



... Ach wüßtest du, wie's Fischlein ist, so wohligh auf dem Grund ... (Goethe)
 Wie wohl es den Fischen ist, fragen sich seit einigen Jahren nicht nur die Fischer, sondern auch die Gewässerschutzfachleute und Wissenschaftlerinnen: Abnehmende Fischfangerträge, Fische mit Leber- und Nierenerkrankungen machen Schlagzeilen. Welche Ursachen liegen den Fangertragsrückgängen zugrunde? Wodurch werden die Organschäden bei unseren Fischen verursacht? Besteht ein Zusammenhang mit den vielen Umweltchemikalien, die tagtäglich mit dem Abwasser oder diffus, von den Straßen und Feldern, in die Flüsse gelangen? Oder ist die Kanalisierung und der durch viele Staustufen unterbrochene Lauf der Flüsse für die Fische Stress genug, um krank zu werden und aus ihren angestammten Lebensräumen zu verschwinden? Spielt gar die vielbeschworene Klimaveränderung eine Rolle? Wie diese Fragen angegangen werden können, wird in diesem Artikel aufgezeigt: Den Fisch selbst als Indikator für Veränderungen in seiner Umwelt einzusetzen, bedeutet, seine Reaktionen, sei es in freier Wildbahn oder im Laboratorium, gezielt zu untersuchen und Fragen zu stellen, die Aufschluß über die zugrundeliegenden Mechanismen geben und Hinweise auf Ursachen liefern. **Abstract & Keywords** ⇨ p. 78

Der Fisch – wie läßt er sich als Indikator für die Qualität seiner Umwelt einsetzen?

Patricia Burkhardt-Holm*

1. Warum Fische als Bioindikatoren einsetzen?

Seit einigen Jahren wird ein deutlicher Rückgang der Fischfangerträge in vielen Ländern beobachtet. In der Schweiz haben die Forellenfangerträge in den letzten 10–20 Jahren um mehr als 40 Prozent abgenommen^[1]. Besonders betroffen ist das dicht besiedelte Mittelland, wo sich die Problemfaktoren konzentrieren. Studien über die Fischgesundheit wiesen mittlere bis starke Beeinträchtigungen nach, hauptsächlich aufgrund von Organschäden. Dies wurde vor allem bei Fischen in Gewässerabschnitten festgestellt, die anthropogen beeinflusst sind.

50 000–70 000 chemische Substanzen sind zur Zeit auf dem Markt. Die meisten gelangen früher oder später in das Abwasser und, wegen der meist ungenügenden Abbaubarkeit in den Kläranlagen, in die freien Gewässer. Dort liegen sie entweder in Form der Ausgangsstoffe oder als Metaboliten mit

größtenteils unbekanntem Eigenschaften vor. Die beobachteten Veränderungen in den Organen der Fische sind nicht selten unterhalb von Kläranlagen stärker ausgeprägt als oberhalb, so daß der Verdacht auf eine Beteiligung der gereinigten Klärwässer an den Organschädigungen naheliegt. Die große Anzahl potentiell in Frage kommender Substanzen, ihr räumlich und zeitlich inkonstantes Verteilungsmuster, sowie mögliche additive, synergistische oder antagonistische Wirkungen erschweren die Untersuchung erheblich. Darüber hinaus geben chemische Analysen keinen Hinweis, ob die Substanzen im Organismus den beobachteten Effekt ausüben. Außerdem kann eine Anreicherung über das Wasser oder die Nahrungskette, sowie eine Modifizierung der Aufnahme und/oder der Wirkung anderer Stressoren physikalischer (zum Beispiel: Temperatur), chemischer (Huminsäuren, Carbonatgehalt) oder biologischer Art (pathogene Keime) den Effekt im Organismus beeinflussen. Deshalb ist es wichtig, den Fisch als Indikator heranzuziehen und im Fisch solche Parameter zu studieren, die möglichst früh, sensitiv und verlässlich auf die verdächtigen Stoffe reagieren.

Als *Bioindikator* wird ein Organismus bezeichnet, dessen Empfindlichkeit aus-

reicht, um selektiv Veränderungen in seiner Umwelt aufzudecken (Exkurs 1). Doch welche Parameter sind sinnvollerweise an diesen Bioindikatoren zu untersuchen? Jeder Stress, gleich ob physikalischer, chemischer oder biologischer Art, greift zunächst auf der molekularen Ebene an. Daraus resultierende Effekte wirken sich auf die höheren Ebenen der biologischen Organisation aus, also nacheinander auf Zellen, Organe oder schließlich den Gesamtorganismus und noch die Population (Figur 1). Molekulare Effekte sind meist die sensitivsten und zeigen sich rasch, oft bereits nach Minuten. Ihre ökologische Bedeutung ist jedoch eher gering, da molekulare Effekte durch Reparatur- oder Schutzmechanismen – wie Enzyme, die DNA-Schäden reparieren, oder Zellen des Immunsystems – rückgängig gemacht oder kompensiert werden können. Messungen auf der Ebene der Population haben eine sehr viel höhere ökologische Relevanz, es dauert aber vergleichsweise lange, bis sie sich manifestieren. Die Herleitung einer durchweg kausalen Beziehung ist deshalb und wegen der vielen, gleichzeitig wirkenden Faktoren selten möglich.

Um abzuschätzen, ob der Fisch durch äußere Stressoren beeinträchtigt wird, ist es daher vorteilhaft, eine Kombina-

*Postadresse : PD Dr. P. Burkhardt-Holm
 Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung,
 Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG)
 Überlandstrasse 133
 CH-8600 Dübendorf (Schweiz)

E-Mail: patricia.holm@eawag.ch
<http://www.fischnet.ch>

Exkurs 1

Bioindikatoren – hilfreiche Organismen in der Umweltbeobachtung

Alle Lebewesen reagieren auf Veränderungen in ihrer Umwelt. Als Bioindikatoren werden solche Organismen – oder Organismengemeinschaften – ausgewählt, die besonders sensitiv und/oder schnell reagieren. Ihre Reaktion kann deshalb stellvertretend zur Beurteilung der Beeinträchtigung aller Lebewesen in einem Ökosystem herangezogen werden. Sie geben damit Hinweise auf den Zustand des Ökosystems. Bioindikatoren sollten idealerweise folgenden Anforderungen genügen:

- leichte Handhabbarkeit und geringe Wartung der Halterungsanlagen;
- Standardisierbarkeit;
- weitgehende Kenntnis der Reaktionsbedingungen;
- geringe Kosten;
- Offensichtlichkeit, Auswertbarkeit und Quantifizierbarkeit des Signals;
- genetische Einheitlichkeit.

Bioindikatoren können so zur Umweltüberwachung (Biomonitoring) benutzt werden. Dabei sind zwei Ansätze zu unterscheiden. Im *passiven Biomonitoring* wird die Umwelt mit Blick auf die vor vorhandenen Bioindikatoren überwacht. Als Beispiel sei der Saprobienindex erwähnt, welcher auf dem Indikatorwert der in Fließgewässern vorhandenen Wirbelosengemeinschaften basiert. Je nach Ausmaß der Belastung mit leicht abbaubaren organischen Stoffen (wie sie etwa in Abwässern enthalten sind), kann eine Einordnung in Gewässergüteklassen vorgenommen werden.

Im *aktiven Biomonitoring* werden ausgewählte Indikatoren an den Untersuchungsstellen ausgesetzt. So werden zum Beispiel Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) zur Überwachung der Wasserqualität der Meeresküsten eingesetzt.

Bioindikatoren reagieren,

(1) indem sie beispielsweise schädliche Stoffe aufnehmen und anreichern, und diese Anreicherung sodann als Signal nachgewiesen wird (*Akkumulationsindikatoren*). Ein Beispiel sind die erwähnten Miesmuscheln der Küstengewässer, deren Schwermetallgehalte gemessen werden;

(2) indem die aufgenommenen Stoffe eine Wirkung auf die Lebensfunktionen oder das Aussehen, die Struktur der Indikatoren ausüben (*Reaktionsindikatoren*). Ein Beispiel hierfür sind die im Text vorgestellten Forellen, die durch endokrin aktive Stoffe in ihren Reproduktionsfunktionen beeinträchtigt werden.

