

FISCH UND UMWELT

Der Fischei-Test

– Ein Toxizitätstest für ökotoxikologische Untersuchungen

The fish egg assay, an test system for ecotoxicological assessment

Michael Vobach, Ulrike Kammann, Institut für Fischereiökologie

Der Fischeitest bzw. Embryotoxizitätstest erfasst die sensiblen frühen Lebensphasen der Organismen. Während der Embryonalentwicklung sind Prozesse wie Proliferation, Zellmigration und Differenzierung besonders empfindlich gegenüber Xenobiotika (Fremdstoffe). Mit Hilfe des Fischeitests können sowohl akut toxische als auch subletale Endpunkte untersucht werden, wodurch eine differenzierte Aussage über die Wirkung der Schadstoffe bzw. des Schadstoffgemischs ermöglicht wird.

Ein Problem der Embryotoxikologie ist die Verfügbarkeit von Untersuchungsobjekten (befruchtete Eier) zu jeder Zeit. Da aufgrund des jahreszeitlichen Fortpflanzungsrhythmus der sonst bei Fischtests verwendeten Fische wie z.B. Goldorfe (*Leuciscus idus melanotus*) und Regenbogenforelle (*Oncorhynchus myciss*) und des daraus folgenden einmaligen Ablaichens im Frühjahr eine ständige Durchführung des Tests nicht möglich ist, wird als Alternativfisch der Zebraabärbling (*Danio rerio*) verwendet. Durch die kurzen Laichintervalle ist der Zebraabärbling besonders als Testorganismus für toxikologische Untersuchungen geeignet (Nagel 2002) und wurde schon vielfach für umwelttoxikologische Untersuchungen eingesetzt (Oberemm et al. 1999; Wiegand et al. 2001; Roex et al. 2002).



Abbildung 1: Zebraabärblinge beim Laichen
Spawning zebrafish

Der Zebraabärbling (*Danio rerio*)

Der Zebraabärbling ist ein auf dem indischen Subkontinent in fließenden und stehenden Gewässern (auch in Reisfeldern) beheimateter Süßwasserfisch, der innerhalb der Klasse der Knochenfische (*Osteichthyes*) zur Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*) und hier zur Unterfamilie der Bärblinge (*Rasborinae*) gehört (Abbildung 1). Der bis zu 4,5 cm große Schwarmfisch hat einen schlanken Körper mit 2 Paar Bartfäden am oberständigen Maul. Ihren Namen verdanken die Zebraabärblinge den vier glänzenden Streifen, die über die blauen Seiten von den Kiemendeckeln bis zur Schwanzflosse verlaufen. Die Männchen weisen an den Körperseiten auf stahlblauer Grundfärbung goldglänzende Längsbin-

den auf, die Längsbinden der insgesamt blasser gefärbten Weibchen sind eher silbrig bis gelblich gefärbt. Auch die deutlich gemusterte Analflosse dient zur Differenzierung der Geschlechter während der Laichreife. Das Männchen besitzt in dieser Phase eine orange bis rötlich gefärbte Analflosse, die größer als bei den Weibchen ist. Ansonsten ist das weibliche Tier in der Laichreife etwas kräftiger und auf den ersten Blick an der aufgetriebenen Ventralpartie zu erkennen.

Hälterung und Eiproduktion

Zur Eiproduktion werden adulte Wildfangnachzuchten des Zebraabärblings verwendet. Die Elterntiere werden in Aquarien (100 × 40 × 40 cm) mit einem Besatz

von 100 Tieren gehältert. Es hat sich ein Verhältnis von 2 : 1 (Männchen : Weibchen) als Gruppenzusammensetzung bewährt. Zur Zucht werden nur Elterntiere verwendet, die einen einwandfreien Gesundheitsstatus aufweisen, nicht medikamentös (vor)behandelt sind und äußerlich keine erkennbaren Skelettdeformationen zeigen. Die Zebrabärblinge werden in Leitungswasser bei einer Wassertemperatur von 26 ± 1 °C gehältert. Die Fütterung erfolgt mit handelsüblichem Zierfischrockenfutter (Tetra Min). Zusätzlich hat sich eine Fütterung mit frisch geschlüpften Salinenkrebsen (*Artemia-salina*-Nauplien) bewährt. Die Fütterung erfolgt mindestens zweimal täglich.

