

# BÖLN

Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
und andere Formen nachhaltiger  
Landwirtschaft

## Entwicklung und Einsatz photodynamischer Substanzen aus Pflanzen zur Bekämpfung parasitärer Fischkrankheiten

**FKZ: 08OE040**

**Projektnehmer:**

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft  
Institut für Fischerei  
Weilheimer Straße 8, 82319 Starnberg  
Tel.: +49 8151 2692-121  
Fax: +49 8151 2692-170  
E-Mail: [Fischerei@LfL.bayern.de](mailto:Fischerei@LfL.bayern.de)  
Internet: <http://www.lfl.bayern.de>

**Autoren:**

Wohllebe, Stephanie; Richter, Peter; Oberle, Martin; Wedekind Helmut; Häder, Donat-Peter

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.



**Entwicklung und Einsatz photodynamischer Substanzen aus  
Pflanzen zur Bekämpfung parasitärer  
Fischkrankheiten**

**ABSCHLUSSBERICHT**

**Autoren:**

Wohllebe, Stephanie<sup>1</sup>, Richter Peter<sup>2</sup>, Oberle Martin<sup>1</sup>, Wedekind Helmut<sup>1</sup> und Donat-Peter Häder<sup>2</sup>

1: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei

2: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Department Biologie, Lehrstuhl für Zellbiologie (früher Ökophysiologie der Pflanzen)

**Zuwendungsempfänger:** Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Postfach 1146, 82301 Starnberg

**Förderkennzeichen:** 08OE040

**Thema:** „Entwicklung und Einsatz photodynamischer Substanzen aus Pflanzen zur Bekämpfung parasitärer Fischkrankheiten“

**Laufzeit:** 01.11.2008 – 31.12.2011

**Berichtszeitraum:** 01.11.2008 – 31.10.2011

**Zusammenarbeit mit anderen Stellen:**

Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Department Biologie, Lehrstuhl für Zellbiologie (früher Ökophysiologie der Pflanzen)

Universität Hohenheim, Lehrstuhl für Zoologie, AG Gravitationsbiologie

Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Summary</b> .....	<b>7</b>
<b>3 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes</b> .....	<b>8</b>
<b>4 Stand des Wissens</b> .....	<b>9</b>
<b>5 Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
5.1 Isolierung von Chlorophyllin.....	11
5.2 Gewinnung von Trophonten des Parasiten <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> .....	12
5.3 Kultivierung der freilebenden Schwärmerstadien.....	12
5.4 Chlorophyllinaufnahme in Trophonten.....	12
5.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in Trophonten.....	12
5.6 In-vitro Versuche mit Trophonten.....	13
5.7 In-vitro Versuche mit Tomiten.....	13
5.8 Verträglichkeitsuntersuchungen von Chlorophyllin an Fischen.....	13
5.8.1 Sektion und Organentnahme.....	13
5.8.2 Verträglichkeitsuntersuchungen an Forellen.....	14
5.8.3 Verträglichkeitsuntersuchungen an Karpfen.....	14
5.8.4 Histologische Untersuchungen.....	15
5.8.5 Bestimmung der Schleimschichtdicke der Kiemenprimärlamellen.....	15
5.8.6 Untersuchungen an mit Parasiten befallenen Karpfen.....	16
5.9 Untersuchungen an mit Parasiten befallenen Karpfen – Mesokosmos Versuche.....	17
5.10 Untersuchungen zur Auswirkung von Chlorophyllin auf Wasserorganismen.....	18
5.11 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.....	19
<b>6 Ergebnisse</b> .....	<b>20</b>
6.1 Chlorophyllinaufnahme in Trophonten von <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> .....	20
6.2 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in Trophonten von <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> .....	22
6.3 In-vitro Versuche mit <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> -Trophonten.....	23
6.4 In-vitro Versuche mit freischwimmenden Schwärmern von <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> .....	24
6.5 Verträglichkeitsuntersuchungen von Chlorophyllin an Fischen.....	24
6.5.1 Verträglichkeitsuntersuchungen an Forellen.....	24

---

6.5.2	Verträglichkeitsuntersuchungen an Karpfen .....	25
6.5.3	Histologische Untersuchungen .....	25
6.5.4	Bestimmung der Schleimschichtdicke der Kiemenprimärlamellen .....	26
6.6	Untersuchungen an mit Ichthyophthirius multifiliis befallenen Karpfen.....	27
6.7	Mesokosmos Versuche .....	32
6.8	Auswirkungen von Chlorophyllin auf Wasserorganismen .....	35
<b>7</b>	<b>Ursprünglich geplante und tatsächlich erreichte Ziele.....</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen/Vorträge .....</b>	<b>39</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>40</b>
	<b>Anhang</b>	

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Schleimschichtdicke [ $\mu\text{m}$ ] um die Kiemenprimärlamellen.....	16
Abb. 2: Fluoreszenzaufnahme eines I.m. Trophonten ohne Chlorophyllin .....	21
Abb. 3: Fluoreszenzaufnahme eines I.m. Trophonten mit Chlorophyllin.....	21
Abb. 4: Nachweis von ROS mittels DCF-DA.....	22
Abb. 5: Nachweis von ROS mittels DCF-DA.....	23
Abb. 6: LD50-Graphen der Trophonten von <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> .....	24
Abb. 7: Schleimschichtdicken [ $\emptyset$ ; $\mu\text{m}$ ] der Kiemenprimärlamellen von K1 .....	26
Abb. 8: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (In % des Anfangsbefalles) nach 3-stündiger Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) ohne Zugabe von Chlorophyll .....	27
Abb. 9: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von $2\mu\text{g/l}$ Chlorophyllin und anschließender 3-stündiger Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) .....	28
Abb. 10: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von $4\mu\text{g/l}$ Chlorophyllin und anschließender 3-stündiger Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) .....	29
Abb. 11: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (In % des Anfangsbefalles) ohne Zugabe Chlorophyllin und ohne Bestrahlung.....	30
Abb. 12: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von $2\mu\text{g/l}$ Chlorophyllin ohne anschließende Bestrahlung .....	31
Abb. 13: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von $4\mu\text{g/l}$ Chlorophyllin ohne anschließende Bestrahlung.....	31
Abb. 14: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (In % des Anfangsbefalles) ohne Zugabe von Chlorophyllin und	

---

anschließender 3-stündiger Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) im Mesokosmos-Versuch .....	32
Abb. 15: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von 2 µg/ml Chlorophyllin und anschließender 3-stündiger Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) im Mesokosmos-Versuch .....	33
Abb. 16: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (In % des Anfangsbefalles) ohne Zugabe von Chlorophyllin und ohne Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) im Mesokosmos-Versuch.....	34
Abb. 17: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von 2 µg/ml Chlorophyllin ohne anschließende Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) im Mesokosmos-Versuch .....	35
Abb. 18: Darstellung der toten Mückenlarven [%] der Gattung <i>Chironomus</i> sp. in Abhängigkeit der Chlorophyllkonzentration im Medium, nach einer 3-stündigen Bestrahlung unter einer sonnenähnlichen Bestrahlungsquelle (Hönle Lampe; links) oder nach 3-stündiger Inkubation in Dunkelheit (rechts). Jeder Punkt gibt eine Probe, bestehend aus jeweils 20 Mückenlarven wieder. Die schwarze Linie ist die sigmoidale Kurve, während die roten Linien die obere und untere Grenze des errechneten 95 %-igen Vertrauensbereiches darstellen. ....	36
Abb. 19: Daphnien tot [%] in Abhängigkeit der Chlorophyllkonzentration.....	37
Abb. 20: Daphnien tot [%] in Abhängigkeit der Chlorophyllkonzentration.....	37

## 1 Zusammenfassung

Viele Fischparasiten, allen voran der Ciliat *Ichthyophthirius multifiliis*, ist ubiquitär verbreitet und stellt vor allem in der Aquakultur ein großes Problem dar. Er führt zu hoher Morbidität und Mortalität bei Nutzfischen. Früher wurde diese Krankheit effektiv mit Malachitgrün behandelt, bis diese Substanz wegen potentiell teratogener und mutagener Nebenwirkungen beim Verbraucher durch den EU-Rat zur Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren verboten wurde. Im Rahmen dieses Projektes wurde die Wirksamkeit der photodynamischen Eigenschaft von Chlorophyllin gegen ektoparasitäre Erkrankungen bei Nutzfischen (mit Schwerpunkt auf *Ichthyophthirius multifiliis*) untersucht. In-vitro Versuche zeigten, dass eine Inkubation in chlorophyllinhaltigem Wasser (2 µg/mL) mit einer sich der Inkubation anschließenden Bestrahlung unter einem Sonnensimulator 100% der isolierten Trophonten abtötet. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sowie der gerichtete Zelltod konnten nachgewiesen werden. Versuche mit Fischen, die auf natürlichem Wege mit *Ichthyophthirius multifiliis* befallen waren, zeigten dass Chlorophyllin zu einer hoch signifikanten Reduktion der am Fisch sitzenden Trophonten führt. Bereits eine dem Wasser zugesetzte Chlorophyllinkonzentration von 2 µg/mL mit einer kombinierten 3-stündigen Bestrahlung unter einem Sonnensimulator führte zu einem Befallsrückgang von 50-60%. In den Kontrollgruppen war hingegen eine Zunahme des *Ichthyophthirius*-Befalls um bis zu 150% zu verzeichnen. Dabei ist das in den Wasserkörper eingebrachte Chlorophyllin für verschiedene andere Wasserorganismen unschädlich und wird zudem sehr schnell und rückstandslos abgebaut.

## 2 Summary

Many fish parasites have an ubiquitary distribution. The ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* is the most common and persistent parasite of freshwater fish, causing the white spot disease. It is causing high morbidity and mortality at fish for human consumption. In the past, fishes were treated with malachite green, but that substance has been banned by the EU-council to treat fish for human consumption, because of its possibly teratogene and mutagene effect to the consumer. The aim of this project was to examine the efficiency of the photodynamic properties of chlorophyllin against ectoparasitic diseases of fish for human consumption. We especially focused our work on the ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. In



vitro experiments showed, that incubation in chlorophyllin treated water (2 µg/mL), followed by illumination by a sun simulator, is able to kill 100% of the trophonts of *I.m.* Formation of reactive oxygen species as well as apoptosis could be demonstrated. Experiments with fish, which were naturally infected by *I.m.*, showed that chlorophyllin reduced the number of trophonts on the skin of the fish with high significance. Already a concentration of 2 µg/mL of chlorophyllin, solved in water and a three hour illumination under the sun simulator is sufficient to reduce the infestation by 50% to 60%, while the control showed an increase up to 150%. The chlorophyllin, which was introduced into the water, was harmless for various aquatic organisms and is degraded quickly and without leaving any residue.

### 3 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Viele Fischparasiten, allen voran der Ciliat *Ichthyophthirius multifiliis*, ist ubiquitär verbreitet und stellt vor allem in der Aquakultur ein großes Problem dar. Er führt zu hoher Morbidität und Mortalität bei Nutzfischen. Früher wurde diese Krankheit effektiv mit Malachitgrün behandelt, bis diese Substanz wegen potentiell teratogener und mutagener Nebenwirkungen beim Verbraucher durch den EU-Rat zur Anwendung bei lebensmittelliefernden Tieren verboten wurde. Seither wird nach einer wirksamen Alternative zur Nutzfischbehandlung gesucht. Kupfersulfat, Formalin, Chloramin-T, Acriflavin, Kaliumpermanganat, Superpercarbonat und Toltrazuril wurden hierfür bewertet. Aber die Behandlungen, die üblicherweise als legale Alternative zu Malachitgrün in der Aquakultur zur Anwendung kommen (NaCl, Formaldehydlösungen) sind wenig effektiv, nicht ungefährlich in der Anwendung oder werden bei bereits vorliegenden Kiemenschäden nicht gut vertragen. Abgesehen davon sind Badebehandlungen bei der Haltung der Fische in der Teichwirtschaft nicht sehr praktikabel, da Fische in der Regel nur einmal im Jahr abgefischt und nur dann gebadet werden können.

Im Rahmen dieses Projektes sollte die Wirksamkeit der photodynamischen Eigenschaft von Chlorophyllin gegen verschiedene ektoparasitäre Erkrankungen bei Nutzfischen (mit Schwerpunkt auf *Ichthyophthirius multifiliis*) untersucht werden. Dabei war beabsichtigt, Chlorophyllin in geeigneter Konzentration dem Wasser zuzusetzen, wo es, in Gegenwart

von Sonnenlicht eine antiparasitäre Wirkung entfaltet. Chlorophyllin ist ein natürliches photosynthetisches bzw. akzessorisches Pigment in Pflanzen, welches nach Anregung mit Licht in einen angeregten Zustand versetzt wird. Von diesem angeregten Zustand aus kann es mit Sauerstoff und Biomolekülen reagieren und dabei die Bildung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff, bzw. die Entstehung von Radikalen induzieren. Diese reaktiven Moleküle sind geeignet kleine Organismen zu töten. Bereits nach kurzer Zeit wird Chlorophyllin durch Licht und biologischen Abbau zerstört und restlos beseitigt. Chlorophyllin kommt in allen Wasserpflanzen vor und ist darüber hinaus als Lebensmittelzusatzstoff E 140 zugelassen und wird als ungefährlich für Mensch und Umwelt eingestuft, wodurch folglich keine lebensmittelrechtlichen Bedenken gegen dessen Verwendung bestehen. Die Versuche sollten zeigen, ob Chlorophyllin diese Erreger auch am Fisch erfolgreich beseitigen kann. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Chlorophyllin in den eingesetzten Konzentrationen für Fische verträglich ist. Chlorophyll hat als ungiftige, biologisch abbaubare Substanz das Potential, die nach dem Verbot von Malachitgrün entstandene Therapielücke in der Behandlung der Ichthyophthiriose zu füllen.

