

Verhaltensendpunkte in Modellorganismen als zusätzlicher Endpunkt in der ökotoxikologischen Risikobewertung – Chancen und Grenzen am Beispiel von *Daphnia magna* und *Asellus aquaticus*

Saalmann, V. F. (vanessa.saalmann@ime.fraunhofer.de), Kosak, L. (lana.kosak@ime.fraunhofer.de), Eilebrecht, E. (elke.eilebrecht@ime.fraunhofer.de)

Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie IME, Schmallenberg

Zusammenfassung

In der ökotoxikologischen Risikobewertung werden für wirbellose Modellorganismen klassische Endpunkte wie Mortalität oder Reproduktion verwendet, um Effektkonzentrationen abzuleiten. Oberflächengewässer weisen jedoch wesentlich niedrigere Konzentrationen von Chemikalien auf. Das Verhalten von Organismen rückt als sensitiverer Endpunkt in den Fokus. Studien, z.B. mit *Daphnia magna*, zeigen, dass Verhaltensendpunkte in niedrigeren Konzentrationen Effekte zeigen als klassische Endpunkte. Vielversprechende Endpunkte wurden auch für *Asellus aquaticus* etabliert. Dieser Artikel diskutiert Möglichkeiten und Grenzen relevanter Verhaltensendpunkte am Beispiel von *D. magna* und *A. aquaticus*.

1. Einleitung

Wirbellose Tiere sind wichtige Modellorganismen der ökotoxikologischen Risikobewertung, da sie eine Schlüsselposition in den Nahrungsnetzen sowohl terrestrischer als auch aquatischer Ökosysteme einnehmen. Aus diesem Grund wird die Wirkung von Stoffen auf diese wichtige Organismengruppe erfasst. Die aktuellen OECD-Richtlinien für aquatische Invertebraten für die Prüfung von Chemikalien (Abschnitt 2: Auswirkungen auf biotische Systeme) befassen sich hauptsächlich mit der Erfassung von Letalität, Immobilität, Größe, Emergenz, oder Fortpflanzung und berücksichtigen keine Verhaltensendpunkte. Außerdem liegen über die Ökologie der meisten Wirbellosen viele Daten vor, aber oft ist nur wenig über die Auswirkungen von Chemikalien auf das Verhalten von Wirbellosen bekannt. Verhaltensänderungen können jedoch zu Auswirkungen auf Populationsebene führen, z. B. zu einer Verringerung der Nahrungsaufnahme, der Fortpflanzung, Veränderungen der Migration oder des Raubtiervermeidungsverhaltens. Die sich daraus ergebenden Auswirkungen können daher die Populationen und die Funktion der Ökosysteme im Allgemeinen beeinträchtigen (Azevedo-Pereira et al., 2011).

Der Große Wasserfloh *Daphnia magna* ist der bekannteste Modellorganismus für aquatische Invertebraten. Hierbei handelt es sich um planktonische Krebstiere, die in Süßwasserlebensräumen vorkommen und eine zentrale Rolle in aquatischen Nahrungsnetzen spielen, indem sie sich von Algen und Mikroorganismen ernähren und als Nahrungsquelle für Fische dienen (Fent, 1998). *D. magna* reagiert empfindlich auf Umweltveränderungen und dient daher als nützlicher Bioindikator für die Wasserqualität (Bownik, 2017). Typische OECD-

Richtlinien verwenden Endpunkte wie z.B. Immobilisierung (OECD TG 202) und Reproduktion (OECD TG 211), aber analytische Untersuchungen haben gezeigt, dass Chemikalienkonzentrationen in Oberflächengewässern oft unter den Effektkonzentrationen liegen. Verhaltensänderungen könnten auch bei niedrigeren Konzentrationen sensiblere und aussagekräftigere Indikatoren sein (Bownik, 2017).