2. Beispiele für erfolgversprechende Ansätze

Die gewählten Untersuchungsansätze und Biomarker (Exkurs 2) sollen die dargelegten Umstände möglichst gut berücksichtigen. Für eine Auswahl verschiedener Anforderungen werden in diesem Artikel Beispiele vorgestellt:

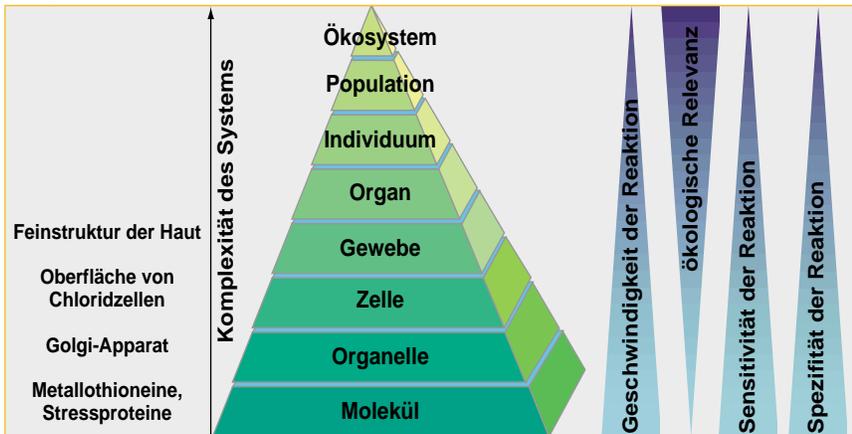
- Schnelle, sensitive Reaktion → aufgezeigt am Beispiel der Biomarker "Stressproteine" und "Ultrastruktur der Haut".
- Hinweis auf Ursachen → Beispiel der spezifischen Biomarker "Metallothioneine" und "Vitellogenin".
- Hinweis für Gründe von Populationsveränderungen → Beispiel des Untersuchungsansatzes "Kombination von Biomarkern".
- Reduktion von Tierversuchen → am Beispiel der "Zell- und Gewebekultur".

Stressproteine, ein Schutz für die gestresste Zelle

Stressproteine, früher auch als Hitzeshockproteine bezeichnet, wurden in allen bisher untersuchten Organismen gefunden, von Bakterien bis hin zum Menschen. Unter physiologischen Bedingungen werden diese Proteine in geringer Menge gebildet und helfen beim intrazellulären Transport und bei der Faltung neusynthetisierter Proteine. Unter ungünstigen Umweltbedingungen, wie erhöhte Temperatur, Sauerstoffmangel, Belastung durch Schwermetalle oder Umwelchemikalien, können vermehrt aberrante Proteine gebildet werden. Stressproteine werden dann in größerer Menge produziert und helfen zum Beispiel bei der Reparatur oder der Elimination dieser geschädigten Proteine und schützen so die anderen Zellproteine. Allerdings variiert die Bildung der Stressproteine je nach herrschenden Randbedingungen, wie Jahreszeit, Immunstatus des Tieres und anderem mehr. Bevor diese Proteine als Biomarker bei Fischen unter Freilandbedingungen verwendet werden können, muß geklärt sein, ob Unterschiede zwischen den Organen und auch Zelltypen bestehen, wie schnell die Stressproteine auf eine Veränderung in der Umwelt reagieren und ob diese Reaktion anhält und folglich auch länger nach Beendigung der Einwirkung abzulesen ist.

Unsere Fragestellung war daher, ob der Fisch auf eine Erhöhung der Wassertemperatur mit der Bildung von Stressproteinen reagiert, wie schnell das passiert – und wieder rückgängig gemacht

Beispiele für Biomarker



Figur 1. Pyramide der biologischen Hierarchie – mit den beim Bioindikator Bachforelle verwendeten Biomarkern.

tion von sehr sensitiven, schnell reagierenden Parametern und solchen zu wählen, die eine höhere ökologische Relevanz haben. Die Suche nach dem fraglichen Stressor wird erschwert durch die Tatsache, daß der Fisch meist nicht spezifisch auf die meisten auslösenden Faktoren reagiert. Noch am ehesten sind es auch hier wieder Parameter auf

der molekularen Ebene, die spezifisch für Substanzen oder Stoffgruppen sind.

Ziel der hier im Überblick geschilderten Arbeit war es, ein Set von Parametern zusammenzustellen, die das Ausmaß der Veränderungen in den Fischen schnell und zuverlässig erfassen und die Vielfalt der potentiell ursächlichen Faktoren einengen können.

Exkurs 2

Biomarker – ein Werkzeug in der Umweltforschung und Ökotoxikologie

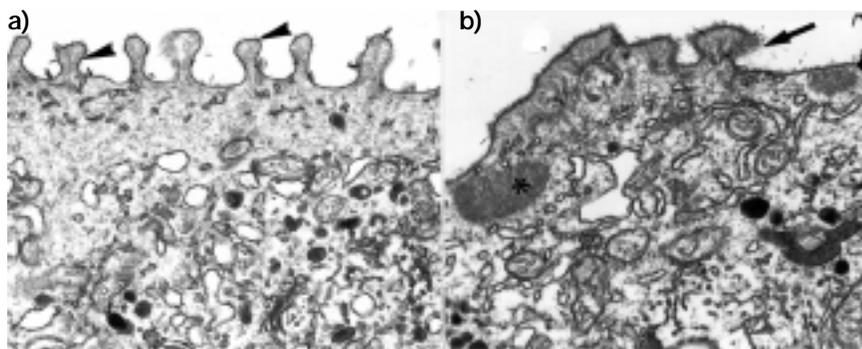
Als Biomarker werden Meßparameter bezeichnet, die Veränderungen in Organismen anzeigen, entweder infolge einer Exposition oder als Effekt von Umweltchemikalien in subletalen Konzentrationen. Biomarker können in Bezug auf ihre Spezifität klassifiziert werden: Reaktionen spezifischer Biomarker zeigen klar die Anwesenheit biologisch signifikanter Mengen einer bestimmten Chemikalie oder einer Gruppe von Chemikalien an. So weiß man zum Beispiel, daß polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) und polychlorierte Biphenyle (PCB) in Fischen bestimmte Entgiftungsenzyme in der Leber (Cytochrom-P450-Oxidasen) spezifisch induzieren. Nicht-spezifische Biomarker weisen auf die Anwesenheit von Stressoren hin, lassen aber keine Aussage über deren Natur zu.

Im Unterschied zu chemischen Analysen werden mit Biomarkern fragliche Substanzen nur dann erfaßt, wenn sie auch im Organismus aufgenommen wurden und dort wirken. Biomarker integrieren die Reaktionen der Organismen über Zeit und Raum und ermöglichen es, Wechselwirkungen zwischen Stoffen sowie zwischen Stoffen und anderen Umweltfaktoren zu erfassen.

Darüber hinaus geben Biomarker oft Hinweise auf die dem beobachteten Effekt zugrundeliegenden Mechanismen.

wird, und ob es zwischen Kieme und Haut, beides Organe, die ständig und unmittelbar dem Wasser ausgesetzt sind, Unterschiede bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit und der Regenerationsfähigkeit gibt. Hierfür wurde die kältelebende Bachforelle herangezogen, die in Bächen und Flüssen Europas heimisch ist und einen Temperaturbereich zwischen 12 und 17°C bevorzugt, aber Sommertemperaturen bis 20°C hinnimmt. Für den Versuch wurden Forellen von einer Ausgangstemperatur von 8°C in Wasser einer Temperatur von 19°C umgesetzt. Nach zwei Stunden wurde dann ein Teil der Tiere untersucht, die übrigen Fische wurden wieder auf die Ausgangstemperatur gesetzt und nach 24 oder 48 Stunden untersucht. Haut und Kieme wurden präpariert, und der Gehalt an einem bestimmten Stressprotein mit dem Molekulargewicht 70 kDa (HSP 70) wurde mit einem Antikörper detektiert und mengenmäßig ermittelt. In beiden Organen war die Menge von Stressproteinen nach zwei