#### **4 Stand des Wissens**

Als photodynamische Reaktionen bezeichnet man destruktive licht-induzierte Prozesse (1). Geeignete Moleküle werden durch Licht angeregt und können mit anderen Molekülen reagieren. Durch Übertragung oder Entzug von Elektronen entstehen dabei reaktive Radikale, welche wiederum mit anderen Molekülen reagieren können (2). Bei Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff wird Wasserstoffperoxid gebildet. Außerdem kann durch Reaktion eines angeregten photodynamischen Moleküls mit Sauerstoff dieser auch ohne Elektronenübertragung in eine sehr reaktive Form, den sogenannten Singulett-Sauerstoff überführt werden (3). Finden photodynamische Prozesse in Organismen statt, so sind die Reaktionspartner der photodynamischen Moleküle Strukturen (Biomoleküle, Membranen) im Organismus, welcher dadurch beschädigt oder zerstört wird.

Photodynamische Substanzen, wie z. B. Protoporphyrin werden schon seit langer Zeit erfolgreich in der Medizin zur Behandlung verschiedener Tumoren und andere Erkrankungen eingesetzt (4-6).

Die photodynamische Effizienz von Protoporphyrin wurde von Abdel-Kader an verschiedenen Parasiten, bzw. deren Überträgern (Mücken, Fliegen und Wasserschnecken)

erfolgreich getestet (7-9). Die Experimente von Abdel-Kader waren der Ausgangspunkt für Experimente mit Chlorophyll am Institut für Ökophysiologie der Pflanzen der FAU Erlangen-Nürnberg. Pflanzliches Chlorophyll besitzt ebenfalls ein Porphyrinringsystem. Chlorophyll steht fast überall zur Verfügung und kann leicht mittels Alkoholextraktion aus Nutz- und Unkrautpflanzen gewonnen werden. Chlorophyll erzeugt bei Bestrahlung reaktive Sauerstoffspezies, wie den hochreaktiven Singulett-Sauerstoff, welcher bestimmte Lebensstadien von Parasiten (z. B. Cercarien, Trypanosomen) oder deren Überträger (z. B. Larven von Stechmücken) töten können.

Für die durchgeführten Experimente wurde das normalerweise fettlösliche Chlorophyll wasserlöslich gemacht. Ein Teil des Chlorophylls wurde durch Säurebehandlung in Phaeophytin überführt.

Unter Verwendung einer standardisierten Bestrahlungsquelle wurden verschiedene Organismen wie z. B. Daphnien und Mückenlarven zunächst in Chlorophyll bzw. Phaeophytin inkubiert und anschließend bestrahlt. Die Ergebnisse belegen, dass pflanzliches Chlorophyll dem Protoporphyrin deutlich in seiner Wirkung überlegen ist.

Ebenso wurden erfolgreich Cercarien bekämpft. Chlorophyll war in einem Vorversuch sehr wirksam gegenüber *Ichthyophthirius multifiliis* Erregern, welche von befallenen Fischen abgestrichenen wurden. Kurz nach Zugabe des Chlorophylls starben die Parasiten ab.

Die Substanzen werden bereits kurz nachdem sie ihre Wirkung entfaltet haben wieder biologisch/physikalisch abgebaut und stellen somit keine Gefahr für die Umwelt dar.

Es wurden zusätzlich noch Methoden erarbeitet, um physiologisch die Wirksamkeit des Chlorophylls nachzuweisen. Proteinanalysen von behandelten *Chaoborus*-Larven ergaben eine deutliche Zunahme von Stressmarkern, sog. Hitzeschockproteinen (HSP 70 und HSP 90). Färbungen von bestrahlten Organismen mit DAPI und Akridinorange zeigten deutlich das Auftreten von Apoptose (programmierter Zelltod (10, 11)) bzw. Nekrosen (12). Zusätzlich wurden Insektenlarven (behandelt und unbehandelt) in ihre Einzelzellen zerlegt, diese mit Annexin und Propidiumiodid gefärbt und deren Fluoreszenz in einem Durchflusszytometer (FACS) bestimmt. Eine Auswertung von jeweils 5000 Zellen erlaubt eine klare statistische Aussage über den Anteil gesunder, toter, nekrotischer und apoptotischer Zellen. Bei isolierten Mückenlarvenzellen zeigte sich ein deutlicher positiver Zusammenhang zwischen Chlorophyllkonzentration und Apoptose/Nekrose. Als wei-

teren Nachweis zogen wir die sog. TUNEL-Färbung (TUNEL: TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) heran, mit der sich vor allem apoptotische, aber auch anders geratete DNA-Strangbrüche quantifizieren lassen (13). Die freien 3'-OH-Gruppen der Brüche werden durch ein Enzym (TdT: „Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) mit künstlich zugegebenen fluoreszenzmarkierten Nukleotiden gekoppelt, welche durch Fluoreszenztechniken (FACS, Fluorimeter oder Fluoreszenzmikroskopie) sichtbar gemacht werden können. Fluoreszenzwerte, welche gegenüber unbehandelten Kontrollen deutlich erhöht sind deuten auf erhöhte Apoptose bzw. Strangbrüche hin. Die Methode wurde an Mückenlarvenzellen und einzelligen Flagellaten erfolgreich angewendet. Zur Behandlung von Parasiten an Fischen gibt es bislang keine Untersuchungen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Isolierung von Chlorophyllin

Chlorophyll konnte sowohl durch Zugabe von Methanol als auch Ethanol extrahiert werden. Zunächst wurde die Extraktion mit Methanol (HPLC grade) oder unvergälltem Ethanol durchgeführt. Da diese Chemikalien aufgrund ihrer Reinheit sehr teuer sind, wurde mit 96 %igem, mit 1% MEK vergälltem EtOH oder technischem Methanol gearbeitet. Nach Zugabe von 0,1 M Calciumcarbonat, welches die Bildung von Phaeophytin verhindert, wurde das Chlorophyll aus dem Grünmaterial im Wasserbad bei 55 °C extrahiert. Dieser Chlorophyllrohextrakt wurde filtriert und mit Petroleumbenzin versetzt. Die durch Schütteln entstandene obere, lipophile Phase wurde abgenommen und durch Zugabe von 1 M Met-NaOH verseift. Dadurch kam es zur Ausfällung des nun wasserlöslichen Chlorophylls (Chlorophyllin) in hoher Konzentration.

Zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration wurden die Proben am Spektrophotometer von 700 nm bis 400 nm vermessen und die Konzentration nach der Formel von Lichtenthaler berechnet.

$$\text{Chlorophyll } a \text{ } [\mu\text{g/mL}] = (11,25 * E_{\text{max}} - 2,04 * E_{\text{max-20nm}}) * \text{Verdünnung}$$

$$\text{Chlorophyll } b \text{ } [\mu\text{g/mL}] = (21,13 * E_{\text{max-20nm}} - 4,19 * E_{\text{max}}) * \text{Verdünnung}$$

$$\text{Chlorophyll gesamt} = \text{Chlorophyll } a + \text{Chlorophyll } b$$

## **5.2 Gewinnung von Trophonten des Parasiten *Ichthyophthirius multifiliis***

Die am häufigsten praktizierte Art der Parasitengewinnung war das Abstreifen der Parasiten von Karpfen, die einen gut sichtbaren *Ichthyophthirius multifiliis*-(*I.m.*)-Befall aufwiesen und dem Fischgesundheitsdienst zur Begutachtung übergeben wurden. Nachdem die Fische anästhesiert und getötet worden waren, konnten die Parasiten mit der Kante eines Objektträgers sorgfältig abgestrichen und in ein Becherglas mit frischem Leitungswasser überführt werden. Etwa zwei Stunden nach der Überführung in Leitungswasser haben die Parasiten den abgestrichenen Mucus verlassen, so dass dieser abgesaugt werden konnte.

## **5.3 Kultivierung der freilebenden Schwärmerstadien**

Zur Gewinnung der freilebenden Schwärmerstadien (Tomiten) von *Ichthyophthirius multifiliis* wurden frisch gewonnene Trophonten in Petrischalen mit 30 mL Leitungswasser bei 15 °C inkubiert. Nach 24 Stunden schwärmten aus nahezu allen Trophonten Tomiten umher, was mit einem Mikroskop bei 25-facher Vergrößerung kontrolliert wurde.

## **5.4 Chlorophyllaufnahme in Trophonten**

Am Fluoreszenzmikroskop wurde beobachtet, ob Chlorophyllin in der Lage ist in die Trophonten von *Ichthyophthirius multifiliis* einzudringen oder ob lediglich eine Benetzung der Trophonten erfolgt. Die Trophonten wurden in 5 mL H<sub>2</sub>O, das mit Chlorophyllin (4,7 µg/mL) versetzt worden war, in Dunkelheit inkubiert. Als Kontrolle dienten Trophonten in H<sub>2</sub>O ohne Zugabe von Chlorophyllin. In Abständen von 5 Minuten wurden Trophonten aus der Lösung genommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, bis keine weitere durch das eindringende Chlorophyllin hervorgerufene, Verstärkung des Fluoreszenzsignals erkennbar war.

## **5.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in Trophonten**

Die DCF-DA-Stammlösung wurde in einer Konzentration von 2 mmol/L in DMSO angesetzt. Die für 15 Minuten in 4 µg/mL Chlorophyll inkubierten Trophonten wurden mit 5 µmol/L des membrangängigen DCF-DA für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension 2 Minuten bei 750 rpm zentrifugiert, um den nicht in die Trophonten gelangten Farbstoff zu verwerfen. Die am Boden des Reaktionsge-

fäßes gesammelten Trophonten wurden gewaschen und in Echtzeit am Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

## **5.6 In-vitro Versuche mit Trophonten**

Nach Zugabe von Chlorophyllin befanden sich in allen Versuchsgefäßes 200 µL Lösung (mit jeweils ca. 100 freischwimmenden Trophonten). Es wurde mit den Chlorophyllinkonzentrationen 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4,7 µg/mL und 7 µg/mL und 10 µg/mL experimentiert. Zudem wurden Wasser- und NaOH-Kontrollen (0,5 µg/mL, 7 µg/mL) mitgeführt. Alle Tubes wurden für 60 Minuten in Dunkelheit inkubiert, um die Einwirkung von Chlorophyllin auf die Parasitenstadien zu gewährleisten. Im Anschluss wurden neun Tubes unter der standardisierten Hönle-Lampe einer 30-minütigen Bestrahlung ausgesetzt, während die restlichen neun Reaktionsgefäße in Dunkelheit verblieben.

## **5.7 In-vitro Versuche mit Tomiten**

In jedes Versuchsgefäß wurden 400 µL der Schwärmerlösung pipettiert und anschließend mit wasserlöslichem Chlorophyll versetzt, so dass mit den Konzentrationen 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL und 4,7 µg/mL gearbeitet wurde. Daneben wurden Kontrollen mit 0 µg/mL Chlorophyllin pipettiert sowie NaOH-Kontrollen. Alle Ansätze wurden für 45 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Jeweils ein Ansatz jeder Konzentration bzw. Kontrolle wurde für weitere 30 Minuten in Dunkelheit belassen, während ein weiterer Ansatz aller Konzentrationen und Kontrollen für 30 Minuten einer standardisierten Bestrahlungsquelle (Hönle-Lampe) ausgesetzt wurde.

## **5.8 Verträglichkeitsuntersuchungen von Chlorophyllin an Fischen**

### **5.8.1 Sektion und Organentnahme**

Die zu tötenden Fische wurden mit MS222 betäubt und durch einen Kiemenschnitt getötet. Anschließend folgte die Sektion mit der Entnahme der gewünschten Organe. Hierzu wurde der Fisch auf die rechte Körperseite gelegt und die Leibeshöhle in der Medianen von kranial nach caudal bis zur Hälfte eröffnet. Der Schnitt wurde ausgehend vom Ansatzpunkt des ersten Schnittes in der Kiementasche nach dorsal bis zum Ansatz des Kiemendeckels erweitert. Entlang der oberen Grenze der Leibeshöhle wurde anschließend ein Schnitt in Richtung Analöffnung geführt. Bei dieser Methode sind alle inneren Organe frei

sichtbar und können vor der Entnahme für weitere Untersuchungen makroskopisch auf Veränderungen untersucht werden.