Asellus aquaticus, auch als Wasserassel bekannt, ist ein aquatisches Krebstier, das in Süßwasserlebensräumen wie Teichen, Bächen und Seen lebt (O'Callaghan et al. 2019). Die Detritusfresser spielen eine wichtige Rolle im Ökosystem, indem sie abgestorbenes Pflanzenmaterial und organische Abfälle zersetzen. Durch ihre Tätigkeit tragen sie zum Nährstoffrecycling bei und unterstützen so die Wasserqualität und das ökologische Gleichgewicht (Bjelke und Herrmann, 2005). *A. aquaticus* dient als Nahrungsquelle für Fische und andere aquatische Raubtiere, was sie zu einem wichtigen Bestandteil des aquatischen Nahrungsnetzes macht (Calizza et al., 2013). In der Literatur liegen nur begrenzte Informationen über Verhaltensänderungen unter dem Einfluss von Chemikalien vor.

In diesem Artikel sollen die Möglichkeiten und Grenzen für relevante Verhaltensendpunkte am Beispiel von *Daphnia magna* und *Asellus aquaticus* diskutiert werden.

2. Aktueller Stand und beispielhafte Ergebnisse der Verhaltensassays

Verhaltensassays rücken immer mehr in den Fokus der Ökotoxikologie. Sie konzentrieren sich häufig auf Modellorganismen, die auch in den klassischen OECD Testrichtlinien eingesetzt werden, z.B. *Daphnia magna* (Bownik, 2017), *Gammarus pulex* (Soose et al., 2023) oder *Danio rerio* (Hussain et al., 2020).

2.1 Verhaltensassays

Es können unterschiedliche Verhaltensendpunkte wie bspw. die Aktivitätszeit, die zurückgelegte Distanz, das Verhalten unter verschiedenen Lichtbedingungen oder Schreckreaktionen unter standardisierten Testbedingungen untersucht werden. Um diese Endpunkte zu erfassen, werden die Testorganismen in 24-Wellplatten überführt (4-24 h alte *D. magna* bzw. *A. aquaticus*-Individuen über ein Netz mit 1.0 mm Maschenweite abgesiebt) und für die Testdauer unter einem 16(Hell):8(Dunkel) h-Rhythmus unter Chemikalienexposition

bzw. als Kontrollgruppe inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Verhaltensassays durchgeführt. Hierzu werden die Wellplatten vorsichtig in eine Box zur Erfassung der Endpunkte, z.B. in das Zantiks MWP System (Zantiks Ltd., Cambridge, UK), überführt. Nach einer Akklimatisationszeit werden die Verhaltensmessungen gestartet.

Lokomotorische Parameter

Die Aktivitätszeit der Testorganismen wird über 60 Sekunden gemessen und in Prozent bestimmt. Die Flächennutzung der Organismen wird hingegen anhand von Heatmaps in mm² unter der Nutzung von ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) berechnet. Beide Messungen werden in 24 Well-Platten durchgeführt.

Phototaxis

Die räumliche Orientierung der Organismen unter Lichteinwirkung wird mit 6-Wellplatten beobachtet, die in beleuchtete und unbeleuchtete Zonen unterteilt sind. Die Platten werden für die Dauer von 300 Sekunden blau beleuchtet und der Aufenthaltsort der Individuen über die Zeit in Prozent bestimmt.

Die Reaktion auf Lichtveränderung wird anhand von zwei Licht (5 Minuten)- und Dunkelzyklen (5 Minuten) in 24 Well-Platten beobachtet. Es wird die zurückgelegte Distanz der Organismen für die jeweiligen Phasen berechnet.

Reaktion auf verschiedene Umweltreize

Das Prädatorvermeidungsverhalten von *D. magna* basiert auf der Reaktion der Organismen auf die Anwesenheit von Kairomonen. Kairomone sind Gallensäuren, die aus dem Darm von Fischen sezerniert werden. In der Natur migrieren die Organismen in Anwesenheit von Kairomonen tagsüber vertikal in tiefe und dunkle Wasserschichten, um dem Prädationsrisiko durch Fische zu entgehen. In der Nacht kommt es zu einer Remigration zur Wasseroberfläche zur Nahrungsaufnahme (Pohnert, 2019). Diese Bedingungen wurden anhand von Küvetten, gefüllt mit Wasser aus einer Zebrafischhälterung, unter Lichtbedingungen simuliert. Der Aufenthaltsort der Organismen wird in Prozent über 180 Sekunden bestimmt.