Stunden signifikant angestiegen. In der Haut blieb die Konzentration von HSP 70 auch nach zwei Tagen auf diesem Niveau, während sie in der Kieme bereits nach einem Tag wieder abnahm [2]. Die Gesamtmenge war in der Kieme höher als in der Haut. Die Menge von Stressproteinen reagiert sehr schnell, innerhalb von Minuten bis Stunden, auf Veränderungen. Die Induzierbarkeit ist ebenso wie die Geschwindigkeit der Regeneration jedoch gewebsspezifisch unterschiedlich. Eine mögliche Erklärung könnten Unterschiede in Aufbau und Funktion der beiden Organe sein: Die schnelle Zurückregulation in der Kieme könnte generell mit einer besseren Regeneration zusammenhängen. Auch die Zellteilungsrate und die Zellerneuerung sind in der Kieme mit dem nur zweischichtigen Epithel höher als in der mehrschichtigen Haut. Für das hochaktive Organ des Gas- und Ionenaustauschs sind sehr effiziente Mechanismen zur Erhaltung und Wiederherstellung der Membranintegrität er-



Figur 2. Ein Ausschnitt der Forellenhaut unter dem Elektronenmikroskop: (a) Im Kontrollier ist an der Hautzelle ein regelmäßiger Saum von Mikrofalten ausgebildet (Pfeilspitzen), und unter der Zelloberfläche sind nur spärlich Strukturen sichtbar. – (b) Nach einer zweistündigen Temperaturerhöhung zeigt die Zelloberfläche ein anderes Muster (Pfeil: Mikrofalte), und Filamente unter der Zelloberfläche haben sich zu Aggregaten verdichtet (*).

forderlich. Solche gewebsspezifischen Unterschiede müssen je nach Fragestellung bei der Versuchsanordnung berücksichtigt werden.

Stressproteine sind demnach Biomarker, die sich auch in Haut und Kieme bei Fischen finden und für Umweltuntersuchungen benützen lassen. Jahreszeitlich unterschiedliche Variationen im Stressproteingehalt wurden auch in anderen Freilanduntersuchungen beschrieben und müssen im Versuchsdesign die nötige Aufmerksamkeit erhalten.

Die Ultrastruktur der Haut, auch sie ein temperatursensibler Anzeiger

Wie bei Säugetieren ist auch die Haut von Fischen mehrschichtig, aber unverhornt. Sie reagiert wie andere Organe sensitiv auf äußere Einflüsse. In dem vornerwähnten Temperaturversuch war ebenfalls bereits nach zwei Stunden die Bildung bestimmter Strukturen in den obersten Hautzellen der Forellen zu beobachten [3]. Es handelt sich dabei um die Aggregation von Filamenten, feinen Stützstrukturen in der Zelle (Figur 2), die sich unter den Erholungsbedingungen innerhalb eines Tages vollständig zurückbildeten. Sie waren früher nach Kälteschocks bei Fischen beobachtet worden, so daß vermutlich nur Temperaturveränderungen in Organismen diese Ansammlungen auslösen. Sie sind wohl als Schutzreaktion einzustufen, bei der andere, schützende Proteine aktiviert und Stressproteine produziert werden. Dementsprechend könnte es sein, daß ihr Auftreten und dann wiederum ihr Verschwinden der Beeinträchtigung anderer zellulärer Strukturen und Bestandteile vorausseilt.

Ultrastrukturelle Veränderungen können demnach ebenfalls als schnell reagierende Parameter benützt werden, im geschilderten Fall waren sie zudem spezifisch für die Art des Stressors.

Metallothioneine, die Fänger der Schwermetalle

Am Fluß Langeten im Kanton Bern haben sich die Fischer seit langem über die abnehmende Fischdichte beklagt, obschon dort jedes Jahr junge Forellen ausgesetzt werden und die Lebensräume relativ naturnah sind (Figur 3). Der Ursache wollten wir im Rahmen einer breit angelegten Studie auf den Grund gehen. Ein möglicher Einfluß gereinigten Abwassers bestimmter Kläranlagen sollte gegen Faktoren abgegrenzt werden, die nur im Fluß selber, unabhängig von der Kläranlage wirken. Dafür wurden

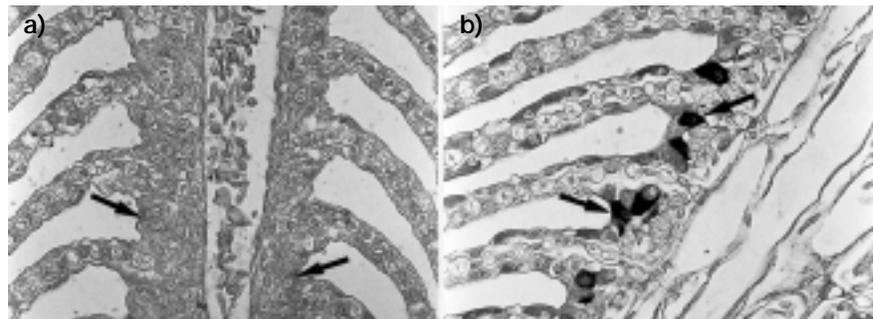


Figur 3. Die Langeten bei Roggwil (Kanton Bern).

Forellen in mit Trinkwasser verdünntem Abwasser einer Abwasserreinigungsanlage (ARA) gehältert und mit solchen verglichen, die acht Kilometer weiter unterhalb der ARA im Flußwasser exponiert waren. In beiden Gruppen konnten wir Veränderungen der inneren Organe beobachten, die jedoch bei den Fischen im ARA-Abwasser längst nicht so ausgeprägt waren wie bei denen im Fluß^[4, 5]. Andererseits wiesen chemisch-analytische Messungen auf erhöhte Zinkgehalte im Abwasser einer Kläranlage und im Flußsediment hin: Wir untersuchten daraufhin als Biomarker metallbindende Proteine, sogenannte Metallothioneine. Diese Proteine stellen den Angriffspunkt für die toxische Wirkung von Metallen dar, und sie werden bei Belastung mit bestimmten Schwermetallen induziert. Für den Nachweis mittels spezifischer Antikörper wurde die Kieme ausgewählt, da sie einerseits das Organ ist, wo die Aufnahme von Schwermetallen aus dem Wasser hauptsächlich stattfindet, und andererseits das Zielorgan für Schwermetalltoxizität bei Süßwasserfischen. In der Kieme ist ein bestimmter Zelltyp, die für die Ionen- und Osmoregulation zuständige Chloridzelle, der Ort der Metallothionein-Bildung. Die Kieme war bisher in derartigen Studien vernachlässigt worden, da biochemische Analysen an homogenisierten Gewebeproben keine klaren Hinweise auf eine Induktion erbrachten – was nicht ver-

wunderlich ist, wenn man weiß, daß die Chloridzellen nur 10–15 Prozent der gesamten Kiemenepithelzellen ausmachen. In Forellen, die im aufbereiteten und verdünnten Abwasser der Kläranlage über mehrere Monate gehältert worden waren, fanden wir sehr viele Chloridzellen mit einer Metallothionein-Induktion. Diese hatten sich auch nach einer dreimonatigen Erholungsphase im Trinkwasser kaum normalisiert. An Forellen hingegen, die acht Kilometer unterhalb der ARA-Einleitstelle gehältert worden waren, wurden ähnlich niedrige Werte wie bei den als Kontrollgruppe nur im Trinkwasser stationierten Tieren gemessen (Figur 4)^[6]. Daraus schließen wir, daß die Belastung im Verlauf des Flusses auf ein für die Tiere nicht mehr schädliches Maß abnimmt. Die Abnahme der Forellenpopulation ist vermutlich auf andere Ursachen zurückzuführen.

Die Synthese von Metallothioneinen in Chloridzellen ist als ein sensitiver, zelltyp-spezifischer Biomarker anzusehen und zeigt sowohl die Aufnahme von Metallen in den Fisch als auch die Schädigung der Zellen durch das Schwermetall an. Da viele Metalle über die gleichen Transportsysteme der Zellmembran ins Zellinnere gelangen wie das lebensnotwendige Calcium, kommt es in Gewässern mit hohem Carbonatgehalt zu einer Konkurrenz bei der Aufnahme in die Zelle. Dies ist ein Aspekt, der auf die große Bedeutung gegebener chemisch-physikalischer Parameter im Ökosystem hinweist, die modulierenden Charakter für die Toxizität von Schadstoffen haben. Unser Versuch zeigt exemplarisch die Notwendigkeit der interdisziplinären Zusammenarbeit (hier zwischen Chemie und Biologie) bei der Ursachensuche von Umweltbelastungen.