### **5.8.2 Verträglichkeitsuntersuchungen an Forellen**

Der Einfluss von 10 µg/mL Chlorophyllin auf Regenbogenforellen (ca. 200 g) wurde untersucht. Hierzu wurden jeweils 10 Tieren in die Versuchsbecken gesetzt. Es wurde mit drei Becken gearbeitet. Die Becken Nummer eins und zwei wurden mit Chlorophyllin, in der angegebenen Menge, versetzt, während Becken Nummer drei als Kontrolle, ohne Chlorophyllinzugabe, diente. Alle Becken wurden für fünf Stunden im Dunklen inkubiert. Danach wurde die Becken Nr. 1 und 3 für drei Stunden unter der Hönle Lampe exponiert, während Becken Nr. 2 weiterhin dunkel gehalten wurde. Während des Versuchs wurden die Tiere permanent beobachtet, um einen sofortigen Abbruch des Experimentes bei sichtbarem Unwohlsein der Tiere zu gewährleisten. Nach der Bestrahlung wurden die Tiere zur weiteren 7-tägigen Beobachtung in die ursprüngliche, zur Hälterung vorhandene Aquarienanlage umgesetzt. Dabei wurde der Gesundheitszustand (Nahrungsaufnahme, Schwimmverhalten, äußere Beschaffenheit) sowie die Mortalität erfasst. Anatomische sowie histochemische Untersuchungen erfolgten nach der Tötung von drei Tieren. Nach der Beobachtungszeit wurden die Fische für weitere sechs Wochen in Quarantäne gehalten, ehe sie dem teichwirtschaftlichen Betrieb zugeführt wurden.

### **5.8.3 Verträglichkeitsuntersuchungen an Karpfen**

Das Hauptaugenmerk der Verträglichkeitsuntersuchungen wurde auf den Einfluss von wasserlöslichem Chlorophyll auf Karpfen gelegt. Um diesen zu untersuchen, wurden jeweils zwei unabhängige Experimente, mit wiederum drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Es wurde mit vorgestreckten ( $K_v$ ) sowie ein- ( $K_1$ ) und zweijährigen ( $K_2$ ) Karpfen und den Chlorophyllinkonzentrationen 2 µg/mL, 4 µg/mL und 10 µg/mL experimentiert. Zudem wurden Kontrollen ohne Zugabe von Chlorophyllin mitgeführt. Pro Ansatz wurden zehn Tiere verwendet, so dass sich eine Gesamtanzahl von 720 Karpfen ergab. Die Fische wurden für fünf Stunden in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden sie einer 3-stündigen Bestrahlung unter einem solar Simulator ausgesetzt. Dabei wurden sie fortwährend beobachtet, um bei sichtbarem Unwohlsein einen sofortigen Versuchsabbruch sicherstellen zu können. Nach erfolgter Exposition wurden die Tiere in die zur Hälterung vorhandene Aquarienanlage gebracht und ihr Gesundheitszustand (Schwimmverhalten, Nahrungsaufnahme, äußere Beschaffenheit, etc.) über einen Zeitraum von sieben Tagen beo-

bachtet. Im Anschluss daran wurden die Fische für weitere sechs Wochen in Hälterungen verwahrt, ehe sie dem laufenden teichwirtschaftlichen Betrieb wieder zugeführt wurden.

#### **5.8.4 Histologische Untersuchungen**

Als Indikator für den gesundheitlichen Zustand der Fische im Hinblick auf die Verträglichkeit von Chlorophyllin wurden unter anderem nach Beendigung der Verträglichkeitsversuche histologische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden bei der Sektion von 3-jährigen Karpfen und Speiseforellen entnommene Teile von Kiemen, Leber und Mitteldarm in 4 %-igem Formalin fixiert und zur weiteren Bearbeitung dem Tiergesundheitsdienst übergeben. Die fixierten Organe wurden entwässert und in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms wurden Dünnschnitte angefertigt, die auf einen Objektträger aufgezogen und getrocknet wurden. Anschließend wurden die Schnitte einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Hierbei wird die blaue Farbe der Zellkerne durch die Färbung mit Hämalaun erzeugt, während der saure Farbstoff Eosin das Zytoplasma in verschiedenen Rotabstufungen anfärbt. Die Auswertung erfolgt am Lichtmikroskop bei 100- bis 400-facher Vergrößerung.

#### **5.8.5 Bestimmung der Schleimschichtdicke der Kiemenprimärlamellen**

Ein weiterer Indikator für den gesundheitlichen Zustand von Fischen ist die durchschnittliche Schleimschichtdicke um die Kiemenprimärlamellen, die mit Hilfe eines Messokulars erfasst werden kann. Hierfür wurden pro Fisch, beidseitig, zwei Proben von mindestens fünf Primärlamellen am ersten und zweiten Kiemenbogen im mittleren Bereich entnommen. Die Vermessung der Schleimschichtdicke erfolgte immer 1250 µm unterhalb des distalen Endes der Primärlamelle, an beiden Seiten (Abb. 1). Um möglichst genaue Werte zu erhalten, wurde die Schleimschichtdicke der Primärlamellen von jeweils zehn Fischen (K1) vermessen und die erhaltenen Werte gemittelt.





*Abb. 1: Schleimschichtdicke [ $\mu\text{m}$ ] um die Kiemenprimärlamellen*

*Messung der Schleimschichtdicke 1250  $\mu\text{m}$  unterhalb des distalen Endes der Primärlamelle von einjährigen Karpfen*

Es wurden jeweils zehn Fische in 0, 2 und 4  $\mu\text{g/mL}$  Chlorophyllin für fünf Stunden in Dunkelheit inkubiert und anschließend für drei Stunden unter der Hönle-Lampe exponiert. Zudem wurden Kontrollgruppen ohne Chlorophyllinzusatz und/oder ohne, nach der Dunkelinkubation folgende, Exposition unter der standardisierten Beleuchtungsquelle mitgeführt. Nach der Bestrahlung wurden die Fische betäubt und getötet, so dass die Primärlamellen wie beschrieben entnommen und vermessen werden konnten.

### **5.8.6 Untersuchungen an mit Parasiten befallenen Karpfen**

Diese Untersuchungen wurden an auf natürlichem Weg infizierten ein- und zweijährigen Karpfen, die dem laufenden teichwirtschaftlichen Betrieb entnommen wurden, vorgenommen. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente mit wiederum drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Als Chlorophyllinkonzentrationen wurden für diese, unter strengen Abbruchkriterien stehenden Untersuchungen 2 mg/L und 4 mg/L gewählt. Daneben wurden Kontrollen, ohne Zusatz von Chlorophyllin, mitgeführt. Pro Ansatz wurden zehn Tiere verwendet, so dass sich eine Gesamtanzahl von 540 Karpfen ergab. Die Fische wurden für fünf Stunden im Dunklen, mit den angegebenen Chlorophyllinkonzentrationen, inkubiert. Danach wurden die Hälfte der Behandlungen einer 3-stündigen Bestrahlung unter dem Sonnensimulator ausgesetzt, die Hälfte verblieb

für weitere 3 Stunden im Dunkeln. Dabei wurden die bestrahlten Fische fortwährend beobachtet, um bei sichtbarem Unwohlsein einen sofortigen Versuchsabbruch sicherstellen zu können. Nach der Bestrahlung wurden die Tiere zur 7-tägigen Beobachtung in die Aquarienanlage verbracht. Im Anschluss daran wurden sie für weitere 6 Wochen in abgeschlossenen Becken gehalten, ehe sie dem normalen teichwirtschaftlichen Betrieb wieder zugeführt wurden. Der Parasitenbefall jedes Fisches wurde mittels Fotografie vor Versuchsbeginn, nach Versuchsende, 72 Stunden nach Versuchsende und nach sieben Tagen erfasst.

Um den am lebenden Fisch erfassten Befall mit *Ichthyophthirius multifiliis* auswerten zu können, wurden die Fotos von den befallenen Fischen am Computer ausgewertet. Die als weiße Punkte sichtbaren Trophonten von *Ichthyophthirius multifiliis* wurden gezählt.

## **5.9 Untersuchungen an mit Parasiten befallenen Karpfen – Mesokosmos Versuche**

Für diese Versuche wurden sechs GFK-Becken verwendet. Diese stellten die Simulation eines Teichwasserkörpers dar. Die Becken wurden mit einer Mischung aus Teich- und Brunnenwasser gefüllt, so dass sich ein Wasservolumen von 200 L pro Becken ergab. Das Brunnenwasser lief vor dem Befüllen der Becken, zur Anreicherung mit Sauerstoff und gleichzeitiger Austreibung übersättigter Gase über eine mit Plastikpartikeln, mit großer Oberfläche, gefüllte Kaskade. Zentral über den sechs Versuchseinheiten, die in zwei Reihen á drei Becken aufgestellt worden waren, wurde in einer Höhe von 4 Metern ein standardisierter Sonnensimulator angebracht. Hierfür war ein Dreibein aus dünnen Metallstangen so aufgebaut worden, dass der Schatteneinfall minimal und für alle Becken gleich war. Jedes Becken wurde mit zehn zweijährigen Spiegelkarpfen besetzt, die einen mittelgradigen *Ichthyophthirius multifiliis* – Befall aufwiesen und deren Gewicht ca. 250 bis 350 g betrug. Der Krankheitszustand wurde vor Versuchsbeginn erfasst und dokumentiert. Pro Experiment wurden drei Mesokosmen mit Chlorophyllin (2 µg/mL) sowie drei Mesokosmen als unbehandelte Kontrolle herangezogen. Nach einer 6-stündigen Inkubation in Dunkelheit wurden die Hälfte der Ansätze für drei Stunden der Strahlung ausgesetzt, die Hälfte der Ansätze verblieb im Dunkeln. Nach dieser 3-stündigen Bestrahlung bzw. weiteren Dunkelphase wurde der Parasitenbefall erneut erfasst und dokumentiert und die Tiere in Hälterungsbecken mit einem kontinuierlichen Durchfluss umgesetzt. Zu den Zeitpunkten 48 und 148 Stunden nach Versuchsbeginn wurde der Parasitenbefall aller Fische

erfasst. Im Anschluss an die Beobachtungsphase wurden die Fische für weitere fünf Wochen in den Hälterungsbecken belassen.

## **5.10 Untersuchungen zur Auswirkung von Chlorophyllin auf Wasserorganismen**

### ***Gammarus sp.***

Es wurde jeweils mit drei unabhängigen Ansätzen gearbeitet und neben den Dunkelkontrollen sowohl H<sub>2</sub>O- als auch NaOH-Kontrollen mit den Konzentrationen 1 µg/mL sowie 10 µg/mL mitgeführt. Der Versuch wurde zudem dreimal wiederholt. Die Experimente wurden in Versuchsgefäßen mit je 400 mL filtriertem Teichwasser und je 30 Gammariden durchgeführt. Als Chlorophyllinkonzentrationen wurden 1 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL und 10 µg/mL gewählt. Die Tiere wurden dem Gewässer entnommen und mit Teichwasser gespült. Anschließend wurden die sie der Größe nach sortiert, um eine möglichst einheitliche Altersstruktur der Tiere für die Versuchsreihen zu verwenden. In jedes Versuchsschälchen wurden je ein Kieselstein sowie ein GazeNetz der Maße 2x2 cm gelegt, um den Tieren das Verweilen am Boden der Gefäße zu erleichtern. Alle Versuchsschälchen wurden über Nacht in Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss daran wurden jeweils drei Ansätze jeder Konzentration für drei Stunden unter dem Sonnensimulator belichtet, während drei weitere Ansätze pro Konzentration und Testsubstanz als Dunkelkontrollen weiterhin in Dunkelheit verblieben. Zur Auswertung der Versuche wurde nach erfolgter Bestrahlung die Vitalität der Gammariden überprüft und die Anzahl toter sowie lebender Tiere erfasst. Hierbei wurden Organismen, die keine Lebenszeichen zeigten (Bewegungen bzw. Zuckungen nach Berührung mit Präpariernadel), als tot gewertet, während unbeeinträchtigte Organismen oder solche mit verminderter Viabilität, als lebend betrachtet wurden.

### ***Chironomus sp.***

Die Larven entwickeln sich in den Tiefenschichten von Gewässern, oft auch im Bodenschlamm versteckt und sind eine der Hauptnahrungsquellen von vor allem kleineren Fischen. Bei Karpfen nehmen Zuckmückenlarven 20% der Naturnahrung ein. Aus diesem Grund und wegen des üppigen Vorkommens dieser Tiere wurde eine umfangreiche Versuchsreihe angesetzt und der Einfluss von neun Chlorophyllin-Konzentrationen untersucht.

Bei allen Konzentrationen (7 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL, 50 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL und 120 µg/mL) wurde mit drei unabhängigen Ansätzen gearbeitet und bei ebenfalls allen Konzentrationen wurden neben den entsprechenden Dunkelkontrollen sowohl H<sub>2</sub>O- als auch NaOH-Kontrollen mitgeführt. Es wurde mit 60 mL H<sub>2</sub>O und 20 Organismen pro Ansatz gearbeitet. Alle Ansätze wurden über Nacht im Dunklen inkubiert. Nach dieser Dunkelinkubation wurden jeweils drei Schälchen pro Konzentration und Testsubstanz unter dem Sonnensimulator für drei Stunden bestrahlt, während drei weitere Schälchen jeder Konzentration und Testsubstanz als Dunkelproben in Dunkelheit verwahrt wurden.

Die Auswertung der Versuchsreihen erfolgte anhand der erfassten Anzahl lebender und toter Organismen, sowohl nach der Inkubationsphase als auch nach erfolgter Bestrahlung.