Die Reaktion auf einen Vibrationsreiz wird anhand eines einmaligen Vibrationsreizes beobachtet. Es wird die zurückgelegte Distanz 10 Sekunden vor und 10 Sekunden nach diesem Reiz bestimmt.

2.1.1 *Daphnia magna*

Das Schwimmverhalten von *D. magna* kann durch verschiedene Parameter wie bspw. die Temperatur, das Licht, den Fütterungszustand oder die Chemikalienexposition beeinflusst werden (Bownik, 2017). In Abb. 1 sind beispielhafte Ergebnisse eines Akutttests nach 48-stündiger Imidacloprid-Exposition [(0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5,00; 10,0 mg/L Imidacloprid (K1-K6, nominale Konzentrationen)] in Elendt M4-Medium (OECD, 2004) dargestellt. Diese sind im Rahmen einer anderen Publikation (Saalman et al., in preparation) entstanden und

wurden dieser entnommen. Untersucht wurden Effekte auf die Aktivitätszeit, Flächennutzung, räumliche Orientierung und das Prädatorvermeidungsverhalten. Es konnten statistisch signifikante Effekte [Dunnett Test; $p < 0,05$; ToxRat Professional (Version 3.3.0, 2015, ToxRat Solutions GmbH & Co. KG, Alsdorf, Germany)] im Konzentrationsbereich 2,50 mg/L Imidacloprid für die Flächennutzung und die räumliche Orientierung beobachtet werden. Verglichen mit den NOEC-Werten (*No Observed Effect Concentration*) für Imidacloprid im *Range Finder* mit *D. magna* nach OECD TG 202 (OECD, 2004) sind die NOEC-Werte für die Verhaltensendpunkte bis zu 20-fach niedriger und liegen näher am Bereich von umweltrelevanten Imidaclopridkonzentrationen (Main et al., 2014).

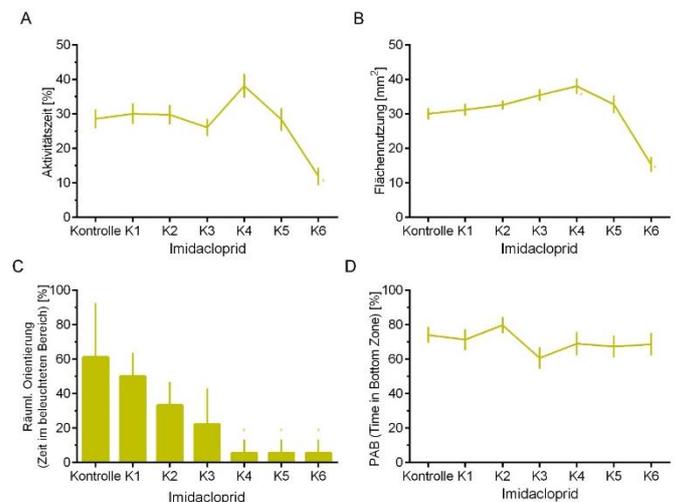


Abb. 1: Ergebnisse der Verhaltensendpunkte von *D. magna* nach 48 Stunden Inkubation unter Imidacloprid-Exposition. K1 bis K6: eingestellte Imidaclopridkonzentrationen (s.o.). A. Aktivitätszeit in Prozent (n = 96 pro Konzentration, Mittelwert ± SEM). B. Flächennutzung in mm² (n = 96 pro Konzentration, Mittelwert ± SEM). C. Räumliche Orientierung in Prozent (Anzahl der Tiere, die sich ausschließlich im beleuchteten Bereich aufhalten, n = 36 pro Konzentration, Mittelwert ± SEM). D. Prädatorvermeidungsverhalten in Prozent (n = 36 pro Konzentration, Mittelwert ± SEM). Die Daten wurden mittels nicht-parametrischer Kruskal-Wallis-ANOVA statistisch ausgewertet. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$).