Figur 4. Ein Ausschnitt der Forellengieme unter dem Mikroskop nach Markierung mit einem Antikörper gegen Metallothioneine: Chloridzellen sind nach Hälterung des Fisches im Flußwasser nicht markiert (a: Pfeile), nach Exposition in mit Trinkwasser verdünntem gereinigtem Kläranlagenwasser jedoch deutlich positiv (b: Pfeile) und zeigen so eine Schwermetallbelastung an.

Exkurs 3

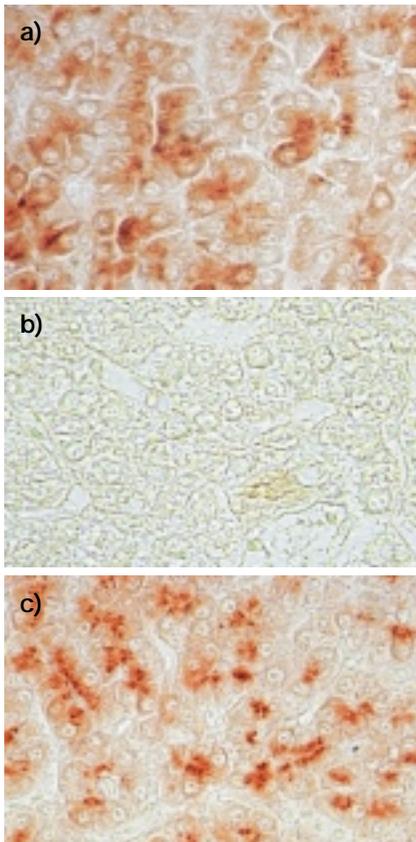
Früher – heute

Früher: »Die Klagen über eine Abnahme des Fischbestandes sind fast so alt wie die Fischerei selbst. Es läßt sich nicht bestreiten, daß diese Klagen, soweit sie die Flüsse betreffen, nie berechtigter waren als in der Neuzeit, und wenn wir untätig zusehen, werden sie sich inskünftig noch mehr.« – Zitat aus der *Schweizerischen Fischereizeitung* vom 12. März 1899 (Sportfischerverein Bern).

Heute werden die Anglerfänge in der Schweiz durch die Kantone erfaßt und statistisch ausgewertet, einzelne Kantone haben jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit der Registrierung begonnen (zwischen 1970 und 1996), Graubünden führt im Moment noch keine Statistik. Da zwischen den Kantonen Unterschiede in der Erfassung und bei der Bearbeitung der Daten bestehen, und außerdem die Anzahl der einbezogenen Gewässer und Fischarten im Erfassungszeitraum oft ansteigt, ist die Vergleichbarkeit sowie die absolute Aussage mit Ungewißheiten behaftet. Nun geben die Anglerfänge nur einen Aspekt des tatsächlichen Fischbestandes wieder, da die Fänge durch Neubesätze teilweise kompensiert werden können und durch die Anzahl der Angler, deren Fangverhalten und anderes mehr mitbeeinflusst werden. Eine Bestandese Erfassung erfordert exakte Angaben über die Fischdichte und Fischbiomasse. Gut kann dies mit standardisierten Methoden der Elektrofischerei in kleinen und mittelgroßen Fließgewässern erhoben werden. Für größere, nicht mehr durchwatbare Flüsse liefern Befischungen nur noch punktuelle Aussagen. Diese Methoden sind jedoch sehr zeit- und personalaufwendig, brauchen Gerätschaften und Know-how, so daß nur für wenige, ausgewählte Gewässer und hier wiederum für kurze Teilstrecken gute Daten über den tatsächlichen Fischbestand vorliegen. Die aus den Fangstatistiken abgeleiteten Trends müssen anhand selektiver Elektrobefischungen auf ihre Bedeutung für die Fischbestände überprüft werden.

Hormone im Wasser wirken auch auf Fische

Zuerst aus England, dann bald auch aus anderen Ländern kamen Meldungen über männliche Fische mit Anzeichen einer Verweiblichung, die besonders häufig unterhalb von Kläranlagen beobachtet wurden. So waren bei männlichen Rotaugen Eizellen oder Eibildungsstadien in den Hoden zu finden, sogenannte Ovotestis. Unterhalb einiger englischer Kläranlagen betraf dies bis zu 100 Prozent der Tiere. Der Verdacht, daß Stoffe mit hormonartiger Wirkung solche Veränderungen auslösen, wurde bestätigt: Sowohl natürliche und künstliche Östrogene aus menschlichen und tierischen Ausscheidungen als auch Industriechemikalien, etwa Alkylphenol-



Figur 5. Ein Ausschnitt der Forellenleber unter dem Mikroskop nach Markierung mit einem Antikörper gegen Vitellogenin: (a) Leberzellen in einer weiblichen, geschlechtsreifen Bachforelle produzieren dieses Dotterprotein, das als braunrötliche Färbung erkennbar ist. – (b) In männlichen Forellen wird dieses Protein nicht gebildet, der Nachweis ist negativ. – (c) In diesem männlichen Tier, das unterhalb einer Kläranlage gefangen wurde, kann Vitellogenin jedoch nachgewiesen werden. Das ist ein Hinweis auf eine Belastung mit Östrogenen oder östrogenartig wirkenden Stoffen.

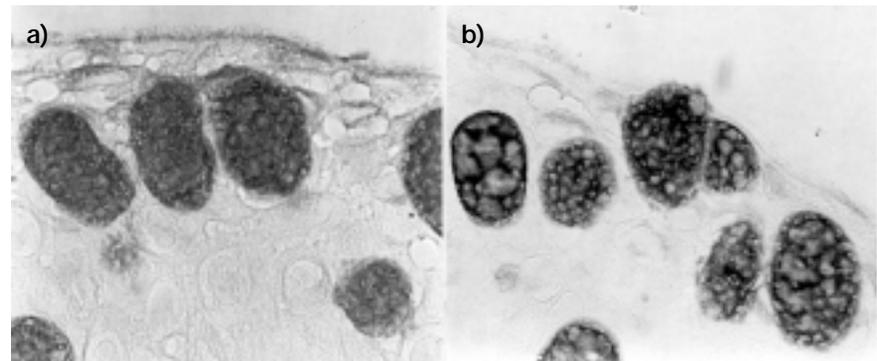
ethoxylate, Phthalate und Bisphenole, wie sie in Farben, Plastikweichmachern und Reinigungsmitteln verwendet werden, können bereits in sehr niedrigen Konzentrationen (Bereich: Nanogramm bis Mikrogramm pro Liter) in das Fortpflanzungsgeschehen bei Mensch und Tier eingreifen.

Ob derartige Veränderungen auch bei Fischen in Schweizer Gewässern auftreten? Wir haben daraufhin zunächst Bachforellen von oberhalb und unterhalb 36 ARA-Einleitungen in der Schweiz untersucht. Ein sehr sensibler und spezifischer Biomarker für einen Effekt östrogenaktiver Substanzen ist das Vitellogenin. Dieses Dotterprotein wird von allen eierlegenden, weiblichen Wirbeltieren bei Geschlechtsreife gebildet, und sein Nachweis in männlichen und jungen Tieren ist ein Hinweis auf die Wirkung von Östrogenen oder östrogenartig wirkenden Stoffen. Unterhalb von vier Kläranlagen konnten wir dieses Dotterprotein in männlichen Forellen nachweisen (Figur 5) [7]. Das ist ein deutliches Anzeichen für das Vorkommen solcher Stoffe im Gewässer. Wegen versuchstechnischer Einschränkungen konnte jedoch nicht die empfindlichste Methode angewendet werden, so daß mit einer gewissen Dunkelziffer gerechnet werden muß. Noch laufen Untersuchungen über Herkunft und Art der Substanzen, doch wir vermuten, daß sie über die Abwasserreinigungsanlagen in die Vorfluter gelangt sind.