### ***Daphnia* sp.**

Daphnien sind Schlüsselspezies aquatischer Ökosysteme. Als Modellorganismus besitzen sie praktische Vorteile und sind repräsentativ für Untersuchungen allgemeiner ökologischer Prozesse. Die filtrierenden Zooplankter stellen vor allem im Frühjahr eine wichtige Nahrungsgrundlage für Fische und deren Brut dar. Bei Karpfen nehmen sie 50% der Nahrung ein. Selbst ernähren sie sich von Mikroplankton, Algen und Bakterien. Bei allen Versuchskonzentrationen (1 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL) wurde mit drei unabhängigen Ansätzen gearbeitet, zudem wurden sowohl H<sub>2</sub>O- als auch NaOH-Kontrollen mitgeführt. Es wurde mit 30 mL H<sub>2</sub>O und 20 Organismen pro Versuchsschälchen experimentiert. Alle Versuchsschälchen wurden über Nacht in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils drei Schälchen pro Konzentration unter dem Sonnensimulator für 3 – 4 h bestrahlt, während drei weitere Schälchen jeder Konzentration in völliger Dunkelheit verwahrt wurden. Die Schälchen wurden sowohl nach der Inkubation über Nacht als auch nach erfolgter Bestrahlung ausgewertet, indem die Anzahl lebender sowie toter Organismen vermerkt wurde.

## **5.11 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse**

Die Statistische Auswertung erfolgte mit One-way ANOVA SPSS 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Alle Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt

(SD). Differenzen wurden ab einem Level von  $p < 0.05$  als signifikant betrachtet. Weitere statistische Analysen erfolgten mit dem Student t-Test.

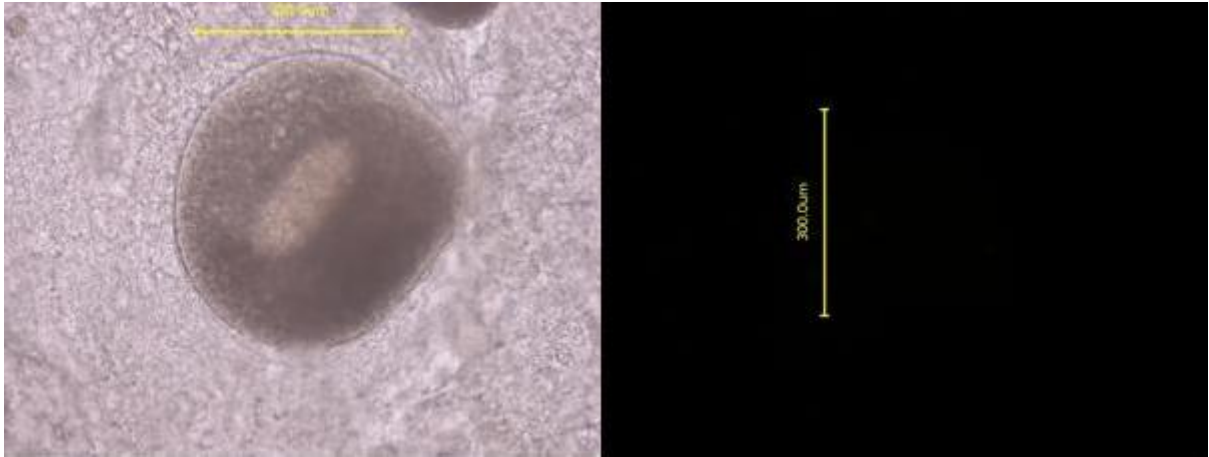
Bei signifikanten Unterschieden wurden diese bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  mit einem dem Symbol #, bei hochsignifikanten Unterschieden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,001$  mit dem Symbol ## gekennzeichnet.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Chlorophyllaufnahme in Trophonten von *Ichthyophthirius multifiliis*

Chlorophyllin zeigt bei Anregung mit blauem Licht eine leuchtend rote Fluoreszenz. Im Falle der Chlorophyllindektion in Trophonten von *Ichthyophthirius multifiliis* wurde mit Blaulicht angeregt und nur das rote Fluoreszenzbild betrachtet. Die so erhaltene rote Fluoreszenz zeigte eindeutig die Anwesenheit von Chlorophyllin im Organismus an.

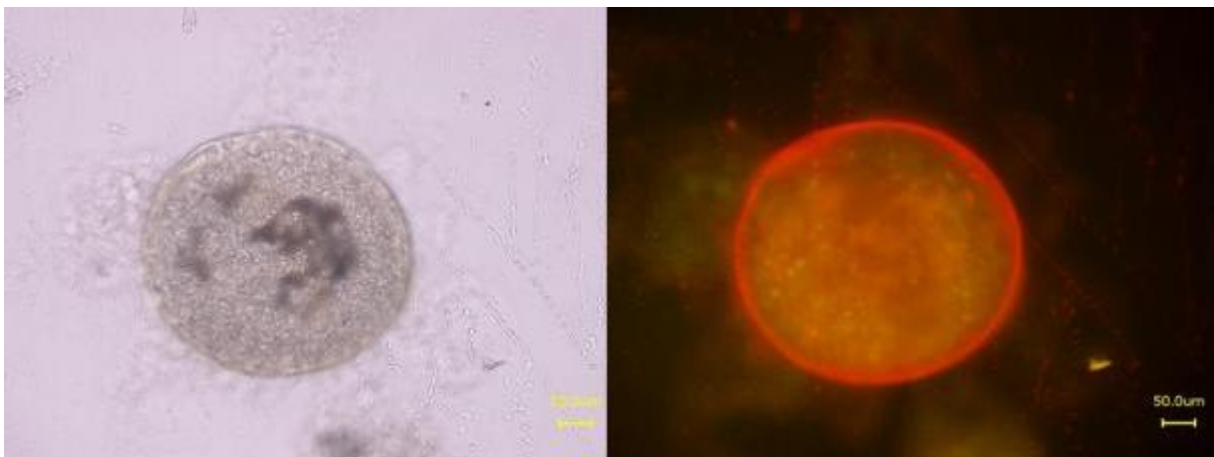
In Abb. 2 ist ein Trophont des Parasiten *Ichthyophthirius multifiliis* dargestellt, der nicht mit Chlorophyllin versetzt worden war. Die Aufnahme im Durchlicht (links) zeigte einen intakten Organismus mit bohnenförmigem Zellkern. Die entsprechende Fluoreszenzaufnahme des Trophonten lieferte kein Fluoreszenzbild, was auf das nicht vorhandene Chlorophyllin zurückzuführen ist. Nach der Zugabe von Chlorophyllin ( $4,7 \mu\text{g/mL}$ ) und einer 30-minütigen standardisierten Exposition unter dem Sonnensimulator zeigte sich bereits im Durchlicht (Abb. 3) ein völlig anderes Bild. Der Zellkern des Trophonten hatte seine Form geändert, des Weiteren schien die Zellwand geschädigt worden zu sein, so dass Zellmaterial austreten konnte. Die anschließende Fluoreszenzaufnahme bestätigte dies. Es zeigte sich eine vollständige Benetzung des Trophonten mit Chlorophyllin was eine Schädigung der Zellwand hervorgerufen hatte und zur Einlagerung von Chlorophyllin innerhalb des Organismus führte. Hierdurch wurde der Zellkern zerstört und das Zellmaterial floss aus dem Trophonten. Es konnte klar gezeigt werden, dass Chlorophyllin in Trophonten von *Ichthyophthirius multifiliis* aufgenommen wird und das Potential zum Abtöten dieser Parasitenstadien besitzt.



*Abb. 2: Fluoreszenzaufnahme eines I.m. Trophonten ohne Chlorophyllin*

*Links: Durchlichtaufnahme eines Ichthyophthirius multifiliis Trophonten ohne Zugabe von Chlorophyllin*

*Rechts: Fluoreszenzaufnahme desselben Trophonten*



*Abb. 3: Fluoreszenzaufnahme eines I.m. Trophonten mit Chlorophyllin*

*Durchlicht- (links) und Fluoreszenzaufnahme (rechts) eines Ichthyophthirius multifiliis Trophonten, nach Inkubation in einer wässrigen Chlorophyllinlösung (4,7 µg/mL) und 30-minütiger Bestrahlung unter einer standardisierten Bestrahlungsquelle (Hönle Lampe)*

## 6.2 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in Trophonten von *Ichthyophthirius multifiliis*

Mittels des Farbstoffes 2',7'-Dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA) gelang es, das Auftreten von chlorophyllinduziertem oxidativen Stress in Trophonten von *Ichthyophthirius multifiliis* nachzuweisen.

Trophonten die nicht mit Chlorophyllin versetzt, jedoch unter dem Sonnensimulator exponiert worden waren, zeigten lediglich eine geringe grüne Fluoreszenz (Abb. 4) und somit ein geringes Maß an oxidativem Stress, der vermutlich durch den Umgang mit den isolierten Trophonten bedingt war. In Abb. 5 ist ein durch die Zugabe von Chlorophyllin in Kombination mit der standardisierten Bestrahlung unter dem Sonnensimulator bedingter enormer Anstieg der DCF-Fluoreszenz erkennbar, was wiederum das Vorhandensein einer Vielzahl reaktiver Sauerstoffmoleküle anzeigt. Das Vorhandensein dieser Moleküle führt wiederum zu einer starken Schädigung bzw. dem Tod des Trophonten.

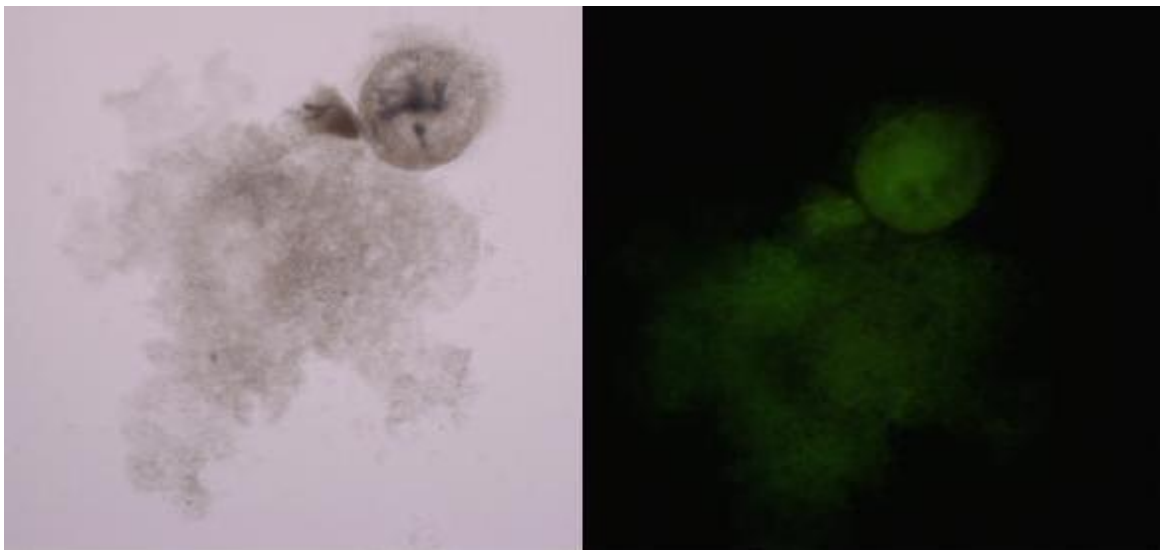


Abb. 4: Nachweis von ROS mittels DCF-DA

Durchlichtaufnahme (links) sowie Fluoreszenzaufnahme (rechts) eines Trophonten von *Ichthyophthirius multifiliis*, der nicht mit Chlorophyllin versetzt worden war

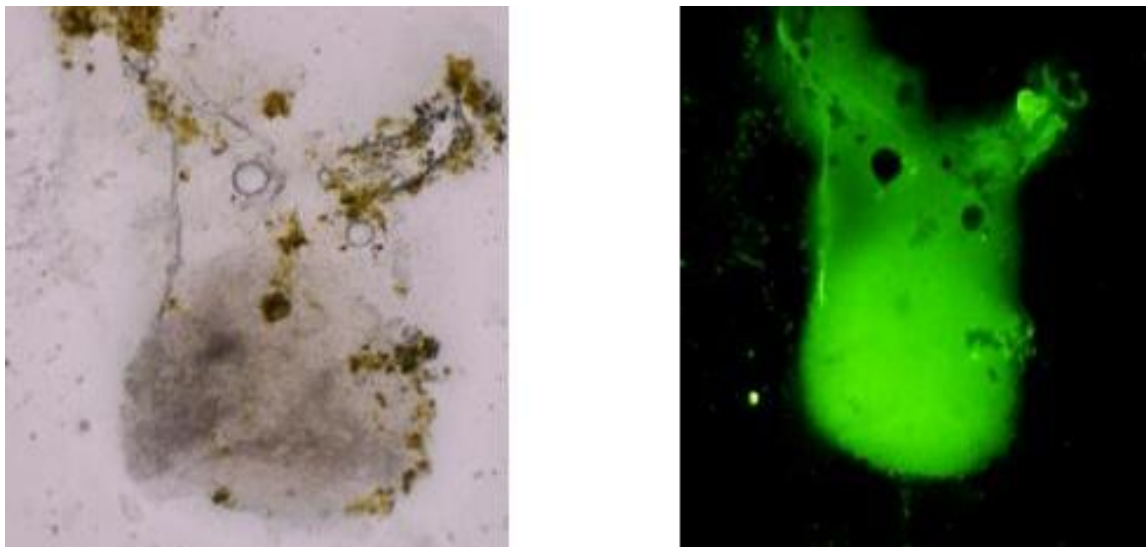


Abb. 5: Nachweis von ROS mittels DCF-DA

Links: Durchlichtaufnahme eines Trophonten des Ektoparasiten *Ichthyophthirius multifiliis* nach Zugabe von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Chlorophyllin, rechts: Starke DCF-Fluoreszenz des Trophonten von *I. multifiliis* nach Zugabe von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Chlorophyllin

### 6.3 In-vitro Versuche mit *Ichthyophthirius multifiliis*-Trophonten

Mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Akridin-Orange, der zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen dient, wurde die Anzahl toter Trophonten [%] von *Ichthyophthirius multifiliis*, in Abhängigkeit von der Chlorophyllinkonzentration im Medium bestimmt. Es zeigte sich, dass bereits sehr geringe Mengen Chlorophyllin in Kombination mit einer Bestrahlung das Potential zum Abtöten dieses Parasitenstadiums besitzen (Abb. 6, links). Bereits bei einer Konzentration von unter 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  wurde eine Sterblichkeit von 100% erreicht. Der aus dem Graphen berechnete LC50-Wert für Trophonten von *Ichthyophthirius multifiliis* beträgt 0,67  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass Chlorophyllin ohne eine kombinierte Bestrahlung keinen Einfluss auf dieses Parasitenstadium hat (Abb.6, rechts). Die maximale Sterblichkeit lag hier bei 10%.