Eine gute Wasserqualität ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Zucht. Zur Reinigung wird das Aquarienwasser mit einem Eheim-Filter und Tunze-Turbellen über Filterwatte und Aktivkohle gefiltert. Wöchentlich wird 1/3 des Aquarienwassers gegen Leitungswasser ausgetauscht.

In der freien Natur erfolgt die Balz und Eiablage bei den Zebrabärblingen ganzjährig innerhalb einer Stunde nach Sonnenaufgang. Diese Eigenart macht man sich zu nutze und erhält durch fest eingestellten Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden eine kontinuierliche Eiproduktion der Elterntiere innerhalb einer Stunde nach Einschalten der Beleuchtung.

Adulte Zebrabärblinge sind starke Laichräuber, die die abgelegten Eier in der Regel sofort fressen. Aus diesem Grund werden Laichkästen eingesetzt, in die ein Edelstahlgitter eingehängt ist, durch das die Eier nach der Eiablage hindurchfallen und somit für die Zebrabärblinge unerreichbar sind. Als Anreiz und Auslöser für das Abläichen sind neben dem Licht Pflanzen (taktile Reiz) notwendig. Der taktile Reiz wird durch Pflanzenattrappen aus Kunststoff, die auf dem Edelstahlgitter befestigt sind, stimuliert.

Balz und Eiablage finden innerhalb einer Stunde nach Beleuchtungsbeginn statt. Die Eier mit einem Durchmesser von 0,6 bis 0,7 mm werden in das freie Wasser

abgegeben und fallen durch die Edelstahlgitter auf den Boden der Laichkästen. In der Regel können zwischen 50 und 100 Eier pro Weibchen erhalten werden. 1½ Stunden nach dem Einschalten des Lichtes werden die Laichkästen entnommen. Die transparenten Eier können im Schräglicht über einer schwarzen Unterlage leicht identifiziert werden.

Embryonalentwicklung und Eidifferenzierung

Das Ei des Zebrabärblings wird durch das Chorion, die Eihülle, nach außen begrenzt. Das Chorion ist transparent und umgibt den Perivitellinraum, in dem sich der Dotter (vegetativer Bereich) und die dem Dotter animal aufsitze Keimscheibe befinden. Ein frisch befruchtetes Ei, bei dem es noch zu keiner Zellteilung gekommen ist, wird als Zygote bezeichnet.

Bei einer Wassertemperatur von 26 °C setzt bei befruchteten Eiern nach etwa 15 Minuten die erste Zellteilung ein, weitere Zellteilungen folgen im Abstand von ungefähr 15 Minuten. Die Keimscheibe wird synchron in 4, 8, 16 und 32 Zellen, sog. Blastomeren, geteilt (Discoidalfurchung). In diesem Stadium sind befruchtete Eier eindeutig zu erkennen. Ist das Blastulastadium erreicht, beginnt die Epibolie.

Drei Stunden später geht die Entwicklung in das Gastrulastadium über, bei dem der Dotter zunehmend vom Blastoderm umwachsen wird. Dieser Vorgang ist nach ca. 10 Stunden abgeschlossen und es beginnt das Segmentierungsstadium mit der Ausbildung des Schwanzes und der Somiten. Gehirn und Nervensystem differenzieren sich und die Anlage der Augen erfolgt.

Einen Tag nach der Befruchtung wird der längliche Fischlarvenkörper erkennbar und die Embryonen machen ihre ersten Bewegungen. Nachmals 24 Stunden später ist auch das Herz ausgebildet, der Verdauungstrakt mit der Leber entwickelt und eine deutliche Körperpigmentierung wird sichtbar (Abbildung 2a). Dabei fallen vor allen Dingen die Melanophoren auf, die auf dem Körper verstreut und auch auf den Augen zu finden sind. In dem nun folgenden Schlüpfstadium erfolgt eine weitere Größenzunahme, gleichzeitig wird der Dottervorrat stark aufgebraucht. Das Maul ist geöffnet und die Kiemenöffnungen sind erkennbar. Nach dem Schlüpfen (72 bis 96 Stunden) ist das frühe Larvalstadium erreicht (Westerfield 1995).