2.1.2 *Asellus aquaticus*

Im Gegensatz zu *D. magna* hat *A. aquaticus* eine benthische Lebensweise. In der Literatur konnten Studien mit *A. aquaticus* im ökotoxikologischen Zusammenhang sowie für Verhaltensendpunkte gefunden werden. In Abb. 2 sind Ergebnisse der Verhaltensassays von *A. aquaticus* nach 72-stündiger Imidacloprid-Exposition [0,13; 0,25; 0,5; 1,0 mg/L Imidacloprid (K1 – K4, nominale Konzentrationen)] in aufbereitetem Leitungswasser dargestellt. Es wurden Aktivitätszeit, Flächennutzung und die Schreckreaktion auf einen Lichtreiz bzw. einen Vibrationsreiz untersucht. Es wurden statistisch signifikante Effekte (Dunnett-Test; $p < 0,05$) im getesteten Konzentrationsbereich für alle Parameter, ausgenommen der Aktivitätszeit, beobachtet.

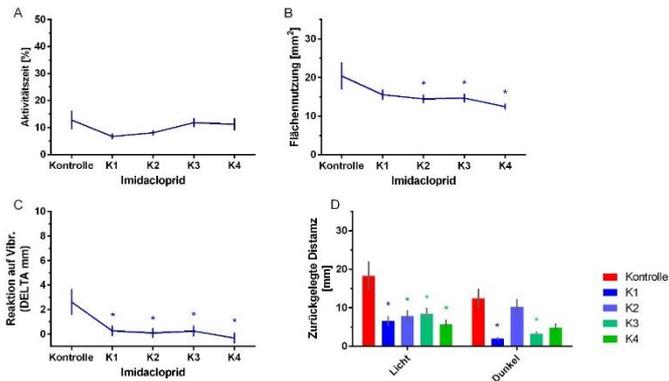


Abb. 2: Ergebnisse der Verhaltensendpunkte von *A. aquaticus* nach 72 Stunden Inkubation unter Imidacloprid-Exposition. A. Aktivitätszeit in Prozent (n= 36 pro Konzentration, Mittelwert \pm SEM). B. Flächennutzung in mm² (n= 36 pro Konzentration, Mittelwert \pm SEM). C. Reaktion auf Vibration in Δ mm (zurückgelegte Distanz nach abzgl. der zurückgelegten Distanz vor dem Vibrationsreiz, n = 36 pro Konzentration, Mittelwert \pm SEM). D. Reaktion auf einen Lichtreiz (zurückgelegte Distanz in mm, n = 36 pro Konzentration, Mittelwert \pm SEM). Die Daten wurden mittels Dunnett-Test statistisch ausgewertet. Statistisch signifikante Abweichungen von der Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen gekennzeichnet ($p < 0,05$).

2.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Vergleich der Verhaltensendpunkte von *D. magna* und *A. aquaticus* lässt folgende Rückschlüsse zu. Der sensitivste Endpunkt für *D. magna* scheinen hier die Phototaxis und die Flächennutzung zu sein, für *A. aquaticus* hingegen die Reaktion auf Vibrationsreize und die Reaktion auf Lichtreize. Für *A. aquaticus* konnten Verhaltensendpunkte etabliert werden, die für weitere Verhaltensassays herangezogen werden könnten. Daten aus Verhaltensassays mit *A. aquaticus* können zum einen die Informationslage zu Effekten auf Nicht-Zielorganismen, zum anderen auch die Datenlage bezogen auf Nicht-Standardorganismen verbessern. Insgesamt liefern diese Daten erste Hinweise darauf, dass *A. aquaticus* eine höhere Sensitivität gegenüber Imidacloprid aufweist als *D. magna*.

3. Diskussion: Chancen und Grenzen

Die Betrachtung von Verhaltensendpunkten aus ökotoxikologischer Sicht wurde in der Vergangenheit intensiv diskutiert. Es finden sich viele Hinweise darauf, dass mithilfe der Verhaltensendpunkte sensitivere Effektkonzentrationen für Nicht-Zielorganismen bestimmt werden können (Bownik, 2017; Soose et al., 2023; Saalman et al., in preparation). Zwar ist die Datenlage bzgl. der Extrapolation auf Populations- bzw. Ökosystemebene bisher unklar, jedoch kann davon ausgegangen werden, dass die Testkonzentrationen in Verhaltensassays näher an den umweltrelevanten Konzentrationsbereichen liegen und damit realistischer die Umweltszenarien abbilden können. Zu diesen Zwecken wären weitere Tests auch auf Mikro- und Makrokosmosebene nötig. Zudem finden sich Hinweise darauf, dass die Dauer der Verhaltensassays im Vergleich zu chronischen Expositionen verkürzt werden könnte. Z.B. fanden sich in verkürzten Studien in Anlehnung an der zeitintensiven OECD TG 211 bereits nach einer Testdauer

