

Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin FIWI

Nationale Fischuntersuchungsstelle

Institut für Tierpathologie, Universität Bern, Länggass-Strasse 122, 3012 Bern

Tel. :031 631 24 65 / Fax: 031 631 26 11; e-mail: vorname.name@itpa.unibe.ch

**Ovotestis bei Rotaugen (*Rutilus rutilus*) in
schweizerischen Gewässern**

Daniel Bernet

Thomas Wahli

Bern, August 2000

Inhaltsverzeichnis

- Zusammenfassung 1
- 1. Einleitung 2
- 2. Material und Methoden..... 2
- 3. Resultate und Diskussion 4
- 4. Literatur..... 7

Zusammenfassung

Mehrere Studien im Ausland belegen eine Verweiblichung von Fischen, die in belasteten Gewässern hormonaktiven Substanzen ausgesetzt waren. Auch in der Schweiz wurden in Ausläufen von Kläranlagen östrogenaktive Substanzen nachgewiesen. Es liegen jedoch erst wenige Untersuchungen über die Effekte solcher Substanzen auf die Reproduktionsfähigkeit von unseren einheimischen Fischen vor. In der vorliegenden Studie wurden Rotaugen von 5 schweizerischen Seen und einem grossen Fließgewässer auf das Auftreten von Intersex-Fischen histologisch untersucht.

Im Rhein bei Basel (22%), im Genfersee bei Versoix (16%) und bei Ouchy (4%), sowie im Bielersee (9%) wurden bei männlichen Rotaugen Ovotestis vorgefunden. Der Grad der Intersexualität war im allgemeinen leichtgradig und charakterisiert durch einzelne bis mehrere, teilweise in Klustern vorliegende Eizellen in Hodengewebe. In allen Intersex-Hoden lagen zumindest vereinzelt reife Spermien vor. Ovotestis trat in Hoden in verschiedenen Reifestadien auf.

Neben Ovotestis wurden deutliche histopathologische Veränderungen bei Rotaugen aus dem Bielersee (1x), dem Genfersee (5x) und dem Zürichsee (1x) vorgefunden.

1. Einleitung

Zahlreiche Chemikalien und Substanzen gelangen trotz gut ausgebautem Netz von Abwasserreinigungsanlagen in unsere Gewässer. Hormonaktiven Substanzen wurde in den letzten Jahren vermehrt Bedeutung geschenkt. Östrogenaktive Substanzen sind beispielsweise Chemikalien, die in einem Organismus zu ähnlichen Effekten führen wie das weibliche Geschlechtshormon Östrogen. Solche Substanzen sind bekannt dafür, dass sie bei Fischen zu einer "Verweiblichung" führen können. Verschiedene Studien zeigen, dass solche Substanzen bei juvenilen und/oder männlichen Tieren zu einer Produktion des Dotterbestandteiles Vitellogenin führen, einem Protein, das normalerweise nur von weiblichen Fischen in nachweisbaren Mengen produziert wird (Sumpter, 1995, Harries et al., 1997). Zudem wurden bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) aufgrund solcher Substanzen ein Verlangsamung des Hodenwachstums und der Spermienreifung nachgewiesen (Jobling et al., 1996). In Grossbritannien wurde bei Rotaugen (*Rutilus rutilus*) ein hoher Anteil an Intersex-Fischen gefunden. Intersex-Fische sind Tiere, die in ihren Gonaden sowohl männliche als auch weibliche Geschlechtsprodukte ausgebildet haben. Intersex-Fische traten signifikant häufiger an Standorten unterhalb von Kläranlagen auf und das Ausmass der Veränderungen korrelierte mit der Konzentration des Abwassers (Jobling et al., 1998). Das Auftreten von Ovotestis wurde mit nachgewiesenen hormonaktiven Substanzen in Verbindung gebracht.