Unbefruchtete Eier koagulieren innerhalb der ersten 8 bis 10 Stunden. Eier mit Unregelmäßigkeiten bei der Teilung (Asymmetrie), Bläschenbildung oder Verletzung des Chorions werden für den Versuch nicht herangezogen. Bei kleinen gänzlich weißen Eiern handelt

The fish egg assay, a test system for ecotoxicological assessment.

Zebrafish (*Danio rerio*) embryos have been used to quantify the teratogenic potential of environmental samples and harmful substances respectively. The short spawning interval renders this species a good test organism in toxicological research. Due to the transparency of the eggs several lethal and non-lethal endpoints can be detected in parallel after 48 h of embryonal development. Zebrafish embryos have been shown to be sensitive to a number of environmental relevant contaminants, as well as to extracts from polluted sediments.

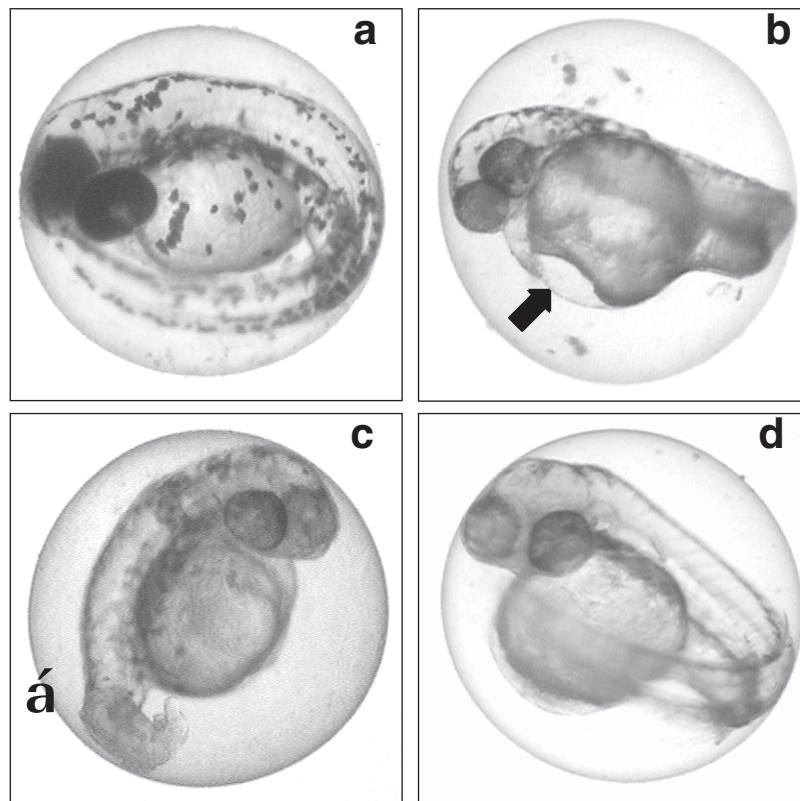


Abbildung 2: Zebrafischembryo (48h). a: normal entwickelt; b: Dottersacködem; c: Wirbelsäulendeformation; d: keine Pigmentierung.

Zebrafish embryo (48h). a: normal development, b: yolk sack oedema, c: spline deformation, d: no pigmentation.

es sich um denaturierte Oozyten. Diese Oozyten sind bereits in den Fischen denaturiert und werden ebenfalls nicht zu Testzwecken verwendet.

Versuchsdurchführung

Der Versuch wird in Anlehnung an die neue DIN-Norm 38415-6 T6 (DIN 2001) für den Fischeitest durchgeführt. Am Abend vor der geplanten Eiablage werden die mit Laichsubstrat (grüne Plastikbänder) präparierten Ablaichkästen in die Aquarien mit den Elterntieren gestellt. Nach Simulation einer Dämmerung erfolgt am Morgen nach dem Einschalten der Beleuchtung die Eiablage. 1 bis 1½ Stunden nach dem Einschalten der Beleuchtung werden die Laichkästen mit den Eiern aus den Aquarien entfernt. Die Eier werden in kleine Plastikgefäße überführt. Nachdem die eventuell vorhandenen Kotreste entfernt wurden, stehen die Eier für die Versuchsdurchführung zur Verfügung. Bei der Auswahl der Eier ist zwischen befruchteten und unbefruchteten zu differenzieren. Eier, deren Keimscheibe asymmetrisch geteilt ist, Bläschenbildung aufweist oder deren Chorion verletzt ist, dürfen nicht für den Versuch herangezogen werden. Diese Differenzierung beeinflusst die gesamte Versuchsdurchführung. Befruchtete Eier ab dem 4- bis 8-Zellstadium werden