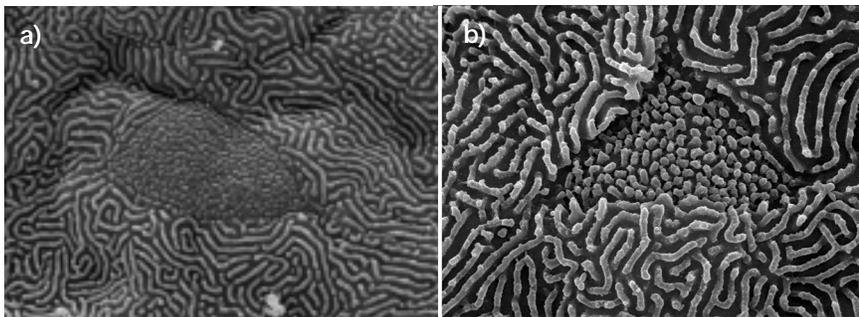
Eine der fraglichen Substanzen mit östrogenartiger Wirkung ist Nonylphenol (NP). Das ist ein Abbauprodukt der Alkylphenolethoxylate (APEO) und wird trotz der seit 1986 gültigen Stoffverordnung, die deren Verwendung in Haushaltsreinigern und Textilwaschmitteln verbietet, noch immer in gereinigten Abwässern von Kläranlagen in der Schweiz gefunden (2–8 µg/L) [8]. Die

nachgewiesenen Konzentrationen reichen aus, um im Tierversuch deutliche Veränderungen bei der Fortpflanzung von Fischen zu bewirken. Seine Herkunft ist schwierig zu eruieren, da nur noch geringe Mengen hierzulande in Umlauf sind [9].

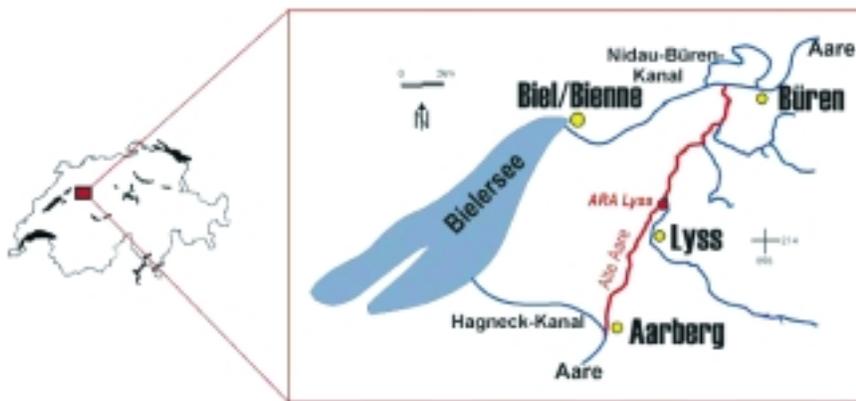
Darum haben wir in Laborstudien die Wirkung auf die Forelle genauer untersucht. Östrogene sind nicht nur direkt im Fortpflanzungsgeschehen involviert, sondern man weiß auch, daß sie die Struktur der Fischhaut verändern. Ob auch Nonylphenol eine Wirkung auf die Fischhaut hat, sollte ein Versuch in Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Landesamt für Wasserforschung zeigen. Forellen wurden dabei für unterschiedlich lange Zeiten zwei Konzentrationen von Nonylphenol ausgesetzt (1 µg/L und 10 µg/L). Neben anderen Effekten beobachteten wir hiernach charakteristische Veränderungen in den Schleimzellen der Fischhaut (Figur 6). Da Nonylphenol in den Calcium-Stoffwechsel der Fische eingreift und andererseits die Bildung von Vitellogenin alle verfügbaren Calcium-Speicher im Tier mobilisiert, ist ein Zusammenhang mit den festgestellten Veränderungen naheliegend: Sowohl in den Schleimzellen als auch im abgegebenen Schleim der Haut und in den Schuppen, die sich beim Fisch in Hauttaschen befinden, speichert der Fisch Calcium. Dieser erhöhte Calcium-Bedarf und die entsprechende Mobilisierung wird bestätigt durch einen kürzlich erhobenen Befund an der Kieme: Hier ist es wiederum die Chloridzelle, die mit einer zahlenmäßigen Zunahme und einer Vergrößerung ihrer Oberfläche – und damit der Fläche, die für eine aktive Ionenaufnahme aus dem Wasser zur Verfügung steht – reagiert (Figur 7). Beide Phänomene sind auch bei Fischen zu beobachten, die in calciumarmem Wasser gehalten werden.



Figur 6. Ein Ausschnitt der Forellenhaut unter dem Mikroskop: Schleimzellen zeigen bei Kontrolltieren (a) eine feinkörnige Granulierung, nach Nonylphenol-Exposition (10 µg/L über 4 × 10 Tage) ein sehr grobkörniges Granulierungsmuster.



Figur 7. Die Kieme von Forellen unter dem Rasterelektronenmikroskop. Ihre für die Atmung zuständigen Zellen zeigen ein netzförmiges Faltenmuster. – (a) Die dazwischen befindliche Chloridzelle weist bei diesem Tier nach Hälterung in Trinkwasser eine Oberfläche mit nur kurzen Noppen auf. – (b) Nach Nonylphenol-Exposition (10 µg/L über 4 × 10 Tage) sind viele Chloridzellen durch längere, fingerförmige Fortsätze gekennzeichnet, wodurch die Zelloberfläche vergrößert wird (Photo: M. Stoffel).



Figur 8. Verlauf der Alten Aare von Aarberg bis in den Nidau-Büren-Kanal und Lage der Kläranlage Lyss (Graphik: D. Bernet).

Kombination von Biomarkern – eine Möglichkeit, um die Aussagekraft der Reaktion von Indikatoren zu steigern

An der Alten Aare (Kanton Bern; Figur 8) kennt man seit Jahren sogenannte schwarze Forellen, besonders im Sommer treiben häufig apathische, dunkel verfärbte Tiere an der Oberfläche des Gewässers. Und auch hier wurde über die geringen Fischbestände geklagt. Stichprobenartige Untersuchungen von inneren Organen der Forellen zeigten deutliche Schädigungen. Da diese besonders unterhalb der ARA Lyss sehr ausgeprägt waren, konzentrierten wir unser Augenmerk auf die Auswirkungen der geklärten Abwässer. Bei einem aktiven Monitoring wurden Bachforellen in Kästen mit geklärtem Abwasser (1:20 mit Flußwasser verdünnt) oder in Flußwasser ohne ARA-Abwasser über längere Zeit gehältert. Alle zwei Monate wurden je fünf Fische auf ein ganzes Set von Parametern untersucht: Kondition, Parasitenbefall, Infektion mit Bakterien und Viren, Blutzynzyme, makroskopisch und

histologisch sichtbare Veränderungen an Kieme, Haut, Leber und Niere. Dieselben Parameter wurden auch an freilebenden Forellen bestimmt, die in der Alten Aare, oberhalb und unterhalb der Einleitstelle der ARA Lyss, gefangen worden waren (passives Biomonitoring). Schon nach ganz kurzer Zeit wurden sehr hohe Mortalitäten verzeichnet: 87 Prozent in den Kästen mit gereinigtem ARA-Wasser, 29 Prozent in den Kästen mit Flußwasser, während es bei den zum Vergleich in Trinkwasser gehaltenen Forellen keine Sterbefälle gab [10]. Im weiteren Versuchsverlauf, nach Neubesatz der Kästen, blieb das Mortalitätsmuster ähnlich, die Sterblichkeit erreichte jedoch in keinem Fall mehr ein so dramatisches Ausmaß. Die Zahl der Parasiten auf Haut und Kiemen der Forellen im aktiven und passiven Monitoring erwies sich ebenfalls als deutlich höher bei den Tieren, die zusätzlich dem Abwasser ausgesetzt waren. Hier waren es unter anderem Schwächeparasiten, die bei Tieren unter Stressbedingungen vermehrt beobachtet werden (Figur 9). Ihr Auftreten kann somit als

Anzeiger für gestörte Verhältnisse im Tier oder in seiner Umwelt dienen und geht oft mit einer Schwächung des Immunsystems einher. Bei intensivem Befall können diese Parasiten auch für den Tod der Fische entscheidend sein. Ebenfalls erhöht war die Rate der Infektion mit pathogenen Keimen bei den Tieren nach Abwasserexposition. Gefährlich ist vor allem der Erreger der Furunkulose, da er Mortalitäten bis zu 100 Prozent bewirken kann. Alle untersuchten Organe zeigten Schädigungen, am signifikantesten Leber und Niere. Elektronenmikroskopisch ließ auch die Haut Anomalien ihrer Feinstruktur erkennen. So nimmt bei den abwasserexponierten Tiere die Dicke der Epidermis ab, während die Einwanderung von Entzündungszellen zunimmt – allesamt Hinweise auf eine Störung der Abwehrfunktion der Haut. Generell zeichnet sich jedoch ab, daß auch die Hälterung im Flußwasser ohne Beimischung aus dem ARA-Ablauf bereits nachteilig auf die Fische wirkt, die Abwassereinleitung stellt einen zusätzlichen Stressfaktor dar.

Die Frage nach den Ursachen ist nicht einfach zu beantworten, zu komplex ist das aus den Befunden zusammengesetzte Bild. Chemische Analysen wiesen aber auf Überschreitungen der Grenzwerte für Nitrat und Ammonium sowie auf die Anwesenheit von Nonylphenol hin, alles Stoffe, die für Fische schädlich sind. Nachträgliche Untersuchungen im Rahmen eines erweiterten Biomonitorings ergaben zudem Indizien für Belastungen mit gentoxisch wirkenden Stoffen, Pflanzenschutzmitteln und auch Moschusduftstoffen [11]. Vertreter dieser Gruppen stehen in Verdacht, hormon-



Figur 9. Trichodina, ein einzelliger Parasit auf Haut und Kieme, der besonders bei geschwächten Fischen in großer Zahl auftritt (Photo: T. Wahli).

aktiv zu sein. Wir vermuten, daß die Kombination vieler stofflicher Beeinträchtigungen, zusammen mit Furunkulose-Erregern und hohen Sommertemperaturen, die Forellen letztlich derart belasten, daß es zu den Schädigungen und einem Sterblichkeitsanstieg kommt. Mittels multivariater Analysen wurde schließlich zu bestimmen versucht, welche Biomarker am besten zwischen den beiden Situationen, Flußwasser mit und ohne Kläranlagenabwasser, unterscheiden können. Während im aktiven Monitoring einige Marker der Blutchemie und histologische Befunde an Kieme und Leber am aussagekräftigsten sind, gilt das im passiven Monitoring für die Häufigkeit spezieller Parasiten, den Gesamtproteingehalt und die histologischen Leberveränderungen [12]. Diese Unterschiede sind durch die unterschiedlichen Expositionsbedingungen und damit die jeweils wirkenden Stressfaktoren erklärbar: Freilebende Fische können Schadstoff-Fahnen ausweichen, was in Kästen gehälterten Fischen verwehrt ist, welche somit kontinuierlicher zum Beispiel den erhöhten Ammoniumkonzentrationen ausgesetzt sind, die schädigend auf Kieme und gewisse Blutzynzyme wirken. Die eingesperrten Tiere leiden wiederum eher an übertragbaren Krankheiten (Furunkulose!), aber auch an sozialem Stress, da sie nur begrenzten Raum zur Verfügung haben. Die freilebenden Tiere sind sehr viel länger im Ökosystem und kommen dementsprechend häufiger und mit mehr Parasiten in Kontakt.

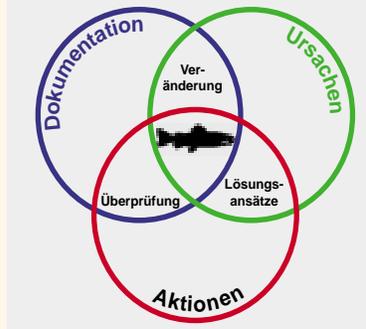
Nach wie vor offen bleibt allerdings die Bedeutung der nachgewiesenen Veränderungen für die Forellenspopulation im Gewässer. Bis heute ist nicht bekannt, wie groß zum Beispiel der Anteil gesunden Lebergewebes eines Fisches sein muß, damit er beim Überlebenskampf in freier Wildbahn konkurrenzfähig bleibt. Erschwerend kommt hinzu, daß freilebende Tiere, wenn sie sterben, schnell im System verschwinden und somit nicht für Analysen zur Verfügung stehen.

Ein alle Untersuchungen umfassender, interdisziplinärer Synthesebericht der Forschungen an der Alten Aare wurde kürzlich im Auftrag von "Fischnetz" (Exkurs 4) erstellt. Er faßt die Resultate zusammen und bewertet sie hinsichtlich der in einem Workshop vorgeschlagenen Maßnahmen. Hier zeigt sich deutlich die Wichtigkeit gut abgestützter wissenschaftlicher Ergebnisse als Argumentarium für eine Verständigung über die Priorität notwendiger Maßnahmen. Die Sanierung der ARA Lyss wurde bereits begonnen.

Exkurs 4

Das Projekt "Netzwerk Fischrückgang Schweiz"

Dieses Projekt, kurz "Fischnetz" genannt, wurde von den Bundeseinrichtungen EAWAG und BUWAL ins Leben gerufen. Gemeinsam mit den Kantonen, der Chemischen Industrie und dem Schweizerischen Fischereiverband, koordiniert und vernetzt es die betreffenden Aktivitäten hierzulande, integriert die vorhandenen Kenntnisse und initiiert neue Untersuchungen, wenn Wissenslücken offensichtlich sind.



Die Ziele im Projekt "Fischnetz":
Die Dokumentation der beobachteten Veränderungen (Fischrückgang, gesundheitliche Beeinträchtigungen der Fische) wird gefolgt von einer Ursachenanalyse, die schließlich zur Entwicklung von Lösungsansätzen führen soll. Daraus ergeben sich Aktionen, deren Erfolg wiederum überprüft und dokumentiert werden muß.

der Projektleitung 12 *Arbeitshypothesen* aufgestellt. Die integrative Hypothese 1 verweist auf die multiplen Effekte und die Tatsache, daß die Ursächlichkeiten je nach Lebensraum, Fischart, Geschlecht oder Jahr sehr verschieden sein können. Zudem können sich die verschiedenen Faktoren addieren und gegenseitig aufheben oder verstärken. Die Hypothesen 2-5 konzentrieren sich auf eine stoffliche Beeinträchtigung, wobei die Wirkung durch eine gestörte Fortpflanzung (2), eine erhöhte Sterblichkeit der Jungfische (3), nicht mehr funktionierende Organe (4) oder verstärkten Befall mit Parasiten und Krankheiten, der zu einer Schwächung des Immunsystems führt (5), erfolgt. Die Hypothesen 6-10 umfassen andere Ursächlichkeiten. Dazu gehört neben einer ungenügenden räumlichen Struktur des Lebensraumes (6) insbesondere die Kolmation (Sohlenverfestigung), welche durch Feinstoffeintrag in den Porenraum der Kieselsohle entsteht und zum Absterben der Forelleneier führt (7). Die kritische Phase kann auch auf ein verringertes Futterangebot zurückzuführen sein (8) oder auf Besatz mit nicht standortgerechten Fischen (9). Denkbar ist auch, daß der von den Anglern beklagte Fangrückgang nicht einen Rückgang der Fischpopulation widerspiegelt, sondern andere Anglergewohnheiten und eine andere Verteilung des abschöpfbaren Ertrags zwischen Anglern und Vögeln (10). Die Hypothesen 11 und 12 beziehen sich ausschließlich auf Forellengewässer, wo sich Klimaveränderungen sowohl auf die Temperaturverhältnisse (höhere maximale Sommertemperaturen, was den Lebensraum der kälteliebenden Bachforelle einschränkt; 11) als auch auf die Wasserführung (vermehrte geschlebeführende Winterhochwasser, die den Laich der kieslaichenden Bachforelle beeinträchtigt; 12) auswirken können.

Zur Bearbeitung dieser Hypothesen werden Forschungsfragen formuliert, denen spezifische Studien folgen. Für *Monitoring*-Studien werden repräsentative Fließgewässer ausgewählt, um einen Überblick über die Verbreitung bestimmter Phänomene zu erhalten, zum Beispiel Krankheiten oder auch ausreichende Zahl von Jungfischen, die aus natürlicher Fortpflanzung stammen. Gleichrangig neben diesen Felduntersuchungen wird die *Datenauswertung* bereits vorhandener Daten vorgenommen. Einerseits sind es historische Angaben zu Veränderungen im uns interessierenden Zeitraum der letzten 10-20 Jahre, wie die Veränderung der Erosionsrate in der Landwirtschaft, der Masseneinsatz bestimmter Chemikalien im Haushalt. Andererseits vermuten wir regional unterschiedliche Ursachen für die beobachteten Phänomene, so bestimmte Kläranlagen mit ungenügender Reinigungsleistung in dem einen Gebiet, in dem anderen harte Verbauungen der Gewässer, die Geschiebetrieb verhindern und Sohlenkolmation begünstigen. Darüber hinaus bekommt das Wissen der Experten im Projekt ein besonderes Gewicht: In themenspezifischen Diskussionsforen holen wir die Meinung erfahrener Fischer, Fischzüchter und kantonaler Fachvertreter zu bestimmten Fragen ein, erarbeiten Positionspapiere oder auch Maßnahmenkataloge. In einem jüngst gestarteten Projekt werden mittels eines "Wahrscheinlichkeitsnetzwerkes" das subjektive Wissen und die Einschätzungen der Experten systematisch eingeholt, um relevante Informationen zu integrieren, Problemursachen und Forschungslücken aufzudecken sowie eine Prognose der Auswirkung von Maßnahmen zu verbessern.

Die Ziele können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

- Dokumentation der Veränderungen von Fängen und Beständen sowie der gesundheitlichen Beeinträchtigungen der Fische in den schweizerischen Gewässern (Vergleich früher - heute; siehe dazu Exkurs 3) in den letzten 20-30 Jahren.
- Ursachenanalyse durch die Eingrenzung der Ursachengruppen und die Identifikation der wichtigsten Ursachen der Veränderungen.
- Aktionen: die Entwicklung von Handlungsoptionen und adressatengerechte Kommunikation.

Das "Fischnetz" wird von einer Projektorganisation getragen, die sich aus dem Lenkungsausschuß (politisches Gremium), der Projektleitung (inhaltliche Arbeit) und den Teilprojektverantwortlichen und ihren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern (Untersuchung von Einzelfragen und Teilsynthesen) zusammensetzt.

Aufgrund der vielfältigen Vermutungen über die Problemursache wurden von

Weg vom Tierversuch – hin zur Zellkultur

Die vorgestellten Resultate sind ohne den Einsatz von Tieren nicht zu bekommen. Viele Fragen jedoch lassen sich auch an Zellkulturen untersuchen. Diese bieten zudem den Vorteil, daß damit die Komplexität der biologischen Systeme weiter reduziert und so die Auswirkung von Umweltfaktoren direkt auf die Zellen studiert werden kann, ohne daß etwa Abwehrprozesse deren Reaktionen überdecken. Zellkulturen eignen sich demnach für das Studium der zugrundeliegenden Mechanismen, es lassen sich normale und gestörte Funktionen direkt miteinander vergleichen. Wir haben uns wiederum auf die Haut konzentriert: Eine Kultur von frisch aus der Forellenhaut gewonnenen Einzelzellen wurde mit einer sogenannten Explantat-Kultur verglichen, die aus kleinen Hautstückchen bestand, in der also noch gewisse Prozesse im Gewebeverband ablaufen können. Zum weiteren Vergleich wurde auch eine permanente Fischhautzell-Linie herangezogen, die zum Beispiel aus Tumoren erhalten wird. Zell-Linien gelten als wenig sensibel, da sie viele normale Funktionen aufgegeben haben. Neben grundlegenden Studien zur Charakterisierung dieser Kulturen haben wir begonnen, die Auswirkung eines der östrogenwirksamen Stoffe, nämlich Nonylphenol, zu untersuchen. Im Experiment bewirkte Nonylphenol die Auflösung des Golgi-Apparates, einer Struktur im Zellinnern, wo Proteine mit Zuckern verbunden und für den Transport aus der Zelle vorbereitet werden. Obwohl der Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist, könnte eine Hemmung von Enzymen durch Nonylphenol dabei eine Rolle spielen. Dieser Effekt, in allen Zellkultursystemen beobachtet^[13], ist unseres Wissens aber noch nie zuvor unter anderen Testbedingungen festgestellt worden. Demnach handelt es sich hier mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Reaktion, die eine Exposition bezüglich dieser Substanz oder Substanzgruppe anzeigt. Die so veränderten Zellen sind in ihren Sekretionsaktivitäten erheblich gestört.

Es bietet sich daher an, auch Zellkulturen der Fischhaut für mechanistische Studien heranzuziehen. Sowohl die Wirkung von Schadstoffen als auch zum Beispiel die Interaktion mit anderen Umweltstressoren stellen Forschungsfelder dar, die hierzu aufschlußreiche Resultate erwarten lassen. Ein entscheidender Vorteil der Zellkultursysteme ist, daß damit für fischtotoxikologische Unter-

suchungen weniger Tiere gebraucht werden. Unter den toxikologischen Standardbedingungen (OECD-Richtlinien) sind mindestens 50 Tiere pro Test erforderlich, mit der Primärzellkultur werden mit Zellen aus einem Fisch bis zu 4 Tests und mit der Explantatkultur 7 Tests möglich. Für Tests mit der Zell-Linie werden keine Tiere benötigt, da es sich um eine "Dauer-Kultur" handelt, die unendlich weiter vermehrt werden kann.

Um eine Anwendung in der Praxis zu fördern, haben wir ein Mehrstufenmodell entwickelt, in Anlehnung an ein vergleichbares Modell für Fischleberzellkulturen^[14, 15]. Dabei werden Tests nach dem Prinzip zunehmender Empfindlichkeit und Komplexität hintereinandergeschaltet. Demnach wird eine zu untersuchende Probe, sei es ein Einzelstoff oder eine Umweltprobe, zunächst in ihrer Wirkung auf eine permanente Fischzell-Linie getestet. Wenn sich hier kein zelltoxischer Effekt zeigt, wird mit einer Fischhautzell-Linie weitergetestet, im Falle ausbleibender Reaktion mit einer empfindlichen Primärzellkultur und dann mit der noch empfindlicheren Gewebekultur. Deutlich toxische Stoffe zeigen bereits auf den Stufen der Zell-Linien ihr toxisches Potential und bringen es mit großer Wahrscheinlichkeit auch im Ganztier zur Wirkung – was infolge dieses Testsystems gar nicht geprüft werden muß. Hingegen dürfen negative Befunde auf den Stufen der Zell- und Gewebekulturen aus Sicherheitsgründen nicht zur Schlußfolgerung "fehlende Toxizität im Ganztier" führen.

3. Konsequenzen für die Anwendung

Unsere Untersuchungen haben die Brauchbarkeit des Fisches als Bioindikator bestätigt. Er eignet sich gut, um Einflüsse der Umwelt festzustellen. Doch die Resultate werfen nochmals Fragen auf, besonders auch hinsichtlich der praktischen Relevanz und abzuleitender Empfehlungen.

Passives oder aktives Biomonitoring?

Beide Ansätze haben ihre Vorteile, jedoch sind nicht immer beide möglich. Passives Biomonitoring ist zu bevorzugen, wenn Fischarten untersucht werden, die relativ standorttreu sind, und die Fischpopulation groß genug ist, um eine ausreichende Anzahl von Fischen für Probenahmen zu fangen. Vorteilhaft am passiven Biomonitoring ist, daß die

Fische ihr normales Verhalten gegenüber den Stressoren zeigen, wie Ausweichen, Aufsuchen von schützenden Refugien et cetera. Meistens ist dieser Ansatz kostengünstiger als das aktive Biomonitoring.

Eine Voraussetzung für aktives Biomonitoring ist die Verankerungsmöglichkeit von Hälterungskästen im freien Gewässer. Eine tägliche Kontrolle ist sehr zu empfehlen, insbesondere bei starken Regenfällen, Laubeintrag et cetera. Der große Vorteil dieses Untersuchungsansatzes ist, daß der Ausgangszustand der Fische, inklusive ihre Herkunft, bekannt ist, die Tiere gut miteinander verglichen werden können und eine zuverlässige Kontrollgruppe mit Fischen der gleichen Herkunft bereitsteht.

In unseren Studien wurde klar, daß aktives Monitoring einerseits relativ viele und homogene Daten erbringt. Andererseits ist eine rasche Übersicht im Falle eines akuten Problemverdachts, wie bei der Belastung mit östrogenaktiven Substanzen, nur durch passives Biomonitoring zu gewinnen.

Für zukünftige Studien sollten also vor allem dann aktive Monitorings ins Auge gefaßt werden, wenn es um vertiefte, systematische Forschungsfragen geht, passive Monitorings dagegen, um flächendeckend erste, orientierende Eindrücke zu erhalten.

Biologisches und chemisches Monitoring kombiniert

Pragmatische Szenarios für derartige Kombinationen sind folgende:

□ Wenn eine Routineuntersuchung chemischer Parameter zu Hinweisen auf eine Überschreitung von Richt- oder Grenzwerten führt, bietet es sich an, anhand nicht-spezifischer Biomarker zu ermitteln, ob ein Effekt auf die Fischgesundheit vorliegt. Falls ja, sollte anhand spezifischer Biomarker, welche die Exposition oder die Auswirkung der identifizierten Stoffe erfassen, festgestellt werden, ob diese als Verursacher für beobachtete Veränderungen in Frage kommen. Allerdings gibt es nur wenige derartige spezifische Biomarker, und sie sind meist auf der molekularen Ebene angesiedelt, so daß besonders bei Felduntersuchungen mit einer hohen Variabilität zwischen den Individuen gerechnet werden muß. Falls hingegen aus Beobachtungen oder Routineanalysen zwar Verdacht auf eine Störung der Fischfauna vorliegt, aber kein Hinweis auf einen Stressor vorhanden ist, wird eine Kombination mehrerer, nicht-spezifischer Biomarker vorteilhaft sein,

welche die Bandbreite möglicher Beeinträchtigungen abdecken können und aus deren Resultaten sich konkreter Untersuchungsbedarf für Verdachtsfaktoren herleiten läßt.

□ Wenn eine Abnahme der Fischpopulation oder eine offensichtliche Gesundheitsstörung bei den Fischen eines Gewässers bekannt ist, hängt das Forschen nach den Ursachen von den gegebenen Umweltfaktoren ab. Falls keine anderen Stressoren (Lebensraum, Feinde, Nahrungsarmut, Konkurrenzdruck et cetera) auszumachen sind, kann eine chemische Analyse angezeigt sein, am besten gekoppelt mit einem Biomonitoring, das gezielt auf die vorhandenen Kenntnisse (zum Beispiel beobachtete Krankheiten oder besondere saisonale Häufung von Problemen) abhebt. Hier bietet sich im Fall einer Gesundheitsstörung zum Beispiel ein integratives Verfahren zur Gesundheitsbeobachtung an.

Wie kann, im Fall einer chemischen Belastung, ausfindig gemacht werden, welches die schädigende Komponente in einer komplexen Matrix (Beispiel: Abwasser aus Kläranlagen) ist?

Im Idealfall liefern spezifische Biomarker in Kombination mit chemischen Analysen genug Hinweise auf verdächtige Stoffe oder Stoffgruppen. Meistens muß aber die Substanz eindeutig identifiziert werden, wenn die Treffsicherheit von Maßnahmen ausreichen soll. Hier ist nun der TIE-Ansatz (*Toxicity Identification and Evaluation system*) relativ erfolgversprechend: Dabei wird zunächst eine Fraktionierung der Matrix vorgenommen und dann jede Fraktion einzeln auf ihre Toxizität im Biotest geprüft und diese mit der Gesamttoxizität der Ausgangsmatrix verglichen. Natürlich besteht keine Garantie, daß alle Schadstoffe identifiziert werden können, zumal sich die Toxizität oft erst im Gemisch ergibt.

Wie können eindeutige Ursache-Wirkungsbeziehungen konstatiert werden?

Besonders unter Freilandbedingungen, wo die Tiere vielen Stressoren und verschiedenen Stoffen exponiert sind, können die beobachteten Effekte nicht eindeutig und ursächlich den vermuteten Faktoren zugewiesen werden. Hierfür sind zusätzliche Laborstudien notwendig, in denen molekulare Mechanismen und biochemische Reaktionen aufgeklärt werden können. Sie erlauben es eher, eine Verbindung zwischen Effekt und Ursache zu herzustellen.

Wie viele und welche Biomarker sind nötig?

Wie unsere Studien zeigen, ist es erforderlich, Biomarker von den verschiedenen Ebenen der biologischen Hierarchie zu untersuchen, da ein Biomarker allein nicht die ganze Antwort eines Organismus wiedergeben kann. Es empfiehlt sich auch, Biomarker mit einer kurzen Reaktionsdauer und solche, die eine Reaktion über eine längere Zeitspanne kumulieren, einzuschließen. Wichtig ist der Einsatz von standardisierten Methoden und etablierten Versuchsdesigns (Probenahmehäufigkeit, Wahl der Untersuchungsparameter et cetera). Dies erleichtert die Interpretation sehr, stellt die Ergebnisse in einen Rahmen, der eine Diskussion vergleichbarer Studien ermöglicht, und erlaubt gegebenenfalls Nachuntersuchungen.

Wie ist eine Extrapolation von einer biologischen Ebene zur nächsten möglich?

Grundsätzlich sind alle diejenigen Effekte wichtig, die von vitaler Bedeutung für den ökologischen Erfolg einer Art sind, also Sterblichkeit, Wachstum und Fortpflanzung. Dementsprechend sind all die Veränderungen, die diese Parameter beeinflussen, potentiell kritisch. Von den Resultaten der einzelnen Biomarker ohne weiteres auf ihre Bedeutung für die nächsthöhere Ebene zu schließen, läßt diese theoretische Überlegung aber in der Praxis kaum zu. Daneben spielen arttypische Besonderheiten und ökologische Strategien, zum Beispiel bei der Fortpflanzung, eine wesentliche Rolle, die auch mit Modellierungen schwer faßbar ist. Deshalb sind parallel geführte Ansätze, mit Feld-, Labor- und Modellstudien dringend erforderlich.

4. Ausblick

Populationsrelevanz

Wie anhand der vorgestellten Resultate klar wird, erlauben die Studien an Biomarkern fast immer nur Aussagen über individuelles Wohlbefinden, hier des einzelnen Fisches. Eine der schwierigsten Fragen stellt sich bei der Extrapolation auf die Ebene der Population. Im Zusammenhang mit dem Projekt "Fischnetz" wird daher jetzt angestrebt, gerade diese Ebenen – des Individuums und der Population – miteinander experimentell wie methodisch zu verknüpfen. Für solche Studien in sogenannten Testgebieten wählen wir Fließgewässer aus, wo ein Rückgang des Fischfangs

oder -bestandes in den letzten Jahren zuverlässig und kontinuierlich verzeichnet worden ist – immer bei unklarer Ursache. Es werden dann möglichst viele unserer Hypothesen (siehe Exkurs 4) an meßbaren Parametern überprüft. So wird für die Hypothese "beeinträchtigte Reproduktionsfunktion" zum Beispiel untersucht, ob die Elterntiere ein normales Laichverhalten zeigen, ob die abgegebenen Eier und Spermien in Struktur und Funktion normal sind, ob die Hormonspiegel den Normwerten entsprechen. Um bei Abweichungen vom erwarteten Wert chemische Stoffe identifizieren zu können, die als Verursacher in Frage kommen, läuft gleichzeitig ein chemisch-analytisches Meßprogramm, durch das zum Beispiel als endokrin wirksam bekannte Substanzen erfaßt werden. Gleichzeitig werden viele andere Parameter registriert. Mit multivariaten Analysