

Bisphenol A als Xeno-Östrogen bei Vorderkiemerschnecken^{*}

Oehlmann, J.¹, Schulte-Oehlmann, U.¹, Bachmann, J.¹, Duft, M.¹, Oetken, M.¹, Lutz, I.², Kloas, W.² & Ternes, T.A.³

¹ Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Abteilung Ökologie und Evolution, Siesmayerstr. 70, D-60054 Frankfurt

² Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abteilung Binnenfischerei, Müggelseedamm 310, D-12587 Berlin

³ Bundesanstalt für Gewässerkunde, Am Mainzer Tor 1, D-56068 Koblenz

Einleitung

Zahlreiche Umweltchemikalien sind in der Lage, die Hormonsysteme von Invertebraten, Wirbeltieren und Menschen zu beeinflussen und auf diese Weise Wachstum, Entwicklung, sexuelle Differenzierung und Fortpflanzung zu schädigen (Colborn et al. 1993). Die Mehrzahl der Studien zu hormonaktiven Substanzen widmet sich Verbindungen, die eine agonistische Wirkung am Östrogenrezeptor (ER) aufweisen (Shelby et al. 1996). Innerhalb dieser "Xenoöstrogene" spielt Bisphenol A (BPA, 2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)propan, CAS No. 80-05-7) aufgrund des weltweit geschätzten Produktionsvolumens von 2,5 Millionen Tonnen im Jahr 2001 und seiner breiten Anwendung in verbrauchernahen Produkten eine besondere Rolle (Staples et al. 2002). BPA kommt als Intermediat bei der Herstellung von Polycarbonaten und Epoxidharzen zum Einsatz, die als Lebensmittelverpackungen, für Plexiglas und Compactdiscs eingesetzt werden. Ein geringerer Anteil der Gesamtproduktion wird als Antioxidans in Kunststoffen und hydraulischen Flüssigkeiten, für die Herstellung des Flammschutzmittels Tetrabrombisphenol A, für Thermopapiere in Druckern und Fax-Geräten, für die Reifenherstellung sowie in Dentalfüllungen und -versiegelungen verwendet (BUA 1997; Heemken et al. 2001; Staples et al. 2002).

Aufgrund des log K_{OW} von 2,20 bis 3,82 (Staples et al. 1998; Heemken et al. 2001) und einer Wasserlöslichkeit von 300 mg/L (Staples et al. 1998) ist eine moderate Bioakkumulation und Adsorption der Verbindung an Sedimente zu erwarten. Die Angaben zur Abbaubarkeit in der Umwelt sind teilweise widersprüchlich. Während in Oberflächengewässern Halbwertszeiten von 2,5 bis 4 Tagen angegeben werden (Dorn et al. 1987), liegt der entsprechende Wert für Kläranlagen bei bis zu 28 Tagen (Howard 1989). BPA kann regelmäßig in Fließgewässern nachgewiesen werden, wobei Konzentrationen von bis zu 1,9 µg/L in japanischen Flüssen belegt sind (Howard 1989). In der Elbe lagen die Konzentrationen gemäß Heemken et al. (2001) zwischen 9 und 776 ng/L im Wasser und zwischen 66 und 343 µg/kg in Sedimenten. Drei Jahre später gingen die Konzentrationen im Wasser auf 4 bis 92 ng/L zurück, während die Sedimentkonzentrationen mit 10 bis 380 µg/kg praktisch unverändert blieben (Stachel et al. 2003). In fünf weiteren deutschen Flüssen wurde die Substanz mit Maximalkonzentrationen von 272 ng/L nachgewiesen (Bolz et al. 2001).

* Diese Publikation fasst die im gleichlautenden Vortrag des 3. Statusseminars "Chemikalien in der Umwelt mit Wirkung auf das endokrine System – wissenschaftliche Grundlagen der Bewertung" vorgestellten Ergebnisse vom 2. Juni 2005 zusammen. Teile der Ergebnisse sind in Duft et al. (2003b) und Oehlmann et al. (2005) veröffentlicht.

Erste Hinweise auf eine östrogene Wirkung von BPA wurden bereits vor 70 Jahren gefunden, so beispielsweise in den Fütterungsexperimenten von Dodds & Lawson (1936, 1938) mit ovariectomierten Ratten, bei denen die Testsubstanz einen uterotrophen Effekt zeigte. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass BPA bei Konzentrationen von nur 2 bis 5 µg/l *in vitro* eine östrogenartige Wirkung besitzt, wenngleich die relative östrogene Potenz im Vergleich zum 17β-Östradiol (E2) um bis zu fünf Größenordnungen geringer ist (Bolger et al. 1998). Die akute Toxizität der Substanz gegenüber aquatischen Organismen ist mit einer LC₅₀ im Bereich zwischen 1 und 20 mg/L für Wirbeltiere und Invertebraten gleichermaßen niedrig (Ike et al. 2002; Hirano et al. 2004). Östrogene Wirkungen *in vivo* wurden dagegen bei deutlich niedrigeren Konzentrationen festgestellt, so die Induktion von Ovotestes beim Medaka (*Oryzias latipes*) bei Konzentrationen ab 10 µg/L (Metcalf et al. 2001). In einer Multigenerationsstudie mit Dickkopfelritzen (*Pimephales promelas*), die einen nominalen Konzentrationsbereich von 1 bis 1280 µg/L abdeckte, beschrieben Sohoni et al. (2001) Beeinträchtigungen der Reproduktion ab 640 µg/L. Kloas et al. (1999) ermittelten einen signifikant erhöhten Anteil weiblicher Phänotypen beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* nach einer Exposition von Kaulquappen gegenüber Konzentrationen ab 23 µg BPA/L. Im Unterschied zu diesen Studien, die erst oberhalb von 10 µg/L östrogene Wirkungen nachweisen konnten, zeigten Kwak et al. (2001) bereits bei deutlich niedrigeren, umweltrelevanten Konzentrationen eine negative Beeinflussung der geschlechtlichen Differenzierung beim Schwertträger (*Xiphophorus helleri*): Die Entwicklung des Schwerts in der Schwanzflosse als sekundäres männliches Geschlechtsmerkmal wurde bei männlichen Fischen im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 und 20 µg/L signifikant gehemmt.

Nur wenige Studien untersuchten bisher die östrogene Wirkung von BPA auf aquatische Invertebraten. So beschrieben Oehlmann et al. (2000), dass die Exposition einer getrenntgeschlechtlichen Vorderkiemerschnecke, der Apfelschnecke *Marisa cornuarietis*, bereits bei Nominalkonzentrationen von 1 µg BPA/L ein Superfeminisierungssyndrom induziert. Diese "Superweibchen" sind durch zusätzliche weibliche Geschlechtsorgane, eine Vergrößerung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen im Genitaltrakt, Missbildungen des pallialen Eileiterabschnitts mit einer daraus resultierenden erhöhten Mortalität und eine massive Stimulation der Ei- und Gelegeproduktion charakterisiert. Die Ergebnisse der Studie wurden in Frage gestellt, auch wegen experimenteller Mängel, wie der fehlenden analytischen Überprüfung der Nominalkonzentrationen, dem Fehlen von Replikaten und einer Positivkontrolle. Staples et al. (2002) werteten die Studie als "nicht valide", und ihre Resultate wurden für die derzeit auf EU-Ebene laufende Umweltrisikobewertung für BPA nicht berücksichtigt. Die für die BPA-Risikobewertung in Europa zuständige Behörde, die Environment Agency in London, forderte jedoch von der Kunststoffindustrie eine Wiederholung der Studie von Oehlmann et al. (2000). Das Design der geplanten Industriestudie wird allerdings, wie die Diskussionen innerhalb einer von der Environment Agency einberufenen Expertengruppe ergaben, in zahlreichen Punkten von der Originalstudie abweichen (z.B. Expositionsbedingungen, Testtemperatur und Herkunft der Testorganismen). Diese Unterschiede können, wie die Erfahrungen mit anderen Testsystemen und BPA gezeigt haben, stark divergierende Ergebnisse verursachen. Bereits bei den Wiederholungen der Originalstudie von Kloas et al. (1999) zu BPA-Effekten in *X. laevis* durch Pickford et al. (2003) und Levy et al. (2004) ergab sich, dass die Resultate der Experimente von den Expositionsbedingungen abhängen.

Es war daher das Ziel unserer eigenen, zusätzlich durchgeführten BPA-Expositionen mit *M. cornuarietis*, die Schwächen der ersten Studie bei der Wiederholung abzustellen und folgende zusätzliche Aspekte zu untersuchen: (1) Ermittlung der NOEC (no observed effect concentration) bzw. der EC₁₀ für die Auslösung von Superweibchen, (2) Überprüfung einer möglichen Abhängigkeit der Studienergebnisse von der Phase des Reproduktionszyklus, in dem sich die Tiere während der Exposition befinden, (3) Untersuchung einer möglichen Temperaturabhängigkeit der BPA-Effekte, (4) Überprüfung, ob BPA Superweibchen über den ER vermittelt induziert werden und (5) Identifizierung der Ursachen für die außerordentlich hohe BPA-Empfindlichkeit von *M. cornuarietis* im Vergleich zu anderen aquatischen Organismen. (6) Zusätzlich wurden mit einer in Europa verbreiteten Art, der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum*, BPA-Experimente mit einer Exposition über das Wasser bzw. das Sediment durchgeführt, um zu untersuchen, ob vergleichbare Effekte wie bei *Marisa* auftreten.