unter dem Binokular für den Test aussortiert und in 24 Well-Platten überführt. In jedes Well werden 5 Eier in 1 ml Testlösung pipettiert. Pro Versuchsansatz werden 60 Eier benötigt.

Toxikologische Endpunkte

Nach 24 und 48 Stunden werden die Eier auf letale Missbildungen (entsprechend DIN 38415-T6) und nicht letale Missbildungen hin untersucht und die Ergebnisse protokolliert. Zur Beurteilung der toxischen Effekte erfolgt ein Vergleich des Entwicklungsstandes zwischen schadstoffexponierten Gruppen und nicht exponierten Embryonen (Kontrollen). Folgende Parameter zählen zu den **letalen Missbildungen** und können Hinweise auf Wirkmechanismen geben:

- **Koagulation der Eier:**
Koagulierte Eier sind teilweise oder vollständig undurchsichtig und im mikroskopischen Bild dunkel. Die für die Normalentwicklung charakteristischen Strukturen sind ganz oder teilweise nicht mehr erkennbar.
- **Fehlen der Somitenanlage:**
Die segmentale Anordnung der Ursegmente des Embryos muss erkennbar sein. Die absolute Anzahl der Somiten ist nicht ausschlaggebend.

- Ablösung des Schwanzes vom Dotter:
Eine Ablösung des Schwanzes muss klar erkennbar sein. Der Fortschritt der Schwanzablösung ist abhängig vom Entwicklungsstadium der sich entwickelnden Embryonen im Ei.
- Herzschlag:
Ist innerhalb einer Beobachtungszeit von 30 sec. kein Herzschlag erkennbar, gilt der Embryo als tot. Voraussetzung für einen Blutkreislauf ist ein schlagendes Herz. Auf Grund der Lage der Eier in den Wells ist der Herzschlag gelegentlich schlecht erkennbar; als zusätzliches Kriterium kann der Blutkreislauf herangezogen werden, der häufig gut im Schwanzwurzel-, Kopf- und Dottersackbereich sichtbar ist. Die Herzschlagfrequenz spielt für die Bewertung des Herzschlagparameters keine Rolle.

Nach DIN 38415-T6 gilt ein Embryo nach 48 Stunden als tot, wenn er entweder

- koaguliert ist,
- kein Herzschlag feststellbar ist,
- keine Somitenanlage erfolgt ist oder
- die Ablösung des Schwanzes vom Dotter nicht erfolgte.

Während des Testes können weitere **nicht letale Missbildungen** (Abbildung 2 b-d) auftreten, die für die Be-

wertung des Testergebnisses nach DIN 38415-T6 nicht berücksichtigt werden:

- Fehlen der Augenanlagen:
Existenz der Augenanlagen bei Embryonen fehlt.
- Keine Spontanbewegung:
Eine Bewegung des Embryos ist nicht erkennbar.
- Fehlen der Pigmentierung:
Anlage von Melanocyten als sternförmige Flecken auf dem Körper des Embryos fehlen.
- Ödeme:
Ausbildung blasenartig aufgetriebener Gewebeveränderungen.
- Wirbelsäulenverkrümmungen:
Missbildungen und Fehlentwicklungen der Wirbelsäule.
- Allgemeine Deformationen:
Missbildungen oder Unterentwicklungen des gesamten Embryos.