von 7 Tagen statistisch signifikante Effekte für die betrachteten Verhaltensendpunkte in Konzentrationsbereichen, die nicht zu signifikanten Effekten auf die Reproduktion führten (Saalman et al., in preparation). Wie für den Einsatz bei verschiedenen Fischarten könnte auch für Invertebraten ein Screening-Ansatz mit Hochdurchsatz etabliert werden, z. B. durch die Nutzung von Wellplatten und entsprechenden Messgeräten. Die Verhaltensmessung dauert je nach Endpunkt nur wenige Minuten und ermöglicht damit einen hohen Durchsatz. Durch verschiedene Verhaltensendpunkte werden unterschiedliche ökologisch relevante Parameter betrachtet wie beispielsweise die lokomotorische Aktivität, die Phototaxis, die räumliche Orientierung, Schreckreaktionen oder Vermeidungsverhalten. Durch das Versuchsdesign können auch Nicht-Standardorganismen, wie z.B. *A. aquaticus*, gut untersucht werden. Dem ist gegenüberzustellen, dass die Datenlage zu Verhaltensendpunkten gerade für Nicht-Standardorganismen wie z.B. *A. aquaticus* mangelhaft ist. Zudem lässt sich nicht zuverlässig ein sensitivster Endpunkt für jede Spezies festlegen, da sich in vorherigen Studien gezeigt hat, dass der sensitivste Parameter von unterschiedlichen Faktoren, u.a. der Temperatur, dem Fütterungszustand und der Testsubstanz, abhängig sein kann (Saalman et al., in preparation). Aufgrund hoher Variabilitäten sowohl in den Verhaltensendpunkten als auch in den Kontrollen sind standardisierte Testbedingungen zwingend erforderlich (Bertram et al., in review). In der Literatur finden sich sowohl methodische Mängel bzw. mangelhafte Standards als auch unstandardisierte Nomenklaturen (Soose et al., 2023; Bownik, 2017; Faimali et al., 2017), welche die Vergleichbarkeit verschiedener Verhaltensendpunkte und Studien erschwert. Hinzu kommt, dass einige Verhaltensparameter keine klassische Konzentrations-Wirkungsbeziehung zeigen und daher eine Interpretation der Daten erschwert wird und Expertenwissen erfordert. Diese Problematiken werden mit den gerade entwickelten EthoCRED Richtlinien (Bertram et al., in review) adressiert.

4. Fazit

Bei Abwägung der Chancen und Grenzen von Verhaltensassays kann der Schluss gezogen werden, dass Verhaltensendpunkte als zusätzlicher Endpunkt zu den klassischen Endpunkten der OECD Testrichtlinien in Betracht gezogen werden sollten. Dabei sollen die klassischen Endpunkte keinesfalls ersetzt werden, jedoch können die Verhaltensendpunkte eine sensitivere und realistischere Ableitung von Effekten gestatten und ermöglichen eine Extrapolation auf Populations- oder Ökosystemebene. Eine breitere Datenlage wäre in den Bereichen Standardisierung von Testbedingungen, Auswertungen und Interpretation, Variabilität der Kontrollgruppe und Expositionsgruppen sowie den Möglichkeiten zur Extrapolation der Daten und Mode of Action-Spezifität der Effekte nötig. Um die Reproduzierbarkeit der Endpunkte unter verschiedenen Bedingungen, mit verschiedenen Messgeräten bzw. in verschiedenen Laboratorien zu überprüfen, könnten in Zukunft bspw. Ringversuche durchgeführt werden. Insgesamt können die Verhaltensendpunkte als vielversprechender zukünftiger

Endpunkt, zusätzlich zu den klassischen Endpunkten der ökotoxikologischen Tests, betrachtet werden.

