 96 uur via het water blootgesteld aan een te testen stof, waarna direct de effecten op overleving en ontwikkeling bekeken worden (afbeelding 1a). Bij het uitvoeren van deze test met bekende schildklierhormoonverstoorders waren echter zelfs bij hoge concentraties geen effecten te zien. Omdat de dieren na de test een goede conditie vertoonden, werden de helft niet opgeofferd, maar in schoon water gezet. Na tien dagen bleken alsnog mortaliteit en misvormingen op te treden, zelfs bij lage geteste concentraties. Sommige effecten van de lage concentraties traden zelfs pas tijdens de metamorfose op. De standaard Fetax-assay bleek dus niet geschikt om dit soort lange termijn effecten van een stof te signaleren. Daarom zijn twee nieuwe tests ontwikkeld: de 'prolonged-Fetax' en de 'Metamorfose Assay' (afbeeldingen 1b en 1c). In de 'prolonged-Fetax' worden de larven na de periode van blootstelling geobserveerd tot het eind van de metamorfose. Deze test is geschikt om blootstelling via de waterfase of via het moederdier te onderzoeken. Om blootstelling via het voedsel na te bootsen, is de 'Metamorfose Assay' ontwikkeld. Hierin worden de larven vanaf het begin van de ontwikkeling tot de metamorfose via het voer blootgesteld aan de te testen stof. Eindpunten in deze testen zijn misvormingen, lichaamsgewicht en lengte en de periode tot volledige metamorfose. De testen zijn zowel met de Zuid-Afrikaanse klauwpad als met de Europese kikker (*Rana temporaria*) uitgevoerd.

De testen zijn uitgevoerd met een PCB-mengsel, als model voor persistente gehalogeneerde koolwaterstoffen. Het bleek dat de PCB's in doseringen vergelijkbaar met die in het veld, misvormingen bij de larven veroorzaakten (afbeelding 2¹⁾. Uit een ander experiment bleek dat zelfs larven van PCB gedoseerde vrouwtjespadden zonder andere blootstelling

nog afwijkingen in de ontwikkeling vertoonden. Ook is vertraging van de metamorfose aangetoond bij larven die gedurende de gehele larvale periode PCB's via het voer kregen toegediend²⁾. Overigens bleken bij deze proeven dat het gebruik van latex laboratoriumhandschoenen kan leiden tot acute sterfte bij kikkervissen (zie kader).

Voor stoffen met lange termijn effecten, blijken dus de 'prolonged-Fetax' en de 'Metamorfose Assay' meer geschikt dan de standaard Fetax. Een nadeel van deze testen is echter dat ze veel tijd, geld en proefdieren kosten.

In vitro testen

Om het gebruik van *in vivo* testen met proefdieren te beperken, wordt veel aandacht besteed aan het ontwikkelen van *in vitro* cellen. Voor het screenen van stoffen of extracten op verstoring van het schildklierhormoonstelsel, is in het laboratorium een nieuwe test ontwikkeld: de T-Screen. Deze *in vitro* methode wordt uitgevoerd met een schildklierhormoongevoelige cellijn uit de rattenhypofyse. De cellen hebben schildklierhormoon nodig om te groeien en reageren op

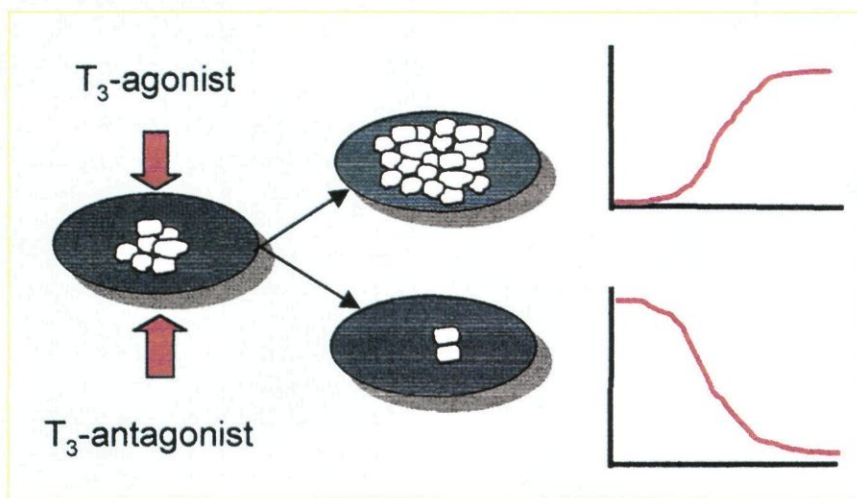
verhoging van de concentratie schildklierhormoon door sneller te gaan groeien. Stoffen met een schildklierhormoonachtige werking zullen een soortgelijke reactie geven. Stoffen die de werking van het schildklierhormoon blokkeren, zullen de celgroei remmen. Deze werking wordt opgespoord door stoffen te testen in combinatie met een vaste concentratie schildklierhormoon. De hoeveelheid celgroei kan gemeten worden via een kleurreactie (afbeelding 3). De eerste resultaten laten zien dat bepaalde pesticiden een remmende dan wel stimulerende werking hebben in de test (afbeelding 4⁵⁾. Hoewel de test geen uitslag geeft over daadwerkelijke *in vivo* effecten, biedt deze wel de mogelijkheid om snel en zonder proefdiergebruik stoffen en extracten te screenen op een schildklierhormoonwerking die relevant kan zijn voor amfibieën. Verdachte monsters kunnen dan verder *in vivo* worden getest.

Veldmonsters

Bovenstaande testen zijn niet alleen geschikt voor het onderzoeken van modelstoffen. Mengsels van stoffen, maar ook milieu-extracten van waterbodems, voedsel of zelfs weefsels kunnen getest worden. Zo zijn bijvoorbeeld sedimentextracten getest van relatief verontreinigde locaties uit het LOES-onderzoek. Deze veroorzaakten een remmende werking in de T-Screen en een vertraagde ontwikkeling na blootstelling in de 'prolonged-Fetax' en de 'Metamorfose Assay'. Bovendien waren de dieren kleiner na het voltooiën van de metamorfose⁵⁾. De meerwaarde van het testen van dit soort monsters is dat het totaal-effect van de aanwezige stoffen direct gemeten wordt, inclusief de interacties tussen de stoffen. Deze kunnen namelijk elkaars werking versterken of juist tegengaan, en dit effect kan gemist worden als alleen met de resultaten van enkelvoudige stoffen gerekend wordt. De tests kunnen zeer goed ingebouwd worden in een zogenaamde 'Tiered approach', een getrapte benadering in het onderzoeken van verstoringen in ecosystemen. Samen met chemische

Oppassen met latex

Het gebruik van beschermende materialen tijdens experimenten kan ook ongewenste bijeffecten hebben, zo bleek uit een 'prolonged-Fetax' in het laboratorium van de universiteit van Wageningen. Na het schoonmaken van de testaquaria, trad een zeer hoge mortaliteit op in alle toetsgroepen. Nadat doseringsfouten en andere mogelijke oorzaken waren uitgesloten, kon het effect alleen nog veroorzaakt zijn door de gedragen latex handschoenen. Om de toxiciteit te bepalen, is het spoelwater van de buitenkant van diverse merken handschoenen onderzocht in een Microtox assay. Latex bleek inderdaad grote toxiciteit te hebben, terwijl vinyl- en nitrilhandschoenen weinig effecten veroorzaakten. Bij vervolgstudies met larven van *X. laevis* en *R. temporaria* werd dit bevestigd³⁾. Deze handschoenen zijn dus meer geschikt voor het werken met amfibieënlarven. Inmiddels blijken ook huishoudhandschoenen goed bruikbaar te zijn. Om bijeffecten zoals bovenstaande te voorkomen, is het dus zeer zinvol om handschoenen vóór gebruik in aquatische dierproeven te testen op toxiciteit.



Afb. 3: Principe van de T-Screen assay. Celgroei wordt gestimuleerd of vertraagd door schildklierhormoonachtige stoffen of -remmers, hetgeen gemeten wordt door de kleurreactie in een zogeheten alamarBlue assay.

metingen kan de T-Screen ingezet worden om verdachte locaties te identificeren. Hierna kunnen de actieve extracten verder getest worden in de 'prolonged-Fetax' en 'Metamorfose Assay', om te kijken wat de daadwerkelijke effecten zijn in de *in vivo* situatie. Deze kunnen dan weer vergeleken worden met de veldgegevens van de verdachte locatie.

Toekomst

Om verder inzicht te verkrijgen in de mechanismen waarop vervuilende stoffen verstoringen veroorzaken in amfibieën, wordt hard verder gewerkt aan nieuwe testsystemen. Op dit moment worden testen met cellijnen uit amfibieën opgezet. Hiermee kan nog

gericht gescreend worden op een versturende werking van stoffen op amfibieën. Ook worden momenteel gedragsstudies met amfibieënlarven uitgevoerd. Verder zullen andere biomarkers voor amfibieën uit het veld ontwikkeld worden. Het doel is om met een scala aan tests de mogelijkheid te hebben om snel een indicatie te verkrijgen van de mogelijke risico's van aquatische verontreinigingen voor amfibieën. Daarnaast kunnen de testen bij een afname of verdwijnen van amfibieënpopulaties zonder duidelijke oorzaak een indicatie geven of schildklierhormoonverstoring door vervuiling een rol speelt en of herintroductie al zinvol zou kunnen zijn.

Mochten bij lezers van dit artikel meer locaties bekend zijn waar amfibieën afwijkingen vertonen, dan verzoeken de auteurs dit in het kader van verder onderzoek bij hen te melden.

LITERATUUR

- 1) Gutleb A., J. Appelman, M. Bronkhorst, J. van den Berg, A. Spenkelink, A. Brouwer en A. Murk (1999). Delayed effects of pre- and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* nr. 8, pag. 1-14.
- 2) Gutleb A., J. Appelman, M. Bronkhorst, J. van den Berg en A. Murk (2000). Effects of oral exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) on the development and metamorphosis of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *The Science of the Total Environment* nr. 262, pag. 147-157.
- 3) Gutleb A., M. Bronkhorst, J. van den Berg en A. Murk (2001). Latex laboratory gloves: an unexpected pitfall in amphibian toxicity assays with tadpoles. *Environmental Toxicology and Pharmacology* nr. 10, pag. 119-121.
- 4) Landelijk Onderzoek oEstrogene Stoffen (2002). Estrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment of the Netherlands. RIZA/RIKZ rapport nr. 2002.001.
- 5) Gutleb A., I. Meerts, R. Hartl en A. Murk. T-Screen assay as a tool to identify thyroid hormone disrupting compounds. In concept voor *Toxicology in vitro*.

Afb. 4: Respons van de T-Screen met schildklierhormoon (T_3 , A), model T_3 remmer DPH (B ▼) en de pesticiden Fentinchloride (B, ●), Dieldrin (C) en DDT (D, ● = zonder T_3 , ▼ = met T_3).