Heutzutage sind über 50 Stoffe bekannt, die östrogen wirksam sind. In diese Gruppe gehören beispielsweise Pestizide (z.B. Endosulfan, Dieldrin), PCB's, nichtionische Tenside aus Waschmitteln (z.B. Nonylphenol) und Plastikweichmacher (z.B. Phthalate). Auch in der Schweiz werden im Auslauf von Kläranlagen hormonaktive Substanzen nachgewiesen. In Abläufen von Kläranlagen wurden beispielsweise Konzentrationen von Nonylphenol gemessen, die in der Risikobeurteilung um ein Mehrfaches über dem heute geltenden Bereich liegen, bei dem keine Schadefekte erwartet werden (Giger et al., 1999, U. Ochsenbein, pers. Mitteilung).

In der Schweiz liegen erst wenige Studien über Auswirkungen von hormonaktiven Substanzen auf das Überleben und die Gesundheit von Fischen vor. Bei Untersuchungen an männlichen Bachforellen aus freien Gewässern konnte eine Produktion von Vitellogenin nachgewiesen werden (Burkhardt-Holm et al., 1999). Beobachtungen von Intersex-Fischen stehen bislang jedoch aus. Das Ziel dieser Studie ist daher das Auftreten von Intersex-Tieren bei Rotaugen aus fünf Schweizer Seen und einem grossen Fließgewässer abzuklären.

2. Material und Methoden

Rotaugen wurden an sechs Standorten in der Periode vor dem Ablachen mittels Netzen und Reusen gefangen (Tab.1). Die männlichen Tiere wurden gemessen und gewogen und deren Gonaden in gepuffertem 4%igem Formalin fixiert. Für eventuelle genetische Geschlechtsbestimmungen wurden von jedem Tier ca. 1cm² grosse Stücke der Bauchflosse in 96%igem Ethanol fixiert.

Tab.1: Probematerial

Gewässer	Fangart	Datum	Anzahl	Länge MW [mm]	Gewicht MW [g]
Bielersee	Netz	11./17. April 2000	34	244.6	164.9
Genfersee Ouchy	Netz	28. April / 14. Mai 2000	32	237.0	80.3
Genfersee Versoix	Angel	14. Mai 2000	33	270.1	134.6
Greifensee	Netz	18. April 2000	35	260.9	211.4
Rhein Basel	Reuse	24. Mai 2000	18	148.5	12.4
Zürichsee	Netz	18. April 2000	15	272.0	253.5
Total			165	243.6	144.5

Die Formalin-fixierten Gonaden der männlichen Tiere wurden sagittal geschnitten und in Paraffinwachs eingebettet. Bei grossen Hoden wurde eine Fläche von maximal 6 cm² eingebettet. Dabei wurden – wenn vorhanden – makroskopisch veränderte Bereiche berücksichtigt, ansonsten wurde der Schnittbereich zufällig ausgewählt. Die Paraffinblöcke wurden in 3 µm dicke Scheiben geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Die Gewebeschnitte wurden mit einem Lichtmikroskop auf das Auftreten von Ovotestis und auf histopathologische Veränderungen untersucht. Der Grad der Intersexualität wurde nach dem Bewertungsschema von (Jobling et al., 1998) festgelegt:

- 0 unveränderter Hoden; kein Intersex
- 1 vereinzelt primäre Oozyten im Hodengewebe
- 2 gelegentlich Oozyten im Hodengewebe (mit dem 10-er Objektiv werden in 3-4 zufällig ausgewählten Blickfeldern bei weniger als 2 Feldern Oozyten gefunden)
- 3 häufig primäre Oozyten im Hodengewebe; oft in Klustern (mit dem 10-er Objektiv werden in 3-4 zufällig ausgewählten Blickfeldern bei mindestens 2 Feldern Oozyten gefunden)
- 4 häufig primäre oder sekundäre Oozyten; jedoch immer noch mit Hodengewebe durchsetzt
- 5 grosse zusammenhängende Bereiche aus Oozyten (primär oder sekundär), jedoch Hodengewebe immer noch mehr als 50% der Fläche
- 6 grosse zusammenhängende Bereiche aus Oozyten (primär oder sekundär); Hodengewebe weniger als 50% der Fläche
- 7 100% des Hodengewebes sind von Oozyten (primär oder sekundär) durchsetzt

Das Reifestadium der Hoden wurde nach einem sechsteiligen Schlüssel eingeteilt (Blüm et al., 1989):

- 1 charakteristisch für den Eintritt in die erste Geschlechtsreife; einzelne Hodentubuli sind deutlich gegeneinander abgetrennt und besitzen noch keine Lumina; Tubuli enthalten neben Zystenzellen nur primäre und sekundäre Spermatogonien
- 2 auch dieses Stadium tritt nur bei Erstlaichern auf; Lumina der Tubuli erkennbar; Interstitium ist stärker vakuolisiert; sekundäre Spermatogonien teilen sich zu Spermatozyten 1. Ordnung
- 3 Spermatozyten 1. Ordnung treten in die Meiose ein und werden zu Spermatozyten 2. Ordnung und Spermatisden. Die von Zystenzellen umgebenen Zellklone mit jeweils identischem Entwicklungszustand sind deutlich voneinander abgrenzbar.
- 4 vereinzelt treten bereits freie (spermierte) Spermatozoen im Lumen der Tubuli auf.
- 5 laichreifer Hoden mit nahezu ausschliesslich freien Spermatozoen im Tubulilumen; das Interstitium ist schwach ausgebildet.
- 6 Übergangsstadium zum nächsten Reproduktionszyklus. Durchmesser der Tubuli sind geschrumpft; im Lumen z.T. noch Spermatozoen des vorangegangenen Reproduktionszyklus erkennbar; Verdickung der Tubuliwände durch die Anlagerung von Spermatozytenzellen des nächsten Zyklus; die Reifestufe 6 mündet direkt in die Reifestufe 3 des nächsten Zyklus.

3. Resultate und Diskussion

14 der makroskopisch als männlich klassifizierten Gonadenproben stellten sich als weibliche Ovarien heraus. Bei den übrigen männlichen Tieren wurden im Bielersee, Genfersee bei Ouchy und bei Versoix und im Rhein bei Basel Ovotestis nachgewiesen (Tab.2). Der Anteil an Intersex-Fischen war in den Gewässern Rhein bei Basel (22%) und Genfersee bei Versoix (16%) am grössten (Abb.1).

Tab.2: Geschlechterdifferenzierung der untersuchten Proben

Gewässer	Anzahl Proben	Weibchen	Männchen	
			normal	Intersex
Bielersee	34	1	30	3
Genfersee Ouchy	32	4	27	1
Genfersee Versoix	33	1	27	5
Greifensee	35		35	
Rhein Basel	18	9	7	2
Zürichsee	15		15	
Total	167	15	141	11

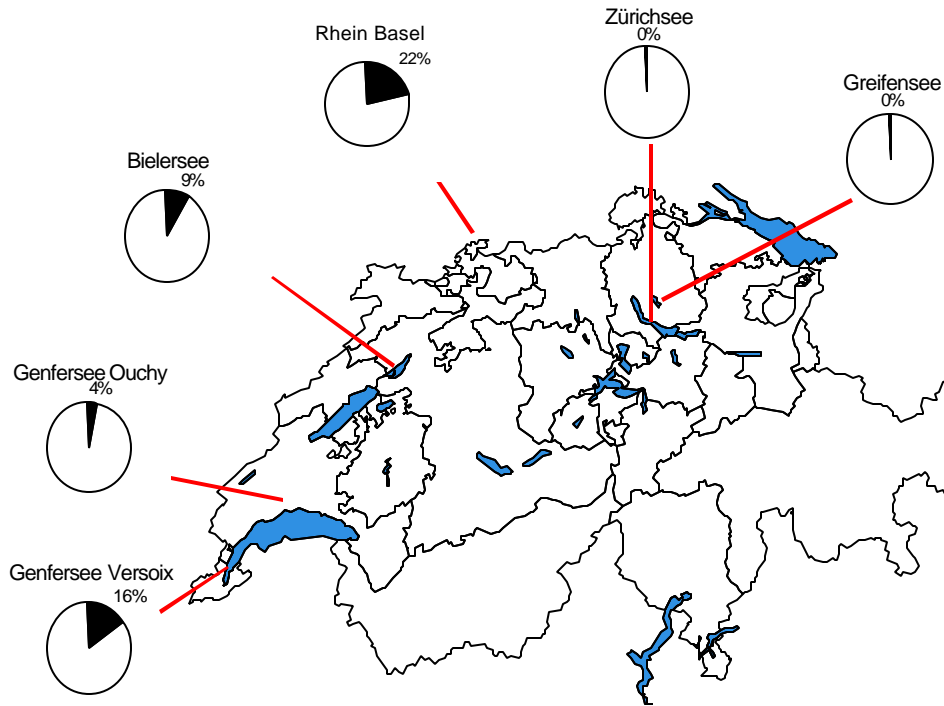


Abb.1: Vorkommen und Häufigkeit von Ovotestis bei den untersuchten männlichen Rotaugen

Bei Untersuchungen in England wiesen männliche Rotaugen aus Labor- und Kontrollgruppen eine Intersex-Rate von 4-18% auf (Jobling et al., 1998). Die Häufigkeit der Intersex-Rotaugen aus den schweizerischen Gewässern liegt in diesem Bereich. Es ist daher schwer zu beurteilen, ob die vorgefundenen Häufigkeit von Ovotestis eine Spontanrate repräsentiert, oder ob die Intersexualität durch hormonaktive Substanzen in den Gewässern verursacht, bzw. gefördert wird, wie es in der Untersuchung in England nachgewiesen werden konnte (Jobling et al., 1998). Um verlässliche Aussagen über die Spontanrate von Ovotestis bei Rotaugen in der Schweiz machen zu können, braucht es weitere Untersuchungen an Tieren, die keinen hormonaktiven Substanzen ausgesetzt sind. Falls tatsächlich eine Spontanrate von 4-18% auftreten sollte, waren die Stichprobengrößen der vorliegenden Untersuchung an den Standorten Zürichsee und Rhein bei Basel zu klein, um verlässliche Aussagen über das Auftreten bzw. die Häufigkeit von Ovotestis machen zu können.

Bei den meisten Intersex-Tieren war der Grad der Intersexualität niedrig. Einzelne primäre Oozyten befanden sich verstreut im Hodengewebe (Index 1-3; Abb.2a). Bei einem Tier aus dem Genfersee bei Versoix wurde eine stärkere Ausprägung beobachtet: viele Oozyten lagen verstreut im Hodengewebe, meist einzeln liegend, z.T. jedoch auch im Klustern von 3-6 Oozyten (Index 4; Abb.2b). Einige der Oozyten dieses Tieres befanden sich bereits im sekundären Stadium, bei dem Vitellogenin ins Zytoplasma der Eizelle eingelagert war (Abb.2c). Sekundäre Oozyten mit Vitellogenin Einlagerungen wurden ausserdem noch bei einem Tier aus dem Rhein bei Basel vorgefunden.