Material und Methoden

Für die Bisphenol A-Versuche wurden die in Mitteleuropa weit verbreitete Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* (Prosobranchia: Hydrobiidae) und die ursprünglich aus dem nördlichen Südamerika stammende Apfelschnecke *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia: Ampullariidae) eingesetzt.

Versuchsorganismen und Expositionsserien

Die Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* wurde vor etwa 150 Jahren mit dem Ballastwasser von Schiffen aus Neuseeland nach Europa eingeführt. Im Gegensatz zum ursprünglichen Verbreitungsgebiet bestehen die europäischen Populationen der Zwergdeckelschnecken fast ausschließlich aus Weibchen (Wallace 1979; Ponder 1988), die sich parthenogenetisch und ovovivipar fortpflanzen. *Potamopyrgus* erreicht eine Schalenhöhe von maximal 6 mm.

Für die Experimente wurden ausschließlich Exemplare mit einer minimalen Schalenhöhe von 3,6 mm aus unserer seit Jahren etablierten Laborzucht verwendet, die ursprünglich mit Zwergdeckelschnecken aus dem Gievenbach nahe Ibbenbüren (Nordrhein-Westfalen) aufgebaut wurde. Neben der Testsubstanz Bisphenol A (Merck Schuchardt, Hohenbrunn) wurde für die Tests auch 17 α -Ethinylöstradiol (EE2: Fluka, Buchs) als Positivkontrolle (PC) berücksichtigt.

Die **aquatische Expositionsserie mit *P. antipodarum*** wurde als semistatisches System mit einer Erneuerung des Wassers nach 24 h (an Wochenenden 48 h) in voll rekonstituiertem Wasser bei Nominalkonzentrationen von 1, 5, 25 und 100 μ g BPA/L über einen Zeitraum von neun Wochen durchgeführt; zusätzlich wurde eine Lösemittelkontrolle (SC: Ethanol; Konzentration: 12,5 μ g/L) sowie EE2 als PC bei Nominalkonzentrationen von 1, 5, 25 und 100 ng/L eingesetzt. Als Testgefäße dienten 1 L-Erlenmeierkolben ohne Filteranlage, in die jeweils 100 Versuchstiere gegeben wurden. Eine Belüftung der Testansätze erfolgte über Glaspipetten. Die Stichprobengröße betrug 20 Individuen pro Versuchsgruppe. Es wurde eine Stichprobe einmalig am Anfang des Experiments und danach aus jeder Versuchsgruppe im Abstand von 3 Wochen untersucht. Der Versuch fand unter Konstantbedingungen in einem klimatisiertem Raum bei einer Temperatur von 14 \pm 1°C und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12:12 h statt.

Die **Sedimentexpositionsserie mit *P. antipodarum*** wurde gemäß den Angaben von Duft et al. (2003a, b) als statisches System ohne Erneuerung des Wassers in 1 L-Erlenmeierkolben ohne Filteranlage durchgeführt. Das Kunstsediment bestand aus 95% Quarzsand (Quarzwerke Millisil, Frechen) und 5% getrockneten Buchenblätter, die im Nationalpark Rügen gesammelt und mit einer Kaffeemühle MC 23 (Siemens) fein vermahlen wurden. Der organische Kohlenstoffgehalt des Sediments betrug 2,3%, die mittlere Korngröße 180 µm. Jeder Erlenmeierkolben wurde mit 50 g Kunstsediment (Trockengewicht) befüllt. Die Testsubstanz wurde in 2 mL 100% Ethanol gelöst dem Sediment zugesetzt und dieses durch Rühren homogenisiert. Das Lösemittel wurde über 24 h abgedampft und anschließend das Sediment vorsichtig mit 1 L voll rekonstituiertem Wasser überschichtet. Eine Belüftung der Testansätze erfolgte über Glaspipetten. Nach einer Equilibrierungsphase von fünf Tagen wurden in jedes Testgefäß 80 *P. antipodarum* eingesetzt. Die Experimente wurde bei Nominalkonzentrationen von 1, 10, 30, 100 und 300 µg BPA/kg (Trockengewicht) über einen Zeitraum von acht Wochen durchgeführt; zusätzlich wurde eine Lösemittelkontrolle (SC: Ethanol) und EE2 als PC bei einer Nominalkonzentration von 30 µg/kg eingesetzt. Die Stichprobengröße betrug 20 Individuen pro Versuchsgruppe. Es wurde eine Stichprobe einmalig am Anfang des Experiments und danach aus jeder Versuchsgruppe nach 2, 4 und 8 Wochen untersucht. Der Versuch fand unter Konstantbedingungen in einem klimatisiertem Raum bei einer Temperatur von 15±1°C und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 16:8 h statt.

Vor der Untersuchung wurden die Zwergdeckelschnecken für 2 h in MgCl₂ (2,5% in entmineralisiertem Wasser) narkotisiert. Die Schalen- und Mündungshöhe wurde mit einem Messokular bestimmt, die Schale mit einem kleinen Schraubstock aufgebrochen und der Weichkörper entfernt. Die Bruttasche wurde eröffnet und die Zahl der älteren Embryonen, die bereits eine Schale entwickelt hatten, der jüngeren, noch schalenlosen Embryonen und die Gesamtzahl für jedes individuelle Weibchen bestimmt. Zusätzlich wurde das Auftreten von Eiern im Eileiter und die Reife des Ovars bei jeder Schnecke überprüft.

Die für die Versuche eingesetzten Apfelschnecken kamen aus unserer laboreigenen Zucht. Der Zuchtstamm wurde ursprünglich im Jahre 1991 vom Aquazoo Düsseldorf bezogen, doch wurden seitdem regelmäßig Wildfänge aus Florida eingekreuzt, um Inzucht zu vermeiden. Die beiden Expositionsexperimente wurde als semistatische Systeme mit einer Erneuerung des Wassers nach 24 h (an Wochenenden 48 h) in 60 L-Glasaquarien durchgeführt, die über einen Eheim-Außenfilter und eine Belüftung über Glaspipetten verfügten. Beide Testserien wurden unter Konstantbedingungen in klimatisierten Versuchsräumen bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h durchgeführt.

Für die **Expositionsserie I mit *M. cornuarietis*** wurden fünf Nominalkonzentrationen von BPA (Merck Schuchardt, Hohenbrunn: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 und 1 µg/L), eine Lösemittelkontrolle (SC: Ethanol; Konzentration: 12,5 µg/L) sowie EE2 als PC bei einer Nominalkonzentration von 10 ng/L eingesetzt. Gruppen von 210 geschlechtsreifen Apfelschnecken mit einer Schalenhöhe von mindestens 20 mm wurde in den Aquarien über Aktivkohle-gefiltertes Leitungswasser bei 22±1°C über einen Zeitraum von 6 Monaten (September bis März) exponiert, der auch die Hauptlaichperiode der Tiere in unserem Labor umfasste. 30 Tiere aus der Zucht wurde zu Beginn des Experiments und danach aus jeder Gruppe in monatlichen Abständen untersucht.

Für die **Expositionsserie II mit *M. cornuarietis*** wurden zwei Replikate mit jeweils 30 geschlechtsreifen Apfelschnecken mit einer Schalenhöhe von mindestens 20 mm gegenüber nominalen BPA-Konzentrationen (Merck Schuchardt, Hohenbrunn) von 0,25; 0,5; 1 und 5 µg BPA/L allein sowie in Kombination mit einem von zwei potenten Antiöstrogenen (3 µg ICI 182,780/L (Faslodex®, Tocris, Ellisville, USA) bzw. 10 µg Tamoxifen/L (Sigma, Deisenhofen)) über 5 Monate (Februar bis Juli) in voll rekonstituiertem Wasser bei $20\pm 1^\circ\text{C}$ exponiert. Parallel wurde identische Versuchsgruppen unter ansonsten gleichen Bedingungen, jedoch bei $27\pm 1^\circ\text{C}$ gegenüber den Testsubstanzen exponiert. 30 Tiere aus der Zucht wurde zu Beginn und alle überlebenden Apfelschnecken am Ende des Experiments untersucht.