Einsatzmöglichkeiten des Fischeitests in der Umweltuntersuchung

Als Beispiel für die Anwendung des Fischeitests sei die toxikologische Untersuchung von marinen Sedimentex-

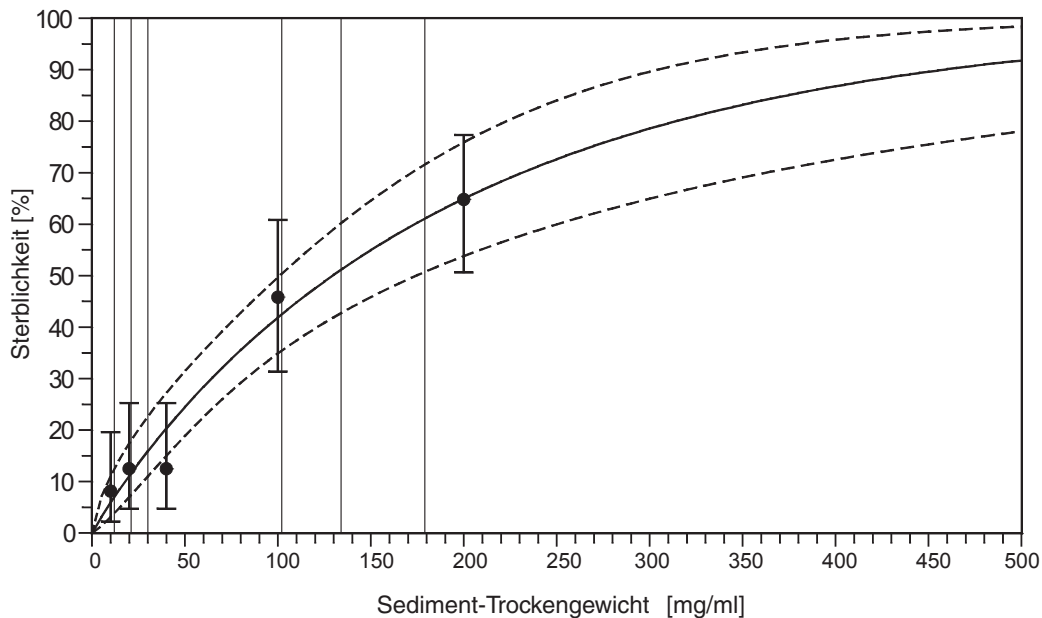


Abbildung 3: Dosis-Effekt Kurve eines Sedimentextrakts (Substanzgemisch) aus der Ostsee im Fischei-Test berechnet nach Weibull-Transformation (durchgezogene Linie) mit Konfidenzintervallen (gestrichelte Linien). Vertikale Linien: EC₁₀ und EC₅₀ mit Konfidenzintervallen. Diese Berechnung wurde mit Unterstützung von W. Wosniok, Universität Bremen, Institut für Statistik, durchgeführt.

Teratogenicity dose effect curve of sediment sample from Baltic sea; solid curve: calculated fish embryo test result after Weibull transformation; dashed curve: confidence intervall. Vertical lines: EC₁₀ and EC₅₀ with confidence intervalls. Results are expressed in (% lethality) related to sediment dry weight.

trakten erwähnt. Durch den Eintrag aus Flüssen und Atmosphäre gelangen in Nord- und Ostsee komplexe Mischungen anthropogener Substanzen, die sich unter bestimmten Voraussetzungen in Sedimenten anreichern. Über die Wirkung dieser Substanzen auf das Ökosystem ist wenig bekannt. Informationen über Konzentration und Verhalten der Stoffe in der Umwelt und insbesondere über die Toxizität der Substanzen sind nötig, um diese im Hinblick auf die Aufnahme in Monitoringprogramme zu bewerten.

Untersuchungen an organischen Extrakten von Sedimenten aus Nord- und Ostsee haben gezeigt, dass in diesen Proben Substanzen vorliegen, die zu – teilweise letalen – Schädigungen von Fischembryonen führen können und eine deutliche Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zeigen (Abbildung 3). Ähnliche Wirkungen von Sedimentextrakten wurden bereits für den Süßwasserbereich beschrieben (Strmac et al. 2002). Welche Substanzen im marinen Milieu die Verursacher der beobachteten Effekte sind, ist nicht klar. Auf der Suche nach den toxischen Substanzen wurden im Rahmen des BMBF-geförderten Projektes „Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe: Toxizitätstest-geleitete Analytik“ (ISIS 2003) eine Reihe umweltrelevanter Einzelsubstanzen, im Fischeitest untersucht. Dazu gehörten insbesondere bromierte Verbindungen und Abbauprodukte von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen. Als toxikologische Kenngrößen wurden EC₅₀ Werte für jede Substanz aus der Dosis-Wirkungs Kurve berechnet. EC₅₀ bezeichnet die effektive Konzentration, bei der 50% der Versuchsorganismen innerhalb eines bestimmten Zeitraums einen Effekt zeigen. Verschiedene Bromindol- und Bromphenol-Verbindungen zeigten EC₅₀ Werte von etwa 5 mg/l .