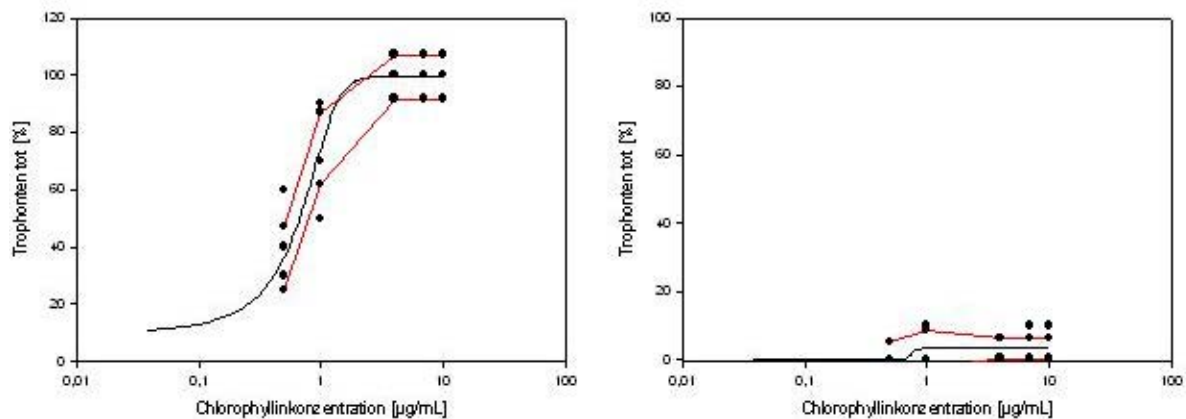


Abb. 6: LD50-Graphen der Trophonten von *Ichthyophthirius multifiliis*

Darstellung der toten Trophonten [%] von *Ichthyophthirius multifiliis*, in Abhängigkeit der verwendeten Chlorophyllkonzentration [µg/mL] im Medium, nach einer 60-minütigen Dunkelinkubation mit darauffolgender 30-minütiger Bestrahlung unter einem Sonnensimulator (Hönle Lampe; links) oder nach weiteren 30 Minuten in Dunkelheit (rechts). Jeder Punkt gibt eine Probe, bestehend aus jeweils 30 Trophonten wieder. Die schwarze Linie ist die sigmoidale Kurve, während die roten Linien die obere und untere Grenze des errechneten 95 %-igen Vertrauensbereiches darstellen. Der berechnete LD50-Wert beträgt 0,67 µg/mL.

## 6.4 In-vitro Versuche mit freischwimmenden Schwärmern von *Ichthyophthirius multifiliis*

Auch bei Schwärmern von *Ichthyophthirius multifiliis* wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Akridinorange gearbeitet um zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden zu können und so das Auftreten von chlorophyllinduzierter Apoptose nachzuweisen. Während in den Kontrollansätzen ohne Chlorophyllin nahezu alle Tomiten als lebend gewertet werden konnten, nahm die Anzahl der rot fluoreszierenden, toten Schwärmer mit steigender Chlorophyllkonzentration im Medium in Kombination mit Bestrahlung zu. Bereits bei einer Konzentration von 2 µg/mL betrug die Sterblichkeit 100%.

## 6.5 Verträglichkeitsuntersuchungen von Chlorophyllin an Fischen

### 6.5.1 Verträglichkeitsuntersuchungen an Forellen

Die Verträglichkeitsuntersuchungen an Regenbogenforellen gegenüber im Wasserkörper gelöstem Chlorophyllin wurden mit einer Konzentration von 10 µg/mL durchgeführt. Alle Tiere überlebten den Versuch. Es waren weder eine beschleunigte Atemfrequenz, vermehrte Schleimexkretion oder Ausfallerscheinungen (Schwimm- und Fressverhalten) zu

verzeichnen. Die Tiere wurden nach dem Versuchsende in die für die Quarantänehaltung vorgesehenen Becken umgesetzt und über einen mehrwöchigen Zeitraum beobachtet. Auch hier zeigten sich keine Auffälligkeiten.

### **6.5.2 Verträglichkeitsuntersuchungen an Karpfen**

Die Verträglichkeitsuntersuchungen an Karpfen verschiedener Altersstufen (vorgestreckte Karpfen, einjährige und mehrjährige Fische) wurden jeweils mit den Chlorophyllinkonzentrationen 2 µg/mL, 4 µg/mL und 10 µg/mL durchgeführt. Nach dem Versuchsende wurden sowohl das Schwimm- als auch das Fressverhalten der Fische beobachtet. Alle untersuchten Tiere nahmen unmittelbar nach Abschluss des Versuches und dem Zurücksetzen in die Halterbecken Futter auf und zeigten keinerlei Auffälligkeiten im Schwimmverhalten. Ebenso wurde die äußerliche Beschaffenheit der Tiere mittels Abstrichen kontrolliert, wobei bei ein- und zweijährigen Karpfen ebenfalls keine Veränderungen festgestellt wurden. Bei vorgestreckten Karpfen wurde eine erhöhte Schleimabsonderung an den Kiemen festgestellt. Während die Sterblichkeit bei mehrjährigen Karpfen bei 0% lag, zeigte sich, dass vorgestreckte Karpfen unter einem Körpergewicht von 1,8 g nur bedingt für eine Behandlung mittels Chlorophyllin geeignet sind. Während bei einer Chlorophyllinkonzentration von 2 µg/mL 0% der Tiere dieser Altersgruppe starben, lag die Sterblichkeit bei der Behandlung mit 4 µg/mL bei 30% und bei einer Chlorophyllinkonzentration von 10 µg/mL bei 50%. Die Tiere waren, aufgrund der vermehrten Schleimbildung an den Kiemen und der damit verbundenen Verklumpung des Chlorophyllins auf den Kiemen, vermutlich erstickt.

### **6.5.3 Histologische Untersuchungen**

Die in Zusammenarbeit mit dem Fischgesundheitsdienst Bayern durchgeführten histologischen Untersuchungen an Kiemen, Leber und Mitteldarm von mehrjährigen Karpfen und Forellen, zeigten, dass eine Behandlung der Fische mit Chlorophyllin im untersuchten Konzentrationsbereich, keine Veränderungen oder Schädigungen hervorruft. Dies wurde durch Vergleiche der histologischen Schnitte der Organe (Kieme, Leber, Darm) von mit Chlorophyllin behandelten Tieren, mit den Schnitten der Organe unbehandelte Tiere, eindeutig nachgewiesen.

### 6.5.4 Bestimmung der Schleimschichtdicke der Kiemenprimärlamellen

Die Vermessung der die Kiemenprimärlamellen von einjährigen Karpfen umgebenden Schleimschicht zeigte ebenso wie die durchgeführten histologischen Untersuchungen keine durch das ausgebrachte Chlorophyllin hervorgerufenen Kiemenschäden. Die Werte der mit Chlorophyllin (2  $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$ ) versetzten, jedoch nicht unter dem Sonnensimulator exponierten Tiere ergaben 86,83  $\mu\text{m}$  und 84,75  $\mu\text{m}$  (Abb. 7) und wichen somit nicht vom Wert der Dunkelkontrolle, also der Tiere ohne Zusatz von Chlorophyllin und ohne Bestrahlung, der bei 87,43  $\mu\text{m}$  lag ab. Auch bei den exponierten Tieren zeigte sich kein eindeutiger Trend. Während die Schleimschichtdicke bei Tieren ohne Chlorophyllinzusatz im Durchschnitt 94,48  $\mu\text{m}$  betrug, ergab sich bei einer ausgebrachten Konzentration von 2  $\mu\text{g/mL}$  eine Schleimschichtdicke von 95,64  $\mu\text{m}$  und bei 4  $\mu\text{g/mL}$  ein signifikanter Abfall auf 70,65  $\mu\text{m}$ .

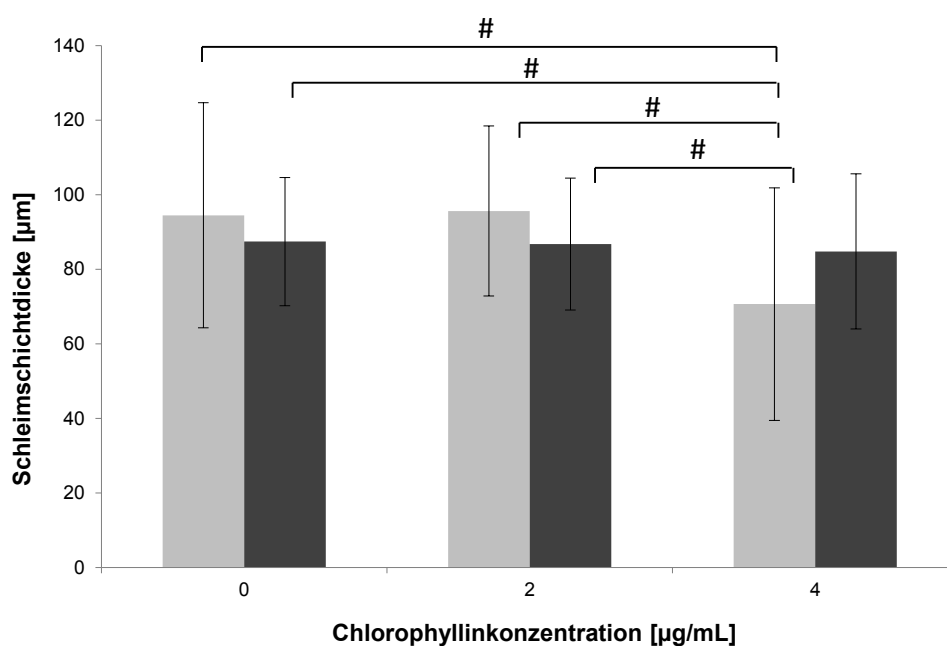


Abb. 7: Schleimschichtdicken [ $\mu\text{m}$ ] der Kiemenprimärlamellen von KI

Die Bestimmung der Schleimschichtdicken erfolgte in Abhängigkeit von der im Wasser vorhandenen Chlorophyllinkonzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ] und der Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe). Helle Säulen: exponierte Proben; dunkle Säulen: nicht exponierte Ansätze

## 6.6 Untersuchungen an mit *Ichthyophthirius multifiliis* befallenen Karpfen

In Abb. 8 ist die Entwicklung des Befalles mit *Ichthyophthirius multifiliis* in % des Anfangbefalles (100 %) 3 h, 48 h und 144 h nach der Behandlung (keine Zugabe von Chlorophyll; Bestrahlungsdauer 3 h) dargestellt. Die nach der Bestrahlungsdauer von 3 Stunden erfasste Parasitenzahl in % ergab einen signifikanten Befallsrückgang auf 80,2%. Bereits 48 h nach Versuchsbeginn war eine Zunahme des Befalles auf 93,6% zu verzeichnen. 144 Stunden nach Versuchsbeginn erfolgte eine weitere Zunahme der Parasitenzahl auf 98,5%.

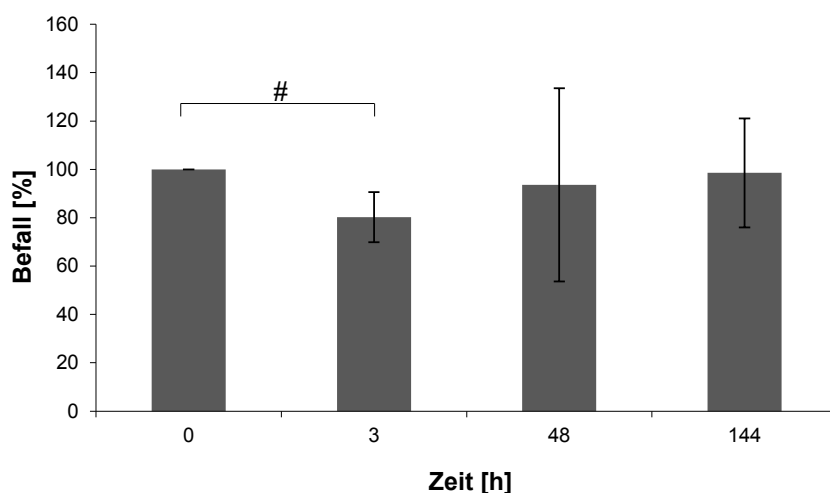


Abb. 8: Entwicklung des Befalles von Karpfen mit *Ichthyophthirius multifiliis* (In % des Anfangbefalles) nach 3-stündiger Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) ohne Zugabe von Chlorophyll

Abb. 9 zeigt die ermittelten Prozentwerte des Befalles mit *Ichthyophthirius multifiliis* in Form eines Säulendiagramms vor und nach der Zugabe von 2 µg/mL Chlorophyllin zum Medium, in Kombination mit einer Expositionsdauer von drei Stunden. Der zu Versuchsbeginn erfasste Parasitenbefall wurde wieder als 100% festgelegt. Bereits unmittelbar nach der Dunkelinkubation und der 3-stündigen Exposition unter der standardisierten Hönle

Lampe war ein hoch signifikanter Rückgang des Befalls auf 47,2% zu verzeichnen. 48 Stunden nach Versuchsbeginn betrug der Befall 47,6%. Ein leichter Anstieg der Parasitenzahl wurde bei der Erfassung des Befalls nach 148 Stunden Versuchsdauer festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Parasitenzahl 53,9% im Vergleich zum Zeitpunkt 0 (Versuchsbeginn), was ebenfalls eine hoch signifikante Abnahme des Befalls mit *Ichthyophthirius multifiliis* darstellt.

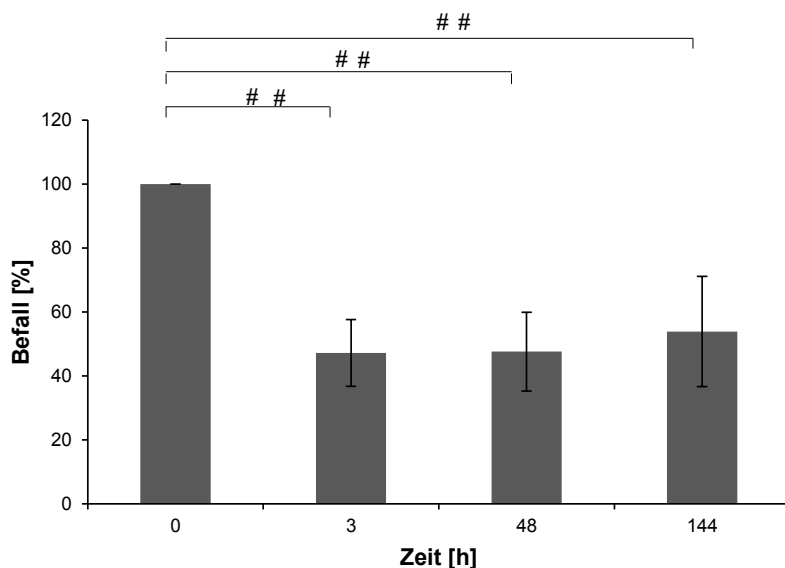


Abb. 9: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit *Ichthyophthirius multifiliis* (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von 2 µg/l Chlorophyllin und anschließender 3-stündiger Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe)

In Abb. 10 sind die Prozentwerte in Form eines Säulendiagramms vor und nach der Zugabe von 4 µg/mL Chlorophyllin zum Medium, in Kombination mit einer Expositionsdauer von drei Stunden, dargestellt. Der ermittelte Parasitenbefall zu Beginn des Versuches wurde wieder auf 100% festgelegt. Die Ausbringung von 4 µg/mL Chlorophyllin in den Wasserkörper führte ebenso wie der Zusatz von 2 µg/mL zu einem unmittelbar nach der 3-stündigen Bestrahlung ermittelten, hoch signifikanten Rückgang des Befalls mit *Ichthyophthirius multifiliis* auf 47,2%. Nach einer Versuchsdauer von 48 Stunden wurde ein leichter Anstieg des Parasitenbefalls auf 54,1% festgestellt.

Bedingt durch einen schlechten Allgemeinzustand der Fische ab ca. 90 Stunden nach Versuchsbeginn, hervorgerufen durch den Ausfall des Belüftungssystems der Halterbecken, in denen die mit 4 µg/mL versetzten Tiere nach der drei-stündigen Exposition zur Beobachtung über den weiteren Versuchszeitraum verbracht worden waren, wurde die Erfassung des Parasitenbefalls nach 144 Stunden abgebrochen.

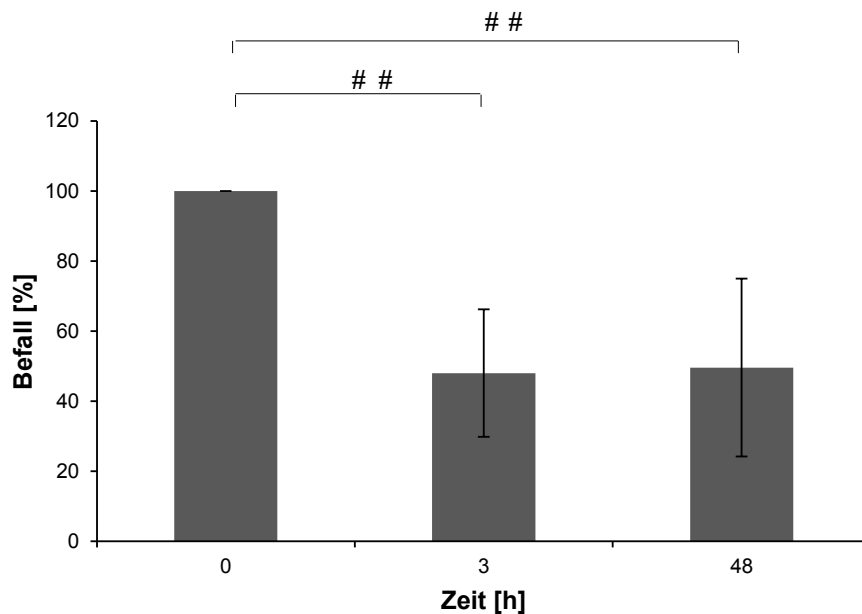


Abb. 10: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit *Ichthyophthirius multifiliis* (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von 4  $\mu\text{g/l}$  Chlorophyllin und anschließender 3-stündiger Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe)

In Abb. 11 sind die Entwicklung des Befalls mit *Ichthyophthirius multifiliis* ohne Chlorophyllinzugabe zum Medium und ohne Exposition der Tiere unter dem standardisierten Sonnensimulator (Hönle Lampe) dargestellt. Während nach einer Versuchsdauer von drei Stunden ein leichter, nicht signifikanter Befallsrückgang auf 98,3% zu verzeichnen war, zeigte sich nach 48 Stunden eine deutliche Zunahme der Parasitenzahl auf 109,2%. Auch 144 Stunden nach Versuchsbeginn wurde kein Rückgang, sondern eine weitere Erhöhung der Parasitenzahl auf 113,3% festgestellt.

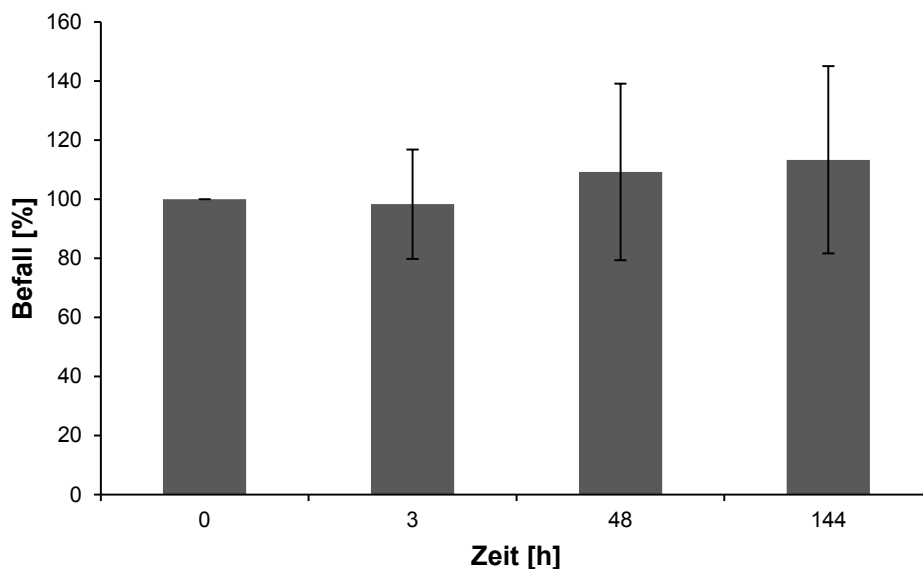


Abb. 11: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit *Ichthyophthirius multifiliis* (In % des Anfangsbefalles) ohne Zugabe Chlorophyllin und ohne Bestrahlung

Abb. 12 zeigt die Entwicklung des Befalls von Karpfen mit *Ichthyophthirius multifiliis* nach einer Chlorophyllinzugabe von 2 µg/ml zum Medium, ohne Exposition der Tiere unter dem standardisierten Sonnensimulator. Auch bei dieser dem Medium zugesetzten Chlorophyllkonzentration sank der Befall innerhalb der ersten drei Stunden nach Versuchsbeginn von 100% auf 88,6%. Nach 48 Stunden zeigte sich eine Zunahme der Parasitenzahl auf 103,6%. Eine hoch signifikante Steigerung des Parasitenbefalls zeigte sich nach 144 Stunden. Dieser betrug zu diesem Zeitpunkt 195,1%, was eine Zunahme um nahezu 100% relativ zum Versuchsbeginn bedeutet.

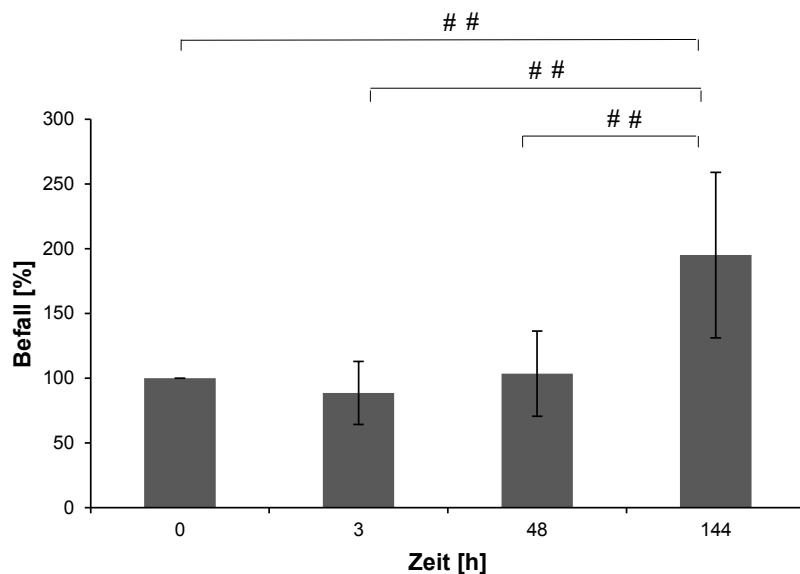


Abb. 12: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit *Ichthyophthirius multifiliis* (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von 2 µg/l Chlorophyllin ohne anschließende Bestrahlung

Abb. 13 zeigt die Entwicklung des Befalls mit *Ichthyophthirius multifiliis* nach einer Chlorophyllinzugabe von 4 µg/ml zum Medium ohne anschließende Exposition der Tiere unter dem standardisierten Sonnensimulator. Der erfasste Parasitenbefall zu Versuchsbeginn wurde als 100% festgesetzt. Nach drei Stunden war ein signifikanter Rückgang auf 93,1% zu verzeichnen. Im weiteren Versuchszeitraum nahm der Befall bis zum Zeitpunkt 144 Stunden nach Versuchsbeginn um 6,3% auf 99,4% zu.

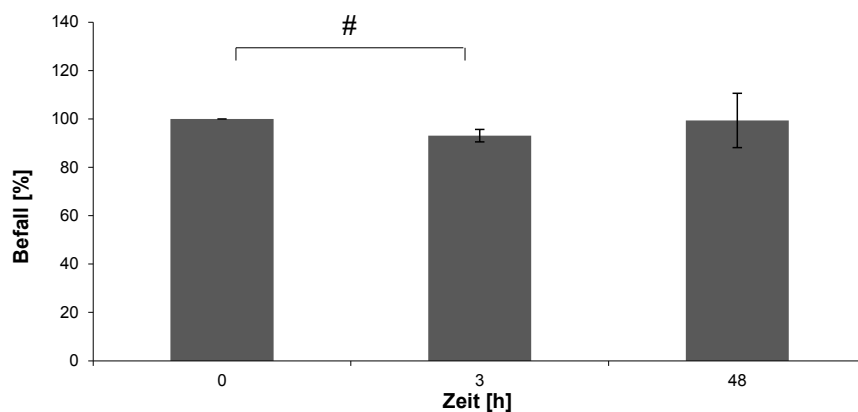


Abb. 13: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit *Ichthyophthirius multifiliis* (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von 4 µg/l Chlorophyllin ohne anschließende Bestrahlung



## 6.7 Mesokosmos Versuche

Der Befall der Fische mit dem Parasiten *Ichthyophthirius* nahm ohne Zusatz von Chlorophyllin bei einer dreistündigen Exposition der Fische unter dem Sonnensimulator unmittelbar nach der Bestrahlung (3 h) von 100% (Anfangsbefall) auf 76,2% signifikant ab. 48 Stunden nach Versuchsbeginn war eine Zunahme des Befalls auf 101,3% zu verzeichnen. Bis zum Zeitpunkt 144 Stunden nach Versuchsbeginn wurde lediglich eine minimale weitere Zunahme des Parasitenbefalls auf 101,6% des Anfangsbefalles festgestellt.

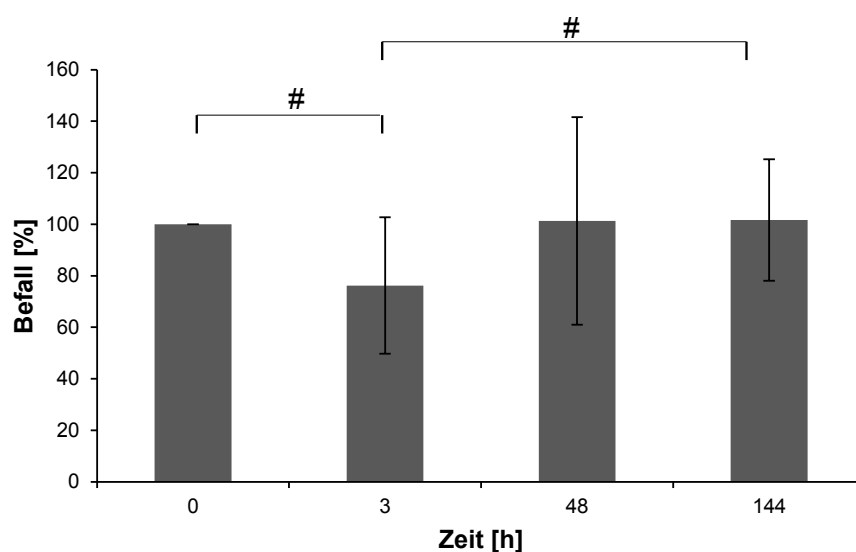


Abb. 14: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit *Ichthyophthirius multifiliis* (In % des Anfangsbefalles) ohne Zugabe von Chlorophyllin und anschließender 3-stündiger Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) im Mesokosmos-Versuch

Abb. 15 zeigt den Befall mit *Ichthyophthirius multifiliis* vor und nach der Zugabe von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Chlorophyllin zum Medium, in Kombination mit einer Expositionsdauer von drei Stunden. Der zu Versuchsbeginn erfasste Parasitenbefall wurde wieder als 100% festgelegt. Bereits unmittelbar nach der Dunkelinkubation und der 3-stündigen Exposition unter der standardisierten Hönle Lampe war ein Rückgang des Befalls auf 44,2% zu verzeichnen. 48 Stunden nach Versuchsbeginn betrug der Befall 44,3%. Ein leichter Anstieg der Parasitenzahl wurde bei der Erfassung des Befalls nach 148 Stunden Versuchsdauer festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Parasitenzahl 50,2% im Vergleich zum Zeitpunkt 0 (Versuchsbeginn).

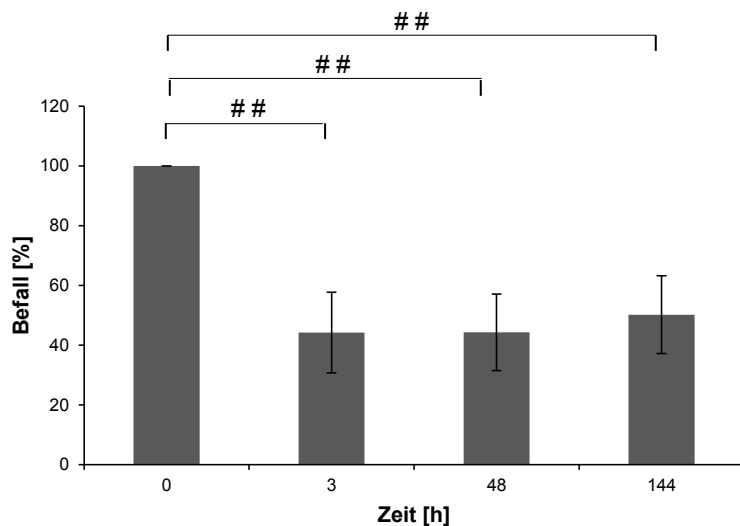


Abb. 15: Entwicklung des Befalles von Karpfen mit *Ichthyophthirius multifiliis* (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von 2 µg/ml Chlorophyllin und anschließender 3-stündiger Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) im Mesokosmos-Versuch

In Abb. 16 ist die Entwicklung des Befalles mit *Ichthyophthirius multifiliis* ohne Chlorophyllinzugabe zum Wasser und ohne Bestrahlung der Tiere dargestellt. Während nach einer Versuchsdauer von drei Stunden ein nicht signifikanter Befallsrückgang auf 86,7% zu verzeichnen war, zeigte sich nach 48 Stunden eine signifikante Zunahme der Parasitenzahl auf 137,4%. Aufgrund einer Vielzahl während der Versuche verstorbener Tiere, hervorgerufen durch deren schweren Befall mit *Ichthyophthirius multifiliis* wurden wegen der zu den anderen Versuchsansätzen unterschiedlichen Tierzahl, zum Zeitpunkt 144 Stunden nach Versuchsbeginn keine Daten erhoben und ausgewertet.

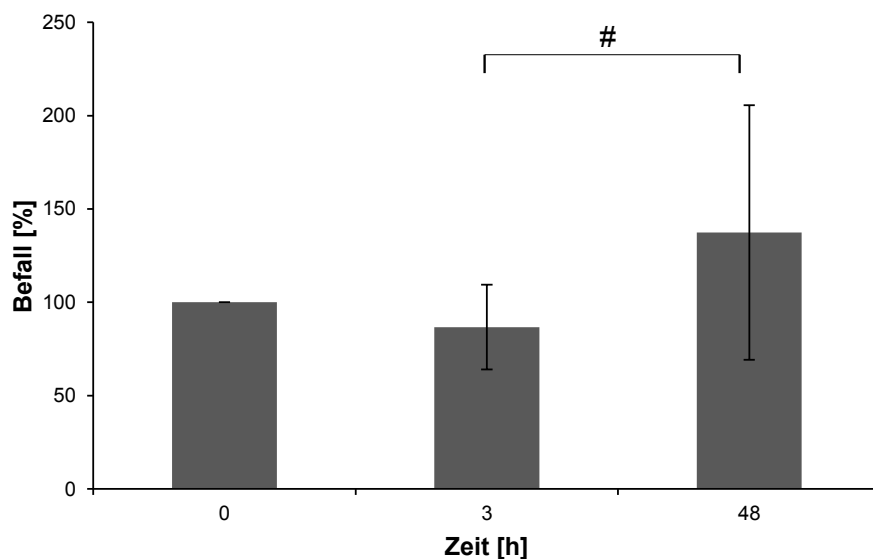


Abb. 16: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit *Ichthyophthirius multifiliis* (In % des Anfangsbefalles) ohne Zugabe von Chlorophyllin und ohne Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) im Mesokosmos-Versuch

In Abb. 17 ist der Befall mit *Ichthyophthirius multifiliis* nach einer Chlorophyllinzugabe von 2 µg/mL zum Medium, ohne sich der Dunkelinkubation anschließende Bestrahlung der Tiere dargestellt. Auch bei dieser dem Medium zugesetzten Chlorophyllkonzentration sank der Befall innerhalb der ersten drei Stunden nach Versuchsbeginn auf 87,5%. Nach 48 Stunden zeigte sich eine Zunahme der Parasitenzahl auf 115,3%. Eine hoch signifikante Steigerung des Parasitenbefalls zeigte sich nach 144 Stunden. Dieser betrug zu diesem Zeitpunkt 216,8%, was eine Zunahme um über 100% relativ zum Versuchsbeginn bedeutet. Trotz dieses enormen Parasitenbefalls verstarb bis zu diesem Zeitpunkt keines der Tiere. Während des weiteren Beobachtungszeitraumes von fünf Wochen traten vermehrt Todesfälle ein.

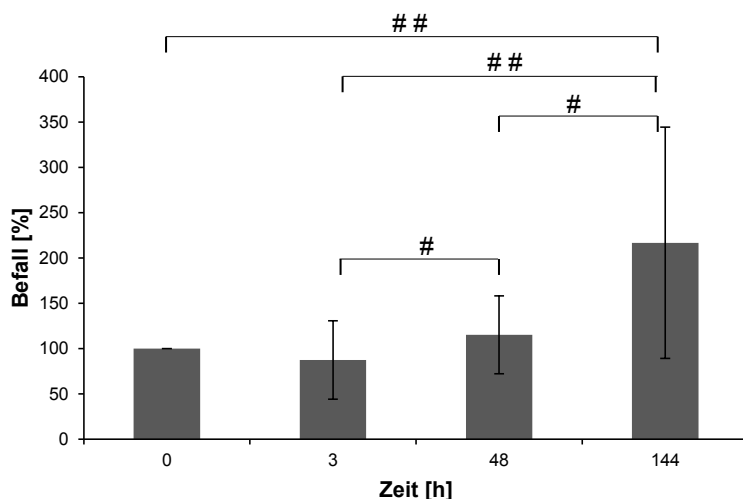


Abb. 17: Entwicklung des Befalls von Karpfen mit *Ichthyophthirius multifiliis* (In % des Anfangsbefalles) bei Zugabe von 2 µg/ml Chlorophyllin ohne anschließende Exposition unter dem Sonnensimulator (Hönle Lampe) im Mesokosmos-Versuch

## 6.8 Auswirkungen von Chlorophyllin auf Wasserorganismen

### *Gammarus* sp.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuchsreihen im Konzentrationsbereich von 0 bis 10 µg/mL Chlorophyllin, zeigen keine Beeinflussung der Gammariden. Insgesamt verstarben während der Versuche lediglich acht Tiere. Die Verteilung der verstorbenen Tiere zeigte, dass es keinen durch Zugabe von Chlorophyllin, weder in Kombination mit einer Bestrahlung noch ohne, bedingten Effekt gab. Während bei einer Chlorophyllinkonzentration von 2 µg/mL im Ansatz ohne Bestrahlung zwei Tiere verendeten, verstarb bei der höchsten getesteten Chlorophyllinkonzentration von 10 µg/mL ein Tier im bestrahlten Ansatz, während in der unbestrahlten Probe alle Tiere unversehrt blieben. Der Tod der Tiere lässt sich durch das jeweilige Handling bzw. Stress erklären.

### *Chironomus* sp.

Die dargestellten LD<sub>50</sub>-Graphen stellen die Wirkung von im Wasserkörper gelösten Chlorophyll auf Zuckmückenlarven (*Chironomus* sp.) dar. Die photodynamische Wirkung des Chlorophyllins, die zur Tötung der Organismen führt, wurde auch bei diesen Larven deutlich. Während bei den nicht unter der solarähnlichen Bestrahlungsquelle exponierten Proben die Sterblichkeit bei maximal 30% liegt und der LD<sub>50</sub>-Wert somit nicht berechnet werden konnte, ist bei den mit Chlorophyllin versetzten und exponierten Proben ein deut-

licher Anstieg der Anzahl toter Organismen mit steigender Chlorophyllkonzentration zu erkennen. Der  $LD_{50}$ -Wert dieser Proben wurde bei einer Konzentration von  $52,97 \mu\text{g/mL}$  ermittelt.

Bei den mitgeführten Kontrollen, die lediglich mit methanolischer-NaOH in den entsprechenden Konzentrationen versetzt worden waren, betrug die Sterblichkeit unter 20%.

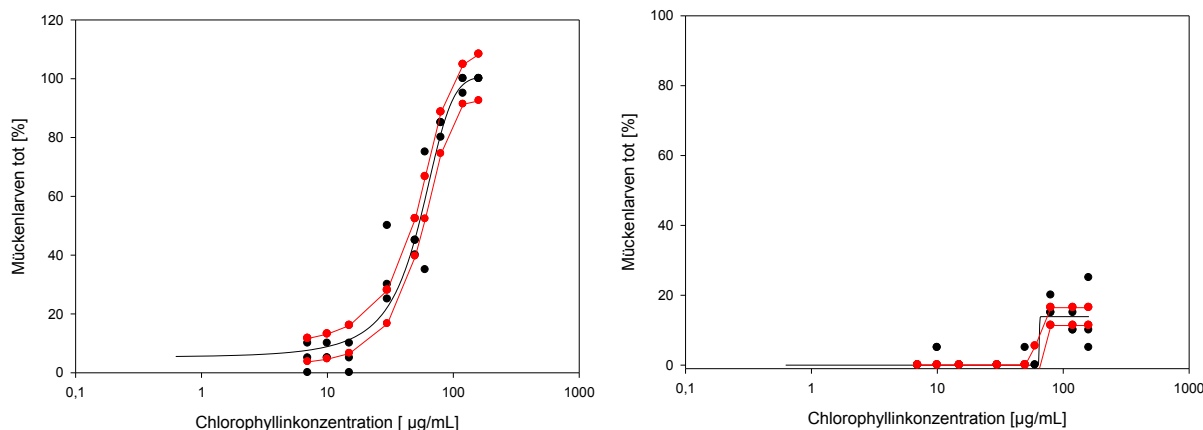


Abb. 18: Darstellung der toten Mückenlarven [%] der Gattung *Chironomus sp.* in Abhängigkeit der Chlorophyllkonzentration im Medium, nach einer 3-stündigen Bestrahlung unter einer sonnenähnlichen Bestrahlungsquelle (Hönle Lampe; links) oder nach 3-stündiger Inkubation in Dunkelheit (rechts). Jeder Punkt gibt eine Probe, bestehend aus jeweils 20 Mückenlarven wieder. Die schwarze Linie ist die sigmoidale Kurve, während die roten Linien die obere und untere Grenze des errechneten 95 %-igen Vertrauensbereiches darstellen.

### ***Daphnia sp.***

Die einen bedeutenden Anteil der Naturnahrung in der Karpfenteichwirtschaft einnehmenden Daphnien, werden im untersuchten Konzentrationsbereich lediglich bedingt geschädigt. Während in den Kontrollansätzen ohne Chlorophyllin der Anteil toter Tiere unter 10% betrug, wurde in den mit Chlorophyllin versetzten und unter dem Sonnensimulator exponierten Proben ein Anstieg der toten Organismen mit zunehmender Chlorophyllkonzentration im Medium beobachtet (Abb. 19). Aus der erstellten sigmoidalen Kurve wurde ein  $LD_{50}$ -Wert von  $22,42 \mu\text{g/mL}$  errechnet. Auch bei den mit Chlorophyllin versetzten Ansätzen, die nach der Dunkelinkubation weiterhin in Dunkelheit verwahrt worden waren, nahm die Zahl toter Tiere mit zunehmender Chlorophyllkonzentration zu (Abb. 20). Der aus dem Graphen errechnete  $LD_{50}$ -Wert lag hier bei  $86,7 \mu\text{g/mL}$ .

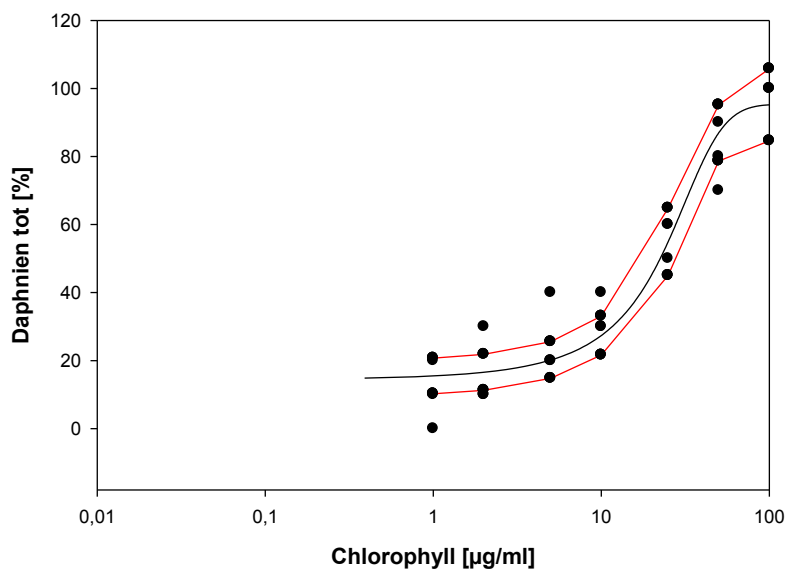


Abb. 19: Daphnien tot [%] in Abhängigkeit der Chlorophyllkonzentration

nach einer Dunkelinkubation (ÜN) und anschließender 3-stündiger Bestrahlung unter der Hönle Lampe. Jeder Punkt entspricht einer Probe (20 Daphnien). Als schwarze Linie ist die sigmoidale Kurve eingezeichnet, als rote Linien die obere und untere Grenze des 95 %-igen Vertrauensbereiches. LD<sub>50</sub>-Wert: 22,42 µg/mL

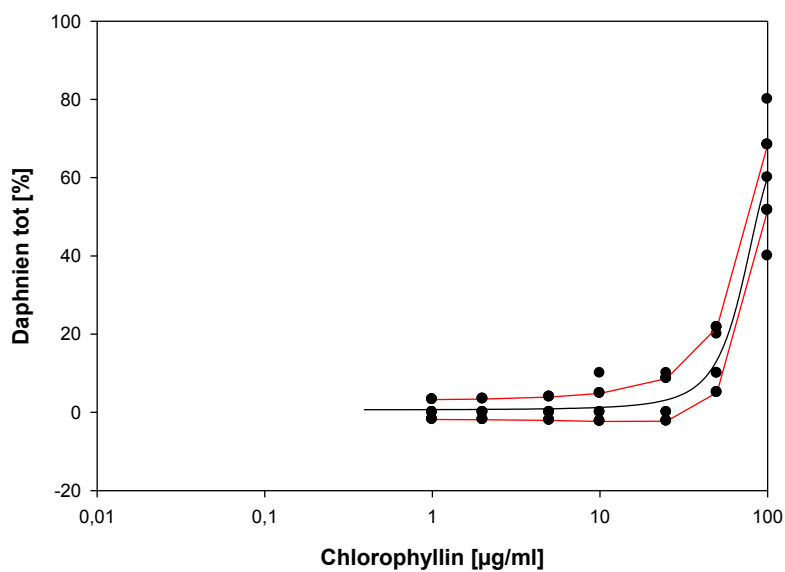


Abb. 20: Daphnien tot [%] in Abhängigkeit der Chlorophyllkonzentration

nach der Dunkelinkubation (ÜN) und weiterer 3 Stunden in völliger Dunkelheit. Jeder Punkt entspricht einer Probe (20 Daphnien). Als schwarze Linie ist die sigmoidale Kurve eingezeichnet, als rote Linien die obere und untere Grenze des 95 %-igen Vertrauensbereiches. LD<sub>50</sub>-Wert: 86,7 µg/mL

## 7 Ursprünglich geplante und tatsächlich erreichte Ziele

Im Projekt waren folgende Arbeitsschritte waren geplant:

### **Vorversuche mit *Ichthyophthirius multifiliis* und anderen Ektoparasiten**

- Standardisierte Laborexperimente zur Bestimmung des LD50 Wertes bei photodynamischer Behandlung mit Chlorophyll, verschiedener Parasiten bzw. deren Lebensformen
- Biochemische und molekularbiologische Untersuchung der photodynamischen Schädigung bei verschiedenen Parasiten (Nachweis von Hitzeschockproteinen, Quantifizierung von Nekrose und Apoptosevorgängen, fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Zellschädigung durch freie Radikale-DCF, Enzymtests).

### **Einsatz von automatischer Bildverarbeitung**

- Analyse des Bewegungsverhaltens beweglicher mikroskopischer Parasitenstadien vor und nach Chlorophyll-Exposition.
- Adaptation der Anlage für die Observation von Fischen und nachfolgend Untersuchung möglicher Veränderungen des Schwimmverhaltens nach Chlorophyll-Exposition.

### **Verträglichkeitsstudien am Fisch**

- Fundierte Untersuchung der Toxizität von Chlorophyll auf Karpfen

### **Laborexperimente mit infizierten Fischen**

### **Durchführung der Experimente in größeren Maßstab**

Bestrahlungsexperimente in größeren Behältern

### **Freilandexperimente in kleinen Teichanlagen**

### **Optimierung der Chlorophyll-Extraktionsmethode**

- Optimierung der Extraktionsquantität
- Entwicklung kostensenkender Methoden zum Recycling der Lösungsmittel
- Erkundung möglicher Alternativmethoden, wie z. B. der superkritische flüssigen Kohlendioxidextraktion

### **Analyse, Dokumentation und Kostenermittlung**

## **Projektdokumentation**

### **Zwischen- und Endbericht**

Nahezu alle im Projektantrag aufgelisteten Versuche konnten realisiert werden. Die Erprobung von Chlorophyllin in Teichen konnte aufgrund mangelnden bzw. zu starken Parasitenbefalls oder zu schlechten Witterungsverhältnissen nicht durchgeführt werden.

## **8 Veröffentlichungen/Vorträge**

### **Veröffentlichungen**

Beitrag im Jahresbericht der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft 2008

Beitrag im Jahresbericht der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft 2009

Beitrag im Jahresbericht der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft 2010

Beitrag im Jahresbericht der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft 2011

Wohllebe et al., Bekämpfung von Parasiten in aquatischen Ökosystemen durch Einsatz von Chlorophyll, Tagungsband der European Association of Fish Pathologists 2010

Weitere Veröffentlichungen in Planung

### **Vorträge**

S. Wohllebe: Entwicklung und Einsatz photodynamischer Substanzen aus Pflanzen zur Bekämpfung parasitärer Fischkrankheiten, Fortbildungstagung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Starnberg vom 12.01. – 13.01. 2010.

S. Wohllebe und M. Oberle: Einsatz photodynamischer Substanzen (Chlorophyllin) zur Bekämpfung von Ektoparasiten in der Fischhaltung, Fortbildungstagung der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Fischerei, Starnberg vom 17.01. – 18.01. 2012.



## Literaturverzeichnis

1. Richter, P., M. Ntefidou, C. Streb, M. Lebert, and D.-P. Häder (2003) The role of reactive oxygen species (ROS) in signaling of light stress. *Recent Res. Devel. Biochem.* 4, 957-970.
2. Laustriat, G. (1986) Molecular mechanisms of photosensitization. *Biochimie* 68, 771-778.
3. Knox, J. P. and A. D. Dodge (1985) The photodynamic action of eosin, a singlet-oxygen generator. Some effects on leaf tissue of *Pisum sativum* L. *Planta* 164, 22-29.
4. Egyeki, M., K. Tóth, W. Waldeck, P. Schmezer, J. Langowski, and G. Csík (2006) DNA damaging capability of hematoporphyrin towards DNAs of various accessibilities. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 84, 119-127.
5. Henderson, B. W. and T. J. Dougherty (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 55, 145-157.
6. Wilson, B. C. and M. S. Patterson (1986) The physics of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* 31, 327-360.
7. Abdel-Kader, M. H., E. A. M. El Sherbini, T. A. A. El Tayeb, G. Jori, and T. Ben Amor (2007) Environmentally Friendly Photopesticides. in press.
8. Abdel-Kader, M. H., A. A. M. El Sherbini, T. A. A. El Tayeb, G. Jori, and A. Rueck (2007) Sunlight and environmentally friendly sensitizer for mosquito control. in press.
9. El Tayeb, T. A. A. Laser scanning microscopy for determination of the efficiency of hematoporphyrin in control of *Culex pipiens* larvae and the snail vector of *Fasciola gigantica*. 1-216. 2003. National Institute of Laser Enhanced Sciences (NILES), Cairo University. Ref Type: Thesis/Dissertation
10. Umansky, S. R. (1996) Apoptosis: Molecular and cellular mechanisms (A review). *Mol. Biol.* 30, 285-295.
11. Hale, A. J., C. A. Smith, L. C. Sutherland, V. E. A. Stoneman, V. L. Longthorne, A. C. Culhane, and G. T. Williams (1996) Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.* 236, 1-26.
12. Vaux, D. L., D. Whitney, and I. L. Weissman (1996) Activation of physiological cell death mechanisms by a necrosis-causing agent. *Microsc. Res. Tech.* 34, 259-266.

13. Darzynkiewicz, Z., D. Galkowski, and H. Zhao (2008) Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods* 44, 250-254.
14. Streb, C., P. Richter, M. Ntefidou, M. Lebert, and D.-P. Häder (2002) ECOTOX-biomonitoring based on real time movement analysis of unicellular organisms. *J. Gravitat. Physiol.* 9, 345-346.
15. Richter, P. R., M. Schuster, M. Lebert, C. Streb, and D.-P. Häder (2007) Gravitaxis of *Euglena gracilis* depends only partially on passive buoyancy. *Adv. Space Res.* 39, 1218-1224.
16. Lebert, M. and D.-P. Häder (1999) Image analysis: A versatile tool for numerous applications. *G. I. T. Imaging Microsc.* 1, 5-6.
17. Häder, D.-P. and M. Lebert (2000) Real-time tracking of microorganisms. In *Image Analysis: Methods and Applications*. (Edited by D.-P. Häder), pp. 393-422. CRC Press, Boca Raton.
18. Häder, D.-P., M. Lebert, M. Schuster, L. del Ciampo, E. W. Helbling, and R. McKenzie (2007) ELDONET—a decade of monitoring solar radiation on five continents. *Photochem. Photobiol.* 83, 1348-1357.
19. Häder, D.-P., M. Lebert, R. Marangoni, and G. Colombetti (1999) ELDONET - European Light Dosimeter Network hardware and software. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 52, 51-58.