Die Mortalität, Gelege- und Eizahl sowie Gelegegröße (Eizahl pro Gelege) wurden täglich erfasst. Die Fekunditätsparameter wurden bezüglich der Weibchenzahl in den Expositionsgefäßen normalisiert, wobei die Zahl der verendeten Tiere bei einem angenommenen Geschlechtsverhältnis von 1:1 berücksichtigt wurde. Alle Versuchstiere wurden vor der Untersuchung für 1,5 h narkotisiert (2,5% MgCl_2 -Lösung in entmineralisiertem Wasser). Die individuelle Schalen- und Mündungshöhe wurde auf 0,1 mm genau bestimmt und der Weichkörper anschließend aus der Schale entnommen. Das äußere Erscheinungsbild aller Geschlechtsorgane wurde überprüft und ihre Ausdehnung auf 0,1 mm genau vermessen. Das Auftreten von Oozyten und Spermien in den ableitenden Geschlechtswegen wurden ebenso wie Missbildungen, sichtbare Gewebswucherungen an den Genitalien und anderen Organen im Bereich der Mantelhöhle unter dem Stereomikroskop erfasst und protokolliert. Zusätzlich wurde der VDSI (Vas deferens Sequenz-Index = arithmetischer Mittelwert aller Impossexstadien in einer Stichprobe von 30 Tieren mit Werten zwischen 0 und 3) als Maß der Impossexintensität in einer Versuchsgruppe berechnet (Schulte-Oehlmann et al. 1995).

Begleitanalytik auf BPA

Wasserproben (2 L Volumen) wurden über einen Zyklus von 24 h während des 1., 3. und 5. Monats der Expositionsserie II und während des 1. Monats der Expositionsserie II mit *M. cornuarietis* genommen. Der Zyklus begann jeweils 15 Minuten vor dem Austausch der Expositionsmedien und endete 1 Tag später, bevor die Medien erneut ausgetauscht wurden ($n = 8$ pro Zyklus). Für die Festphasenextraktion wurden 500 mg RP-C18 Sorbenz (Separatis, Grenzah-Wyhlen) in Glaskartuschen gefüllt und mit 1×2 mL Hexan, gefolgt von 1×2 mL Aceton und 3×2 mL Methanol konditioniert. Die Kartuschen wurden mit 5×2 mL Wasser (pH 7) gespült. Danach wurden 0,5 L der auf pH 7 eingestellten und zuvor über einen Glasfaserfilter ($< 1 \mu\text{m}$) gefilterten und mit Bisphenol F als Ersatzstandard gespikten Wasserprobe über die Kartusche gegeben (Flussrate 20 mL/min). Abschließend wurde die Festphase mit einem Stickstoffstrom für 1 h getrocknet und der Analyt viermal mit je 1 mL Aceton extrahiert. Die vereinigten Acetonextrakte wurden unter einem Stickstoffstrom auf 200 µL eingengt.

Für die GC/MS-Analytik wurde den Extrakte 50 µL einer Derivatisierungsmischung (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MSTFA) / Trimethylsilylimidazole (TMSI) / Dithioerytrol (DTE), 1000+2+2; v/v/w) zugesetzt. MSTFA und TMSI wurden durch Sigma (Deisenhofen), DTE von Merck (Darmstadt) bezogen. Nach einer einstündigen Reaktion bei 60°C wurde die Lösung unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und in 200 µL Hexan aufgenommen. Schließlich wurden 100 µg Mirex (Promochem, Wesel) zum Extrakt als interner Standard zugesetzt. Für die Quantifizierung über die GC/MS wurden $m/z =$

357 und 372 im SIM-Modus verwendet. Eine Zehnpunkteichung wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 5 µg BPA/L mit gespiktem Grundwasser durchgeführt. Während jeder Analysenserie wurde eine Grundwasser als Nullprobe parallel untersucht.

Das GC/MS-System bestand aus einer GC HP 5890 Series II, gekoppelt mit einem HP 5971-Massendetektor. Eine Restek XTI-5 Kapillarsäule wurde bei einem Kopfdruck von 85 kPa mit einem 3 µl-Splitlessinjector verwendet (250°C Isotherme). Als Temperaturprogramm wurde eine 50°C Isotherme für 1,5 min, 20°C/min bis 240°C, 1,5°C/min bis 290°C und eine 290°C Isotherme für 10 min gewählt.

Rezeptorbindungsstudien

Cytosolische Extrakte der Hoden oder Ovarien von bis zu 10 Apfelschnecken wurden hergestellt, indem die Keimdrüsen in 9 mL eiskaltem Inkubationspuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 250 mM Sucrose, 10 mM Natriummolybdat, 5 mM Dithiothreitol) homogenisiert wurden. Die Homogenate wurden 12 min bei 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand ein zweites Mal für 60 min bei 100.000 x g und 4°C. Der resultierende Überstand wurde als cytosolischer Extrakt für die Rezeptorbindungsstudien eingesetzt. In Zeitreihen wurden die optimalen Bedingungen für die spezifische Bindung von [³H]-Östradiol und [³H]-Testosteron (T) mit 18 h für E2 und 16 h für T bis zur Einstellung eines Fließgleichgewichts ermittelt. Die radioaktiv markierten Liganden ([³H]-E2, spezifische Aktivität 41,8 µCi/mmol, Perkin Elmer, Rodgau-Jugesheim und [³H]-T, 95 µCi/mmol, Amersham Biotech, Freiburg) wurden in 5% Ethanol gelöst. Alle Inkubationen wurden mit 2 Replikaten unter Einsatz von 25 µL [³H]-E2 (Endkonzentration 24 nM) oder [³H]-T (Endkonzentration 22 nM), 10 µL unmarkierter Ligand oder Lösemittel, 150 µL Inkubationspuffer und 100 µL der cytosolischen Fraktion von jeweils drei unabhängigen Hoden- bzw. Ovarienhomogenaten durchgeführt. Die unmarkierten Liganden E2, Tamoxifen (Tam), BPA, T und Methyltestosteron (MT) wurden in 99,8% Ethanol gelöst und mit Endkonzentrationen zwischen 10⁻⁹ M und 10⁻³ M zugegeben. Die Trennung der rezeptorgebundenen und freien Liganden erfolgte durch den Zusatz von 300 µL Dextran-behandelter Aktivkohle zu jeder Probe. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde die Probe für 15 min bei 3500 x g und 4°C zentrifugiert. Die freien Liganden adsorbierten an der Aktivkohle und sedimentierten mit ihr. Der Anteil des gebundenen [³H]-E2 bzw. [³H]-T wurden durch die Bestimmung der Radioaktivität von 400 µL des Überstands in 3 mL Scintillationscocktail (Ultima Gold TM, Packard BioScience, Groningen, Holland) in einem Scintillationszähler (Tri Carb 1600, Canberra-Packard, Rodgau-Jugesheim) ermittelt.

Statistische Analysen

Für die statistischen Auswertungen wurden die Computerprogramme StatEasy (Wissenschaftliche Auswertungen, Hamburg) und Prism, Version 4.02 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet. Als minimales Signifikanzniveau galt für alle Tests 5% im Vergleich zur SC (p < 0,05). Die BPA-Halbwertszeit in den Expositionsaquarien wurde unter Verwendung eines einphasigen exponentiellen Zerfallmodells, die IC₅₀-Werte mittels einer homologen kompetitiven Bindungskurve für eine Klasse von Bindungsstellen und EC₁₀- sowie EC₅₀-Werte über eine Weibull-Verteilung mit Hilfe von GraphPad Prism 4.02 (San Diego, USA) berechnet.

Ergebnisse

BPA-Analytik

Aufgrund des erforderlichen Probenvolumens konnte eine analytische Überprüfung der Nominalkonzentrationen nur für die beiden Expositionsserien mit *Marisa cornuarietis* durchgeführt werden. In den Tabellen 1 und 2 sind die gemessenen BPA-Konzentrationen zusammengefasst.

Tab. 1. Vergleich der nominalen und gemessenen BPA-Konzentrationen in der Expositionsserie I mit *Marisa cornuarietis* bei 22°C (in ng/L). Die berechnete Wiederfindung basiert auf der unmittelbar nach dem Austausch der Testmedien ermittelten Konzentration.

Nominalkonzentration	0 (SC)	50	100	250	500	1000
gemessene Konzentration						
Spanne (Min. - Max.)	0 – 40	0 – 40	0 – 180	0 – 360	0 – 590	0 – 1200
Mittelwert ± SD	9,2 ± 16	7,9 ± 16	48,3 ± 51	104 ± 120	205 ± 223	404 ± 429
BPA-Halbwertzeit (h)	—	1,06	3,03	3,76	6,35	5,89
Wiederfindung (%)	—	80	130	121	111	110

Die Anfangskonzentrationen 15 Minuten nach dem Wechsel der Expositionsmedien lagen zwischen 80% und 130% der Nominalkonzentrationen in der Expositionsserie I und zwischen 96% und 110% in der Expositionsserie II. Wahrscheinlich aufgrund einer Adsorption der Testsubstanz an Glasoberflächen, Versuchstieren und Futter sowie eines Abbaus des BPA betrug die Medianwerte der gemessenen Konzentrationen nur etwa 39,0% bis 48,3% der Nominalkonzentrationen, mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration in der Serie I, in der nur 15,8% erreicht wurden. Die berechnete BPA-Halbwertzeit lag zwischen 2,53 und 6,35 h, wiederum mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration in der Serie I (1,06 h). Der Vergleich der beiden Testtemperaturen in der Expositionsserie II zeigt, dass das Verhältnis zwischen den gemessenen und den Nominalkonzentrationen nur geringe Abweichungen zeigt, obwohl bei der höheren Temperatur die analytisch bestimmten Konzentrationen geringfügig niedriger und die Halbwertzeit kürzer als bei 22°C waren (Tab. 2). Einzelne positive Nachweise von BPA in den Kontrollgruppen sind wahrscheinlich eine Folge der Freisetzung von BPA aus den vor allem in den Eheim-Außenfiltern und Schläuchen eingesetzten Kunststoffen. EC₁₀-, EC₅₀-, NOEC- und LOEC-Werte wurden grundsätzlich für alle bei *M. cornuarietis* erhobenen Endpunkte auf Basis der Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in den Aquarien berechnet.

Tab. 2. Vergleich der nominalen und gemessenen BPA-Konzentrationen in der Expositionsserie II mit *Marisa cornuarietis* bei 20°C und 27°C (in ng/L). Die berechnete Wiederfindung basiert auf der unmittelbar nach dem Austausch der Testmedien ermittelten Konzentration.

Nominalkonzentration	0 (SC)	250	500	1000	5000
gemessene Konzentration (20°C)					
Spanne (Min. - Max.)	0 – 30	0 – 270	0 – 510	0 – 1100	80 – 4900
Mittelwert ± SD	3,8 ± 11	106 ± 113	224 ± 217	465 ± 460	2170 ± 1980
BPA-Halbwertszeit (h)	—	3,04	3,90	3,67	3,75
Wiederfindung (%)	—	108	102	110	98
gemessene Konzentration (27°C)					
Spanne (Min. - Max.)	0 – 30	0 – 260	0 – 520	0 – 1100	40 – 4800
Mittelwert ± SD	3,8 ± 11	97,5 ± 109	205 ± 204	436 ± 438	1990 ± 1930
BPA-Halbwertszeit (h)	—	2,53	3,04	3,08	3,25
Wiederfindung (%)	—	104	104	110	96

BPA-Versuchsserien mit *Potamopyrgus antipodarum*

Die Exposition der Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* gegenüber BPA führte, unabhängig vom gewählten Pfad, zu einer massiven Stimulation der Embryoproduktion. Damit konnte auch für diese Art das von Oehlmann et al. (2000) erstmals am Beispiel von *Marisa cornuarietis* beschriebene Superweibchen-Syndrom mit der charakteristischen Erhöhung der Reproduktionsleistung während der sexuellen Ruhephase bestätigt werden.

Die **aquatische Expositionsserie mit *P. antipodarum*** wurde im Hochsommer durchgeführt, wenn die mittlere Embryonenzahl im Brutraum der Weibchen sehr niedrig ist. Bereits 3 und 6 Wochen nach dem Beginn des Versuchs war die Embryonenzahl in allen exponierten Gruppen gegenüber der Kontrolle erhöht; diese Differenzen waren nach 3 Wochen nur für die 25 µg/L-Gruppe und nach 6 Wochen für die 5- und 25 µg/L-Gruppen statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test mit multiplem Vergleich der Proben nach Nemenyi, $p < 0,05$). Es ergab sich zu beiden Zeitpunkten eine invertiert U-förmige Konzentrations-Wirkungsbeziehung, die sich auch am Versuchsende erneut einstellte (Abb. 1A). Nach 9 Wochen war die mittlere Embryonenzahl im Brutraum der Weibchen, die der niedrigsten Nominalkonzentration von BPA ausgesetzt waren, kaum noch gegenüber der Kontrolle erhöht, bei 100 µg/L sogar leicht erniedrigt, während die Weibchen aus den beiden mittleren Konzentrationen (5 und 25 µg/L) eine um den Faktor 10 gegenüber der Kontrolle erhöhte Embryonenzahl aufwiesen. In den gegenüber EE2 als PC exponierte Versuchgruppen zeigte sich ein sehr ähnliches Bild, jedoch war das synthetische Östrogen bereits bei Konzentrationen, die um den Faktor 200 niedriger lagen, vergleichbar wirksam wie BPA. In der PC ergaben sich, ähnlich wie unter dem Einfluss von BPA, bei allen Probenahmen invertiert U-förmige Konzentrations-Wirkungsbeziehungen (Abb. 1A).

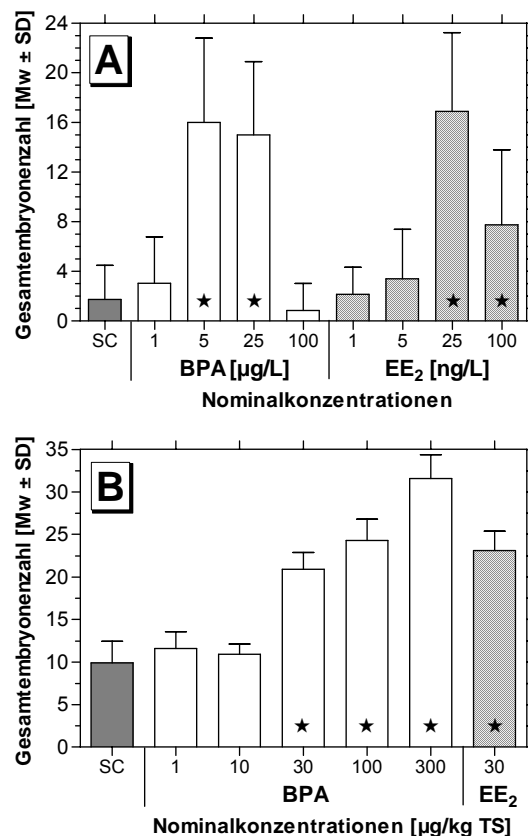


Abb. 1. *Potamopyrgus antipodarum*. Gesamtembryonenzahl nach 9-wöchiger Exposition über das Wasser (A) bzw. 4-wöchiger Exposition über das Sediment (B). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen für eine Stichprobengröße von 20 Tieren pro Versuchsgruppe in der Lösemittelkontrolle (SC), den BPA-exponierten Gruppen sowie in den Positivkontrollen mit EE₂. Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur SC (ANOVA mit multiplem Vergleich nach Dunnett, $p < 0,01$).

Auch in der **Sedimentexpositionsserie mit *P. antipodarum*** konnte eine im Versuchsverlauf zunehmende Embryonenzahl in den BPA-exponierten Versuchsgruppen festgestellt werden. Bereits nach 2 Wochen war die Zahl der jungen, noch unbeschalteten Embryonen bei 30, 100 und 300 µg BPA/kg mit einem Anstieg von bis zu 90% signifikant gegenüber der SC erhöht (ANOVA mit multiplem Vergleich nach Dunnett, $p < 0,05$ bei 30 µg/kg, $p < 0,01$ bei 100 und 300 µg/kg). Die EC₁₀-Berechnung für diesen Parameter ergab einen Wert von 0,09 µg/kg. Für die Gesamtzahl der Embryonen wurde der gleiche Trend beobachtet, während die Zahl der älteren, bereits beschalteten Embryonen nach zwei Wochen noch unbeeinflusst war (ANOVA, $p > 0,05$). Nach 4-wöchiger Exposition nahm die Zahl der noch unbeschalteten Embryonen um bis zu 170% gegenüber der SC zu, wobei erneut für die drei höchsten Testkonzentrationen signifikante Effekte beobachtet wurden (ANOVA mit multiplem Vergleich nach Dunnett, $p < 0,001$). Die EC₁₀ für diesen Parameter betrug 0,03 µg/kg, für die Gesamtzahl der Embryonen wurde nach 4 Wochen eine NOEC von 10 µg/kg und eine LOEC von 30 µg/kg ermittelt (Abb. 1B).

Am Ende des 8-wöchigen Experiments wiesen alle BPA-exponierten Gruppen eine signifikant höhere Zahl unbeschalteter Embryonen im Vergleich zur SC auf (ANOVA mit multiplem Vergleich nach Dunnett, $p < 0,001$; $p < 0,01$ bei 30 µg/kg und $p < 0,05$ bei 100 µg/kg), so dass die LOEC 1 µg/kg betrug. Die Gesamtzahl der Embryonen war bei Konzentrationen

oberhalb von 1 µg/kg signifikant gegenüber der SC erhöht, so dass die NOEC und LOEC in diesem Fall 1 bzw. 10 µg/kg war. Die EC₁₀-Berechnung für diesen Parameter ergab einen Wert von 0,22 µg BPA/kg.

In der SC konnte während des gesamten Versuchsverlaufs keine Veränderung der Embryoproduktion ermittelt werden (ANOVA, $p > 0,05$), in der PC dagegen zu allen Probenahmezeitpunkten eine gegenüber der SC signifikant erhöhte Embryozahl (ANOVA mit multiplem Vergleich nach Dunnett, $p < 0,01$). Keine der Versuchsgruppen wies eine erhöhte Mortalität auf.