Literaturverzeichnis

- Azevedo-Pereira, H. M. V. S.; Lemos, M. F. L.; Soares, A. M. V. M. (2011): Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: linking acetylcholinesterase activity to behaviour. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (5), S. 1210–1215. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2011.03.018.
- Bertram, M.G., Ågerstrand, M., Thoré, E.S.J., Allen, J., Balshine, S., Brand, J.A., Brooks, B.W., Dang, Z., Duquesne, S., Ford, A.T., Hoffmann, F., Hollert, H., Jacob, S., Kloas, W., Klüver, N., Lazorchak, J., Ledesma, M., Maack, G., Macartney, E.L., Martin, J.M., Melvin, S.D., Michelangeli, M., Mohr, S., Padilla, S., Pyle, G., Saaristo, M., Sahm, R., Smit, E., Steevens, J.A., Van den Berg, S., Vossen, L.E., Wlodkowic, D., Wong, B.B.M., Ziegler, M., Brodin, T.: EthoCRED: A framework to guide reporting and evaluation of the relevance and reliability of behavioural ecotoxicity studies. In: *In review*.
- Bjelke, U. L.F.; Herrmann, J. A.N. (2005): Processing of two detritus types by lake-dwelling shredders: species-specific impacts and effects of species richness. In: *Journal of Animal Ecology* 74 (1), S. 92–98. DOI: 10.1111/j.1365-2656.2004.00901.x.
- Bownik, A. (2017): Daphnia swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. In: *The Science of the Total Environment* 601-602, S. 194–205. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.199.
- Calizza, E.; Rossi, L.; Costantini, M. L. (2013): Predators and resources influence phosphorus transfer along an invertebrate food web through changes in prey behaviour. In: *PloS one* 8 (6), e65186. DOI: 10.1371/journal.pone.0065186.
- Faimali, M.; Gambardella, C.; Costa, E.; Piazza, V.; Morgana, S.; Estévez-Calvar, N.; Garaventa, F. (2017): Old model organisms and new behavioral end-points: Swimming alteration as an ecotoxicological response. In: *Marine Environmental Research* 128, S. 36–45. DOI: 10.1016/j.marenvres.2016.05.006.
- Fent, K. (1998): Ökotoxikologie. Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie. Stuttgart: Thieme.
- Hussain, A.; Audira, G.; Malhotra, N.; Uapipatanakul, B.; Chen, J.-R.; Lai, Y.-H. et al. (2020): Multiple screening of pesticides toxicity in zebrafish and daphnia based on locomotor activity alterations. In: *Biomolecules* 10 (9). DOI: 10.3390/biom10091224.
- Main, A. R.; Headley, J. V.; Peru, K. M.; Michel, N. L.; Cessna, A. J.; Morrissey, C. A. (2014): Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's Prairie Pothole Region. In: *PloS one* 9 (3), e92821. DOI: 10.1371/journal.pone.0092821.

- O'Callaghan, I.; Harrison, S.; Fitzpatrick, D.; Sullivan, T. (2019): The freshwater isopod *Asellus aquaticus* as a model biomonitor of environmental pollution: A review. In: *Chemosphere* 235, S. 498–509. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.217.
- Pohnert, G. (2019): Finding the fish factor. In: *eLife* 8. DOI: 10.7554/eLife.48459.
- Saalmann V.F., Germing K., Ringbeck B., Kosak L., Eilebrecht E.: Behavioral endpoints and generational effects in *Daphnia magna* upon short- and long-term exposure and their use as additional endpoint in ecotoxicological risk assessment. In preparation.
- Soose, L. J.; Hügl, K. S.; Oehlmann, J.; Schiwy, A.; Hollert, H.; Jourdan, J. (2023): A novel approach for the assessment of invertebrate behavior and its use in behavioral ecotoxicology. In: *The Science of the Total Environment* 897, S. 165418. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.165418.

Korrespondenzadresse

Dr. Lena Kosak
Fraunhofer Institut für Mikrobiologie und angewandte Ökologie
IME
Auf dem Aberg 1
D – 57392 Schmallenberg
Email: lena.kosak@ime.fraunhofer.de