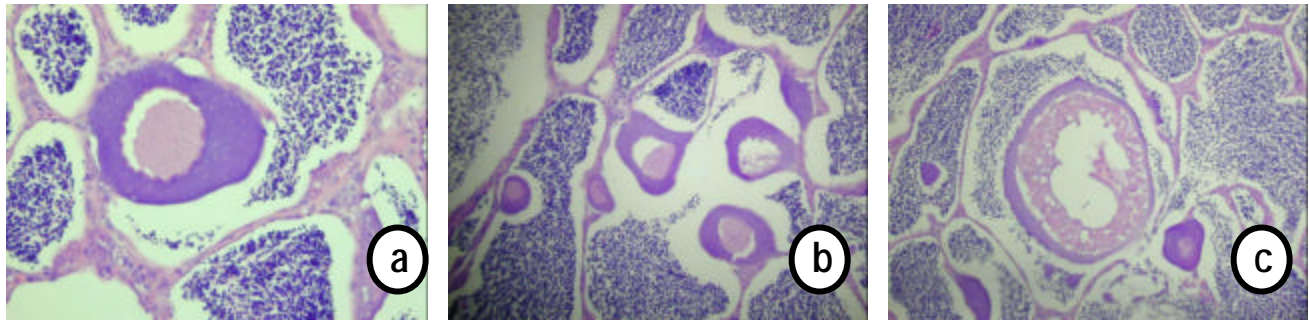


Abb.2: Ovotestis bei einem männlichen Rotaugen aus dem Genfersee bei Versoix. a: einzelne primäre Oozyte angelagert an Tubuluswand eines Hodens. Der Tubulus selber enthält reife Spermien. b: Cluster von mehreren primären Oozyten in einem einzelnen Tubulus. Der Tubulus enthält reife Spermien. c: grosse sekundäre Oozyte angelagert an Tubuluswand mit eingelagertem Vitellogenin im Zytoplasma. Der Tubulus selber enthält reife Spermien. Peripher sind zusätzlich 3 kleinere, primäre Oozyten sichtbar.

Ovotestis wurde in Hoden verschiedener Reifestadien gefunden. Sowohl in unreifen Hoden mit ersten Spermien in den Tubuluslumina (Reifestufe 4), als auch in reifen Hoden (Reifestufe 5) und bereits verlaichten Hoden (Reifestufe 6) traten Oozyten auf.

Zwischen dem Auftreten von Ovotestis und der Länge bzw. dem Gewicht der Tiere waren keine Beziehungen ersichtlich.

Die durchschnittliche Reife der männlichen Rotaugen variierte zwischen den verschiedenen Standorten. Die am wenigsten entwickelten Tiere kamen aus dem Rhein in Basel (Reifestadium durchschnittlich 3.6) und aus dem Zürichsee (Reifestadium durchschnittlich 4.3). An den übrigen Standorten waren die meisten Tiere laichreif oder bereits teilweise verlaicht.

Aussagen über die Funktionalität der Reproduktion bzw. der Qualität des Geschlechtsprodukte von Intersex-Männchen sind anhand der histologischen Schnitte schwierig. Mit Sicherheit lässt sich nur sagen, dass bei allen Intersex-Fischen reife Spermien in den Tubuli vorhanden waren, dass die Spermienkanäle teilweise prall gefüllt waren und dass ein Teil der Tiere zumindest einen Teil der Spermien abgelaicht hatten.

Bei 7 Tieren wiesen die Hoden deutliche histopathologische Veränderungen auf, die nicht mit Ovotestis in Verbindung stehen. Die Funktionalität dieser Hoden dürfte stark eingeschränkt, wenn nicht unterbunden gewesen sein. Dabei handelte es sich um mittelgradige bis hochgradige Nekrosen bei Tieren des Genfersees bei Ouchy (2x) und des Zürichsee (1x), sowie um mittelgradige bis hochgradige Entzündungsprozesse bei Tieren des Genfersees bei Versoix (3x) und um architektonische Veränderungen bei einem Tier des Bielersees mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

4. Literatur

- Burkhardt-Holm, P., Ochsenbein, A., Pugovkin, D., & Wahli, T (1999). Untersuchung männlicher Bachforellen auf das Vorhandensein von Vitellogenin (östrogensensitive Reaktion) sowie von histologischen Veränderungen in der Leber. Teil A: Vitellogenin Untersuchung. Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Universität Bern, Bern.
- Blüm, V., Casado, J., Lehmann, J., Mehring, E.. 1989: Farbatlas der Histologie der Regenbogenforelle. Landesanstalt für Fischerei Nordrhein-Westfalen. Springer-Verlag, Berlin.
- Giger, W., Molnar, E., Ibric, S., Ruprecht, C., Ahel, M., Schaffner, C. & Stoll, J.-M. 1999. Chemikalien aus Wasch- und Reinigungsmitteln in Schweizer Flüssen. EAWAG News 46(D): 12-14.
- Harries, J. E., Sheahan, D. A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J. P., Tylor, T. & Zaman, N. 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(3): 534-542.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C., Brighty, G. & Sumpter, J. P. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology* 32(17): 2498-2506.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P. & Sumpter, J. P. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 194-202.
- Sumpter, J. P. 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters* (82/83): 737-742.