Expositionsserie I mit *Marisa cornuarietis*

Während des Experiments, das die Hauptlaichphase der Apfelschnecken von November bis Januar umfasste, löste BPA in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen für adulte *M. cornuarietis* (Oehlmann et al. 2000) keinen Imposex aus (ANOVA und Weir-Test; $p > 0,2$). Dagegen wurden in allen Versuchsgruppen, mit Ausnahme der SC und der gegenüber nominal 100 ng BPA/L exponierten Gruppe, Superweibchen mit Eileitermissbildungen gefunden. Die Inzidenz dieser Missbildungen betrug 1,2% bei nominal 50 ng/L, 2,0% bei 250 ng/L, 3,1% bei 500 ng/L, 3,2% bei 1000 ng/L und 2,4% in der gegenüber nominal 10 ng EE2/L exponierten PC. Im Unterschied zu den von Oehlmann et al. (2000) durchgeführten Studien bei höheren BPA-Konzentrationen wurde jedoch in keiner der Gruppen eine signifikant erhöhte Mortalität ermittelt. Die gegenüber nominal 100, 500 und 1000 ng BPA/L exponierten Weibchen sowie die Tiere in der PC produzierten über den gesamten Versuchsverlauf signifikant mehr Eier und Gelege (Daten nicht dargestellt) als die SC (Abb. 2A; ANCOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Allerdings zeigt der sigmoide Verlauf der Eisummenkurve für die SC über die Zeit in Abbildung 2A, dass die Apfelschnecken während des Experiments unterschiedliche Phasen des Reproduktionszyklus durchliefen. Entsprechend sollten die Effekte der Testsubstanz für die einzelnen Phasen getrennt analysiert werden (Abb. 2B bis D).

Während der ersten 65 Tage des Experiments, also vor dem Einsetzen der Hauptlaichperiode, stimulierte BPA die Ei- und Gelegebildung (Daten nicht dargestellt). Die Weibchen in allen Versuchsgruppen, mit Ausnahme der gegenüber nominal 50 ng BPA/L exponierten Apfelschnecken, produzierten signifikant mehr Eier als die SC (Abb. 2B; ANCOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Wenn die gemessenen Konzentrationen der Testsubstanz zugrunde gelegt werden, ergeben sich für die Stimulation der Eiproduktion eine EC₁₀ von 13,9 ng/L und der Gelegebildung von 14,6 ng/L. Die entsprechende NOEC beträgt 7,9 ng/L und die LOEC 48,3 ng/L für beide Endpunkte.

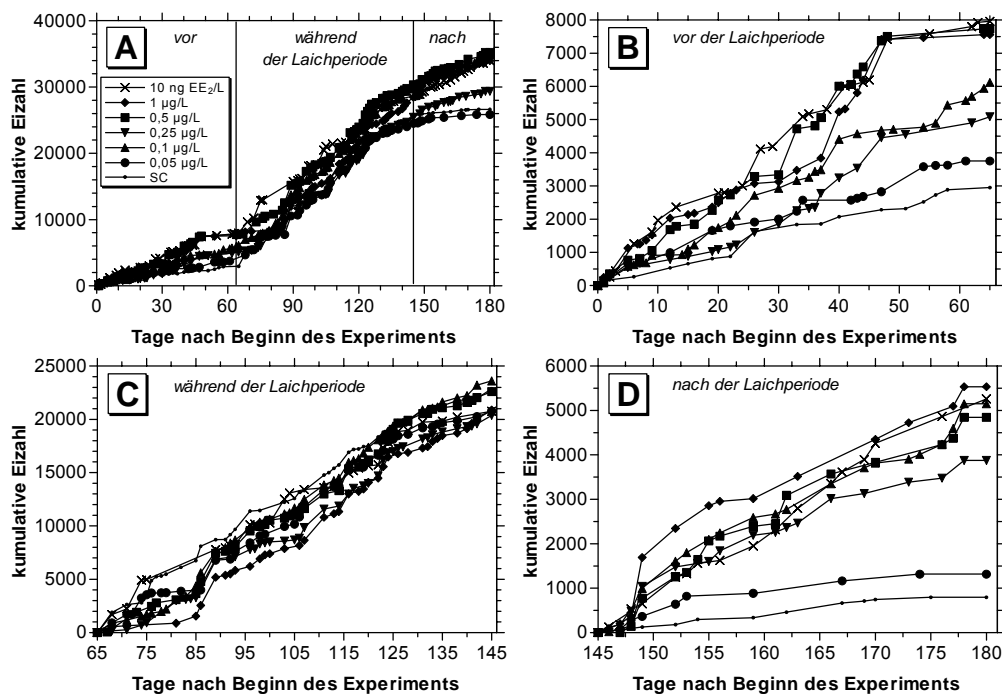


Abb. 2. *Marisa cornuarietis*, Expositionsserie I. Kumulative, bezüglich der Weibchenzahl normalisierte Eiproduktion in der Lösemittel- (SC) und Positivkontrolle (10 ng EE₂/L) sowie in den BPA-exponierten Gruppen während des gesamten Experimentverlaufs (A) und getrennt für die Phase vor Beginn (B), während (C) und nach der Hauptlaichperiode (D).

Während die Kontrollweibchen in den ersten 65 Tage des Experiments etwa 3000 Eier ablaichten, waren es in den folgenden 80 Tagen der Hauptlaichperiode mit 23000 Eiern fast achtmal mehr (Abb. 2C). Aufgrund dieser erheblichen Steigerung der Reproduktionsleistung in der SC konnte in keiner der BPA-exponierten Versuchgruppen eine weitere signifikante Stimulation der Ei- und Gelegebildung über das Niveau der Kontrolle hinaus beobachtet werden. Mit Ausnahme der 100 und 500 ng BPA/L-Gruppen produzierten in dieser Phase des Experiments alle anderen Versuchtiere signifikant weniger Eier als die Weibchen in der SC (ANCOVA mit multiplen Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Während der letzten 35 Tage des Experiments, als die Hauptlaichperiode beendet war, konnte wiederum für die PC und alle BPA-exponierten Tiere, mit Ausnahme der 50 ng/L-Gruppe, eine signifikante Stimulation der Ei- und Gelegebildung beobachtet werden (Abb. 2D; ANCOVA mit multiplen Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,01$). Dieses Resultat zeigt, dass während der Hauptlaichperiode der Apfelschnecken mögliche BPA-Effekte vollständig maskiert werden.

Expositionsserie II mit *Marisa cornuarietis*

Die Experimente dieser Expositionsserie dienten unter anderem dem Ziel, eine Temperaturabhängigkeit des Superweibchensyndroms bei *M. cornuarietis* zu untersuchen. Entsprechend wurden Tests bei identischen BPA-Konzentrationsbereichen bei zwei Temperaturen (20°C und 27°C) parallel durchgeführt. Zudem wurden die Apfelschnecken gleichzeitig gegenüber BPA und hoch wirksamen Antiöstrogenen exponiert, um zu untersuchen, ob die beobachteten Superweibchen durch eine Interaktion der Testsubstanz mit dem ER ausgelöst werden.

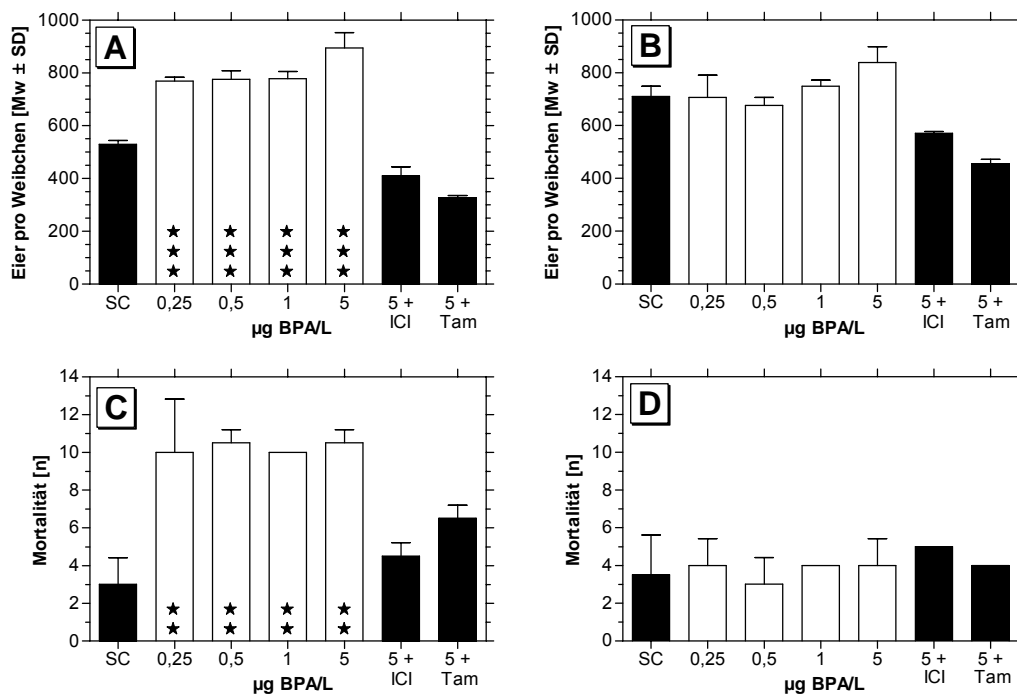


Abb. 3. *Marisa cornuarietis*, Expositionsserie II bei 20°C (A, C) und 27°C (B, D). Eiproduktion pro Weibchen (A, B) und Mortalität (C, D) während des gesamten Experimentverlaufs in der Lösemittelkontrolle (SC) sowie den gegenüber BPA allein oder in Kombination mit Faslodex (ICI) bzw. Tamoxifen (Tam) exponierten Gruppen. Angegeben sind Mittelwerte ($n = 2$) und Standardabweichungen. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede gegenüber der SC ($p < 0,01 - 0,001$; ANOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls in A, B; χ^2 -Test in C, D).

Im Verlauf des bei 20°C durchgeführten Versuchs produzierten die weiblichen *M. cornuarietis* signifikant mehr Gelege (Daten nicht dargestellt) und Eier als die Kontrolltiere (Abb. 3A; ANOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,001$). Auf Basis der gemessenen BPA-Konzentrationen ergaben sich eine EC_{10} von 14,8 ng/L für die Ei- und 18,0 ng/L für die Gelegeproduktion und damit weitgehend identische EC_{10} -Werte zur Expositionsserie I bei 22°C. Die LOEC betrug 106 ng/L für beide Endpunkte, während eine NOEC nicht bestimmt werden konnte, da bereits die niedrigste Testkonzentration signifikante Effekte zeigte. Bei 27°C produzierte keine der ausschließlich BPA-exponierten Versuchsgruppen signifikant mehr Gelege als die Kontrolltiere (Daten nicht dargestellt). Für die Eiproduktion konnte ein gegenüber der SC signifikanter Anstieg bei nominal 1 und 5 $\mu\text{g/L}$ auf Basis der Eisummenkurven ermittelt werden (ANCOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$; Daten nicht dargestellt), nicht jedoch, wenn die Eiproduktion pro Weibchen über den gesamten Versuchsverlauf aufgenommen wurde (Abb. 3B; ANOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p > 0,05$). Bei der höheren Temperatur betragen die EC_{10} -Werte 998 ng/L für die Ei- und 2,09 $\mu\text{g/L}$ für die Gelegeproduktion auf Basis analytisch ermittelter BPA-Konzentrationen in den Versuchsaquarien. Die gemessene NOEC lag bei 205 ng/L und die LOEC bei 436 ng/L für die Eibildung.

Diese temperaturabhängigen Unterschiede bezüglich der BPA-Effekte bei *M. cornuarietis* sind eine direkte Folge der erhöhten Reproduktionsleistung der Kontrollschnecken bei der höheren Testtemperatur. Mit $710 \pm 39,1$ produzierte jedes Kontrollweibchen bei 27°C signifikant mehr Eier als bei 20°C mit $529 \pm 15,3$ (t-Test, $p = 0,026$). Dagegen gab es keine

temperaturabhängigen Unterschiede in der Eiproduktion, wenn die gleichen BPA-Versuchsgruppen bei beiden Temperaturen miteinander verglichen wurden.

Im Rahmen der Versuchs wurden die Apfelschnecken simultan gegenüber 5 µg BPA/L und einem potenten Antiöstrogen, entweder Faslodex® (ICI) oder Tamoxifen (Tam) exponiert, um die Spezifität des Superweibchensyndroms untersuchen zu können. Bei beiden Temperaturen antagonisierten die Antiöstrogene den stimulierenden Effekt des BPA auf die Ei- und Gelegeproduktion nicht nur vollständig, sondern die Reproduktionsleistung sank sogar unter das Niveau der SC, wie exemplarisch in den Abbildungen 3A und B für die Eibildung gezeigt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine pharmakologische Ausschaltung des ER zu einer vollständigen Aufhebung der BPA-Wirkung bei der Apfelschnecke führt. Entsprechend ist davon auszugehen, dass das Superweibchensyndrom aufgrund einer agonistischen Wirkung des BPA am ER von *M. cornuarietis* ausgelöst wird.

Während der Expositionsserie II wurden Superweibchen mit ihren charakteristischen Eileitermissbildungen nur bei 20°C und dort ausschließlich in den rein BPA-exponierten Gruppen beobachtet. Die Inzidenz der Eileitermissbildungen betrug 4,8% bei 0,25 µg/L, 8,0% bei 0,5 µg/L, 14,8% bei 1 µg/L und 11,5% in der höchsten Konzentration. Dagegen wurden keine Eileitermissbildungen bei 20°C in der SC und in den gegenüber BPA und den Antiöstrogenen koexponierten Gruppen sowie in irgendeiner Versuchsgruppe des 27°C-Experiments gefunden. Die Mortalität stieg nur in den Gruppen signifikant über das Niveau der SC an, in denen auch Weibchen mit Eileitermissbildungen auftraten (0,25, 0,5, 1 und 5 µg BPA/L bei 20°C; Abb. 3C). Keine der Versuchsgruppen wies bei 27°C eine gegenüber dem Kontrollniveau signifikant erhöhte Mortalität auf (Abb. 3D). Ebenso wenig konnte bei einem direkten Vergleich der Mortalität für die SC sowie für die gegenüber BPA und den Antiöstrogenen koexponierten Apfelschnecken ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Temperaturen ermittelt werden. Dagegen war die Mortalität in allen ausschließlich gegenüber BPA-exponierten Gruppen bei 20°C gegenüber 27°C statistisch signifikant erhöht (χ^2 -Test, $p < 0,01$).

BPA allein löste bei keiner der beiden Temperaturen in dieser Versuchsserie Imposex bei *M. cornuarietis* aus (ANOVA und Weir-Test; $p > 0,5$), doch stiegen die Imposexintensitäten bei den Schnecken, die simultan gegenüber BPA und Faslodex exponiert wurden, bei beiden Temperaturen signifikant über das Kontrollniveau an (Weir-Test, $p < 0,05$). Unter dem Einfluss der Testsubstanz trat bei den Männchen bei 20°C, nicht jedoch bei 27°C, eine konzentrationsabhängige Reduktion der Penislänge auf (ANOVA mit multiplem Vergleich nach Student-Newman-Keuls, $p < 0,01$; Daten nicht dargestellt). Die Ausdehnung anderer männlicher und weiblicher Geschlechtsorgane wurde jedoch weder bei 20°, noch bei 27°C durch BPA beeinflusst.

Rezeptorbindungsexperimente

Eine spezifische Bindung von Tritium-markiertem Östradiol ($[^3\text{H}]\text{-E2}$) und Testosteron ($[^3\text{H}]\text{-T}$) wurde in allen cytosolischen Präparationen von *M. cornuarietis* beobachtet. Die Spezifität der $[^3\text{H}]\text{-E2}$ - und $[^3\text{H}]\text{-T}$ -Bindung war in den männlichen und weiblichen Gonaden weitgehend identisch. Die spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{-E2}$ wurde in der Reihenfolge von E2 >> Tam > BPA verdrängt, während T nur eine schwache Bindung aufwies (Abb. 4A). Die berechnete IC_{50} beträgt für E2 753 nM, für Tam 1,47 µM und für BPA 24,8. Die Verdrängung von $[^3\text{H}]\text{-T}$ aus der spezifischen Bindung erfolgte in der Reihenfolge T > MT = E2 > BPA

(Abb. 4B). Die ermittelte IC_{50} für T ist 849 nM, für MT 1,15 μ M, für E2 1,58 μ M und für BPA 62,7 μ M.

Diskussion

Die neuen Ergebnisse bestätigen weitgehend die bereits durch Oehlmann et al. (2000) erzielten Befunde und zeigen, dass BPA bereits bei gemessenen Konzentrationen von 48,3 ng/L (LOEC in der Versuchsserie I) die Reproduktion von *Marisa cornuarietis* beeinflussen kann. Die Koinzidenz des Auftretens einer erhöhten Mortalität und von Superweibchen mit Eileitermissbildungen unterstützt die frühere Vermutung, dass BPA für die erhöhte Mortalität bei Konzentrationen verantwortlich ist, die um den Faktor 4000 bis 80000 niedriger liegen als für Invertebraten ermittelte LC_{50} -Werte (Staples et al. 1998). Vergleichbare Eileitertisse wurden in der Vergangenheit bereit bei gegenüber Tributylzinnverbindungen (TBT) exponierten Vorderkiemerschnecken beobachtet, in diesem Fall jedoch aufgrund einer Oviduktblockade durch proliferierendes Samenleitergewebe. Als Folge der Eileiterveränderungen trat in den betroffenen Populationen eine erhöhte Weibchenmortalität und eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten der Männchen auf (Gibbs et al. 1987; Oehlmann et al. 1996). Für die eigenen Versuche muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle Superweibchen mit Eileitermissbildungen identifiziert wurden, da die Tiere schnell nach dem Auftreten einer derart großen Wunde verenden. Im Verlauf der eigenen Versuche wurde zwar kein Hinweis auf eine statistisch signifikante Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten der Männchen in den ausschließlich BPA-exponierten Gruppen der Versuchsserie II gefunden, doch würde dies aufgrund der geringen Stichprobengröße von nur 30 Apfelschnecken pro Gruppe auch massive Effekte voraussetzen, die so nicht zu erwarten waren.

Die Versuchsergebnisse zu *Potamopyrgus antipodarum* bestätigen ebenfalls das östrogene Potential, das von BPA für Prosobranchier ausgeht. Sie deuten ferner darauf hin, dass gerade von sedimentgebundenen BPA-Kontaminationen erhebliche Schadwirkungen auf Vorderkiemerschnecken-Populationen ausgehen können, wie die gleich um mehrere Größenordnungen unterhalb von gemessenen Umweltkonzentrationen liegende EC_{10} von 0,22 μ g BPA/kg zeigt.

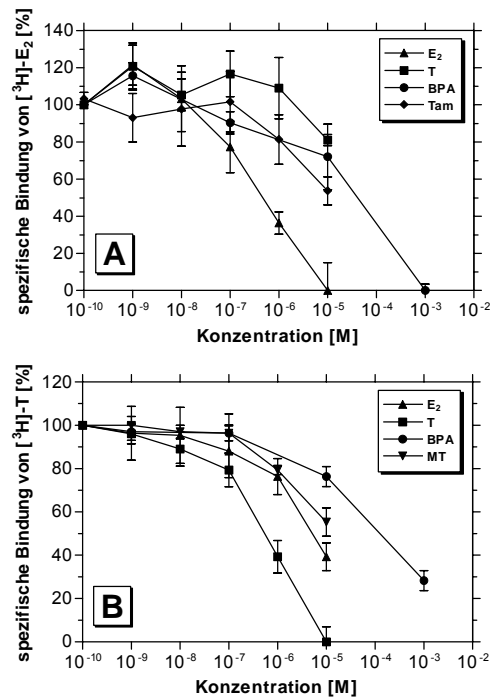


Abb. 4. *Marisa cornuarietis*, kompetitive Verdrängung der spezifischen Bindung von [³H]-E₂ (A) und [³H]-T (B) durch unterschiedliche Testsubstanzen. Angegeben sind Mittelwerte (n = 3) mit Standardfehlern. Die Kurven zeigen die Verdrängungsaktivität von Testosteron (T), Östradiol (E₂), Bisphenol A (BPA) und Tamoxifen (Tam) im Vergleich zu [³H]-E₂ und von E₂, T, BPA und Methyltestosteron (MT) im Vergleich zu [³H]-T.

Bisher wurden nur relativ wenige Studien zur hormonähnlichen Wirkung von BPA bei Invertebraten veröffentlicht. Hill et al. (2002) untersuchten Wachstum und Entwicklung bei BPA-exponierten Süßwasserschwämmen der Gattung *Heteromyenia* und ermittelten signifikant niedrigere Wachstumsraten in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,16 und 160 mg/L. Zudem traten bei Konzentrationen unter 80 mg BPA/L Missbildungen bei den Schwämmen in mehreren Replikaten auf. Tominaga et al. (2003) untersuchten die Auswirkungen von BPA auf den Nematoden *Caenorhabditis elegans* über fünf Generationen. Die Fertilität war in der vierten Generation bereits bei einer Konzentration von nur 1 und 10 nM und damit weit unterhalb der LC₅₀ von mehr als 100 µM signifikant reduziert.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Auslösung von BPA-Effekten stark von den experimentellen Bedingungen abhängt. So konnten Zou & Fingerman (1997) beim Wasserfloh *Daphnia magna* eine reduzierte Häutungsrate ermitteln, während Caspers (1998) keine Wirkungen der Testsubstanz fand. Segner et al. (2003) untersuchten mögliche BPA-Effekte auf Entwicklungs- und Fortpflanzungsparameter bei einer Reihe von Invertebraten, darunter *Hydra vulgaris*, *Gammarus pulex*, *Chironomus riparius*, *Hyalella azteca* und *Lymnaea stagnalis*, in Langzeitversuchen. Die Autoren stellten fest, dass eine Reihe von Verhaltensendpunkten bei relativ hohen, nicht mehr umweltrelevanten Konzentrationen beeinflusst wurden, so dass es unrealistisch wäre, für diese Effekte einen hormonomimetischen Mechanismus zu unterstellen. Marcial et al. (2003) analysierten die Auswirkungen von BPA beim Copepoden *Tigriopus japonicus* bei umweltrelevanten BPA-Konzentrationen und ermittelten Entwicklungsbeeinflussungen in der Parental- und Filialgeneration. Hahn et al. (2002) untersuchten eine Beeinflussung der Vitellogenese bei *Chironomus riparius*. BPA

reduzierte bei Konzentrationen zwischen 1 und 3000 µg/L den Dotterproteingehalt frisch emergierter Mücken um 20-25% gegenüber der Kontrolle. Vergleichbare Wirkungen von BPA wie in der vorliegenden Studie wurden von Andersen et al. (1999) für den Copepoden *Acartia tonsa* berichtet, bei dem Konzentrationen von 20 µg BPA/L zu einer Steigerung der Eiproduktion führten.

Obwohl endokrin wirksame Substanzen potentiell die Reproduktion wildlebender Tiere gefährden können, liegen bisher nur in einigen Fällen belastbare Beweise aus dem Freiland vor. So wurde ein Rückgang und sogar eine lokale Auslöschung von Populationen als direkte Folge endokriner Disruption bisher vor allem für Mollusken in Folge einer Kontamination ihrer Umwelt mit TBT nachgewiesen (Gibbs et al. 1987; Oehlmann et al. 1996). Vorderkiemerschnecken werden allgemein als eine der gegenüber endokrin wirksamen Substanzen empfindlichsten Tiergruppen überhaupt angesehen (DeFur et al. 1999). Speziell das Beispiel der durch TBT ausgelösten Imposentwicklung wird als eines der am besten dokumentierten Beispiele für die Beeinflussung des Hormonsystems wildlebender Tierarten durch eine Einzelchemikalie mit negativen Auswirkungen auf der Populations- und Ökosystemebene angesehen (Matthiessen & Gibbs 1998). Erst kürzlich konnten Jobling et al. (2002) mit Fischen für eine andere Gruppe vergleichbare populationsrelevante Effekte zeigen. Demnach ist der Fortpflanzungserfolg von Intersex-zeigenden Plötzen (*Rutilus rutilus*) drastisch reduziert. Gametenbildung, Spermienmotilität und Befruchtungsfähigkeit waren signifikant niedriger als bei Männchen, die keinen Intersex zeigten. Für die Vorderkiemerschnecken ist die Ähnlichkeit der Auswirkungen einer TBT- und BPA-Exposition, die sich gleichermaßen in der Auslösung von Eileiterrissen und einem daraus resultierenden Tod der Weibchen zeigt, ein deutlicher Hinweis, dass BPA ähnlich drastische ökologische Auswirkungen wie die heute weitgehend regulierte Organozinnverbindung haben dürfte. Diese Einschätzung wird nicht zuletzt durch die sehr niedrigen EC₁₀-Werte für die Auslösung von Superweibchen bei *M. cornuarietis* über das Wasser (13,9 ng/L) bzw. bei *P. antipodarum* über das Sediment (0,22 µg/kg) gestützt, die deutlich unter den in der Umwelt nachgewiesenen Konzentrationen liegen (z.B. in der Elbe bis zu 776 ng/L im Wasser und bis zu 343 µg/kg in Sedimenten gemäß Heemken et al. 2001).

Unsere Ergebnisse zeigen darüber hinaus erstmals die Existenz spezifischer Bindungsstellen für [³H]-E2 und [³H]-T, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die funktionellen Sexualsteroid-Rezeptoren bei *M. cornuarietis* repräsentieren. Die kompetitiven Verdrängungsexperimente zeigen, dass zwei unterschiedliche Bindungsstellen auftreten, spezifisch für Androgene und Östrogene. Die ER-ähnliche Bindungsstelle weist eine hohe Affinität für E2 (IC₅₀ 753 nM), aber nur eine geringe Affinität für T auf. Darüber hinaus bindet BPA eindeutig mit einer IC₅₀ von 24,8 µM an dieses Rezeptoranalogen. Die BPA/E2-Bindungsquotienten, basierend auf den IC₅₀-Werten, betragen 33 für *Marisa*, 831 für Karpfen (Kloas et al. 2000), 719 bei *Xenopus laevis* (Lutz & Kloas 1999) und 12.400 für den humanen ERα (Matthews et al. 2001), was auf erhebliche Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen der Apfelschnecke und den Wirbeltieren hinweist. Das Antiöstrogen Tamoxifen weist ebenfalls eine moderate Affinität zur ER-ähnlichen Bindungsstelle bei *M. cornuarietis* auf, die in der Größenordnung des BPA liegt. Die Androgenrezeptor- (AR-) ähnliche Bindungsstelle bindet T erwartungsgemäß am besten (IC₅₀ 849 nM), gefolgt von einer um etwa eine Größenordnung niedrigeren Affinität zu MT und E2. BPA, das bei Wirbeltieren als Antiandrogen wirkt (Lee et al. 2003), zeigt ebenfalls eine bemerkenswerte Affinität zum AR-Analogen bei *Marisa* (IC₅₀ 62,7 µM). Die Unterschiede zwischen den Bindungsquotienten von BPA und T bei der Apfelschnecke (74) und dem Menschen (4.720, Fang et al. 2003) sind geringfügig niedriger

als für den ER. Diese Ergebnisse der kompetitiven Rezeptorbindungsstudien bei *M. cornuarietis* deuten auf die Existenz eines funktionellen ER und AR hin.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse bestätigen frühere Berichte einer östrogenen Wirkung von BPA bei Vorderkiemerschnecken. Das Auftreten von Superweibchen beeinflusst die Reproduktion und führt zu einer erhöhten Mortalität. Die Effektkonzentrationen bei *Marisa cornuarietis* (NOEC 7,9 ng/L, EC₁₀ 13,9 ng/L) und *Potamopyrgus antipodarum* (NOEC 1 µg/kg, EC₁₀ 0,22 µg/kg) liegen weit unterhalb von im Wasser und in Sedimenten gemessenen BPA-Konzentrationen in aquatischen Ökosystemen in Mitteleuropa. Die Induktion von Superweibchen bei *M. cornuarietis* wird zumindest teilweise unter Expositionsbedingungen maskiert, die die Reproduktion maximieren, beispielsweise während der Hauptlaichperiode der Schnecken oder bei erhöhten Temperaturen. Die Induktion von Superweibchen erfolgt über einen funktionellen ER, da der Effekt vollständig durch eine Koexposition der Versuchstiere gegenüber BPA und hoch wirksamen Antiöstrogenen aufgehoben werden kann. Darüber hinaus scheint die außerordentlich hohe Empfindlichkeit von *M. cornuarietis* und anderen Prosobranchier gegenüber BPA durch die höhere Affinität der Substanz zum ER im Vergleich zu Wirbeltieren begründet zu sein. Letztlich zeigen die Resultate, dass BPA eine potentielle Bedrohung für das Überleben von Vorderkiemerschnecken im Freiland darstellt.

Literatur

- Andersen HR, Halling-Sørensen B, Kusk KO (1999). A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44:56-61.
- Bolger R, Wiese TE, Irvin K, Nestich S, Checovich W (1998). Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environmental Health Perspectives* 106:551-557.
- Bolz U, Hagenmaier H, Körner W (2001). Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany. *Environmental Pollution* 115:291-301.
- BUA (1997). Bisphenol A (2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)propan). Stoffbericht 203 des Beratergremiums für umweltrelevante Altstoffe (BUA). S. Hirzel, Stuttgart.
- Caspers N (1998). No estrogenic effects of bisphenol A in *Daphnia magna* STRAUS. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 61:143-148.
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM (1993). Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101:378-384.
- DeFur PL, Crane M, Ingersoll C, Tattersfield L (Hrsg.) (1999). Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing, and assessment. *Proceedings of the Workshops on Endocrine Disruption in Invertebrates*, 12-15 December 1998, Noordwijkerhout, The Netherlands. SETAC Press, Pensacola.
- Dodds EC, Lawson W (1936). Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137:996.
- Dodds EC, Lawson W (1938). Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. *Proceedings of the Royal Society London B* 125:222-232.
- Dorn PB, Chou CS, Gentempo JJ (1987). Degradation of bisphenol A in natural waters. *Chemosphere* 16:1501-1507.
- Duft M, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B, Oehlmann J (2003a). Toxicity of triphenyl- and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (1):145-152.

- Duft M, Schulte-Oehlmann U, Weltje L, Tillmann M, Oehlmann J (2003b). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology* 64:437-449.
- Fang H, Tong WD, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong HX, Xie Q, Perkins R, Owens W, Sheehan DM (2003). Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chemical Research in Toxicology* 16 (10):1338-1358.
- Gibbs PE, Bryan GW, Pascoe PL, Burt GR (1987). The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.* 67:507-523.
- Hahn T, Schenk K, Schulz R (2002). Environmental chemicals with known endocrine potential affect yolk protein content in the aquatic insect *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution* 120:525-528.
- Heemken OP, Reincke H, Stachel B, Theobald N (2001). The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere* 45:245-259.
- Hill M, Stabile C, Steffen LK, Hill A (2002). Toxic effects of endocrine disrupters on freshwater sponges: Common developmental abnormalities. *Environmental Pollution* 117:295-300.
- Hirano M, Ishibashi H, Matsumura N, Nagao Y, Watanabe N, Watanabe A, Onikura N, Kishi K, Arizono K (2004). Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. *Journal of Health Sciences* 50 (1):97-100.
- Howard PH (1989). Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. Vol. I: Large production and priority pollutants. Lewis, Boca Raton.
- Ike M, Chen MY, Jin CS, Fujita M (2002). Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of biodegradation products of bisphenol A. *Environmental Toxicology* 17:457-461.
- Jobling S, Coey S, Whitmore JG, Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Beresford N, Henshaw AC, Brighty G, Tyler CR, Sumpter JP (2002). Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biology of Reproduction* 67 (2):515-524.
- Kloas W, Lutz I, Einspanier R (1999). Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals *in vitro* and *in vivo*. *The Science of the Total Environment* 225:59-68.
- Kloas W, Schrag B, Ehnes C, Segner H (2000). Binding of xenobiotics to hepatic estrogen receptor and plasma sex steroid binding protein in the teleost fish, the carp (*Cyprinus carpio*). *General and Comparative Endocrinology* 119:287-299.
- Kwak HI, Bae MO, Lee MH, Lee YS, Lee BJ, Kang KS, Chae CH, Sung HJ, Shin JS, Kim JH, Mar WC, Sheen YY, Cho MH (2001). Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (4):787-795.
- Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K (2003). Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicological Science* 75:40-46.
- Levy G, Lutz I, Krüger A, Kloas W (2004). Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental Research* 94:102-111.
- Lutz I, Kloas W (1999). Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *The Science of the Total Environment* 225:49-57.
- Marcial HS, Hagiwara A, Snell TW (2003). Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:3025-3030.
- Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR (2001). *In vitro* and *in vivo* interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors α and β . *Chemical Research in Toxicology* 14 (2):149-157.
- Matthiessen P, Gibbs PE (1998). Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (1):37-43.
- Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, Potter T (2001). Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:297-308.
- Oehlmann J, Fioroni P, Stroben E, Markert B (1996). Tributyltin (TBT) effects on *Ocinebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): Imposex development, sterilization, sex change and population decline. *The Science of the Total Environment* 188:205-223.
- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xenoestrogens. *Ecotoxicology* 9:383-397.

- Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W, Ternes TA (2005). Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally-relevant concentrations. *Environmental Health Perspectives* (im Druck).
- Pickford DB, Hetheridge MJ, Caunter JE, Hall AT, Hutchinson TH (2003). Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere* 53:223-235.
- Ponder WF (1988). *Potamopyrgus antipodarum* – a molluscan coloniser of Europe and Australia. *Journal of Molluscan Studies* 54:271-285.
- Schulte-Oehlmann U, Bettin C, Fioroni P, Oehlmann J, Stroben E (1995). *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Prosobranchia): A potential TBT bioindicator for freshwater environments. *Ecotoxicology* 4:372-384.
- Segner H, Carroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, Schäfers C, Vandenberg GF, Watts M, Wenzel A (2003). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: Report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 (3):302-314.
- Shelby MD, Newbold RR, Tully DB, Chae K, Davis VL (1996). Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays. *Environmental Health Perspectives* 104:1296-1300.
- Sohoni P, Tyler CR, Hurd K, Caunter J, Hetheridge M, Williams T, Woods C, Evans M, Toy R, Gargas M, Sumpter JP (2001). Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science and Technology* 35 (14):2917-2925.
- Stachel B, Ehrhorn U, Heemken OP, Lepom P, Reincke H, Sawal G, Theobald N (2003). Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environmental Pollution* 124 (3):497-507.
- Staples CA, Weeks J, Hall JF, Naylor CG (1998). Evaluation of aquatic toxicity and bioaccumulation of C8- and C9-alkylphenol ethoxylates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:2470-2480.
- Staples CA, Woodburn K, Caspers N, Hall AT, Klečka GM (2002). A weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment* 8:1083-1105.
- Tominaga N, Kohra S, Iguchi T, Arizono K (2003). A multi-generation sublethal assay of phenols using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Health Sciences* 49:459-463.
- Wallace C (1979). Notes on the occurrence of males in populations of *Potamopyrgus jenkinsi*. *Journal of Molluscan Studies* 45 (1):61-67.
- Zou E, Fingerman M (1997) Synthetic estrogenic agents do not interfere with sex differentiation but do inhibit molting of the cladoceran *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58:596-602.