Tabelle 1: Ergebnisse von fünf Brom-haltigen Einzelsubstanzen und einer Mischung aus dem Fischei-Test. Maximale Konzentration 10 mg/l Testlösung. „Koagulation“ und „kein Herzschlag“ sind für den Embryo letal.

Fish egg test summary with five bromoindole substances and one mix. Maximum concentration 10 mg/L test solution. "Coagulation" and "no heart beat" are lethal for the embryo.

	Koagulation	Kein Herzschlag	Fehlende Pigmentierung	Dotter-sack-ödem
4-Bromphenol			x	
5-Bromindol		x		x
Mix 4-Bromphenol/ 5-Bromindol		x	x	x
4-Bromindol	x	x		x
6-Bromindol		x		x
4,6-Dibromindol				x

Auch wurde beobachtet, dass verschiedenen Substanzen zu unterschiedlichen Missbildungen im Zebrafischembryo führen können. Durch die Kombination solcher Substanzen (z.B. 4-Bromphenol und 5-Bromindol) war es möglich, mehrere Missbildungen nebeneinander am selben Embryo zu beobachten (Tabelle 1). Die Missbildungen folgen offensichtlich verschiedenen Dosis-Wirkungs-Beziehungen und treten substanzspezifisch auf (ISIS, 2003). Diese Eigenschaft des Fischeitests ist für andere umweltrelevante Substanzen bereits aus der Literatur bekannt (z.B. Oberemm et al. 1999; Strmac et al. 2002).

Die Vielzahl der Endpunkte, die parallel an einem Ei bestimmt werden können, machen den Test interessant. Die Erfassung der nicht-letalen Missbildungen erhöht die Empfindlichkeit des Testes gegenüber der DIN Methode, die nur die für den Embryo letalen Veränderungen erfasst. Es zeigte sich, dass einzelne Missbildungen substanzspezifisch auftreten. Damit ist dieser Test besonders gut für die Untersuchung von Mischungstoxizitäten geeignet.

Zitierte Literatur

DIN, 2001: DIN-Norm 38415-6 T6. Suborganismische Testverfahren (Gruppe T), Teil 6: Giftigkeit gegenüber Fischen, Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen (T6), Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung.

ISIS, 2003: ISIS: Identifizierung sedimentgebundener Schadstoffe: Toxizitätstest-geleitete Analytik, Abschlussbericht BMBF-Projekt F0271A-C/ Universität Hamburg, Inst. für Biochemie und Lebensmittelchemie, u. a. – Hamburg 2003, 122 S. und Internet: http://www.bfa-fish.de/news/news-d/hintergrund/ISIS/ISIS_AB.pdf

Nagel, R., Dar, T., 2002: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex-Alternativen zu Tierexperimenten*, 19: 38–48, Suppl. 1.

Oberemm, A., Becker, J., Codd, G.A., Steinberg, C., 1999: Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environ. Toxicol.* 14 (1), 77–88.

Roex, E.W.M., de Vries, E., van Gestel, C.A.M., 2002: Sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*) early life stage test for compounds with different modes of action. *Environ. Poll.* 120(2), 355–362.

Strmac, M., Oberemm, A., Braunbeck, T., 2002: Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. *J. Fish Biol.* 61(1), 24–38.

Westerfield, M., 1995: The zebrafish book. Guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene: Univ. Oregon Press.

Wiegand, C., Krause, E., Steinberg, C., Pflugmacher, S., 2001: Toxicokinetics of Atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotox. Environ. Safety* 49, 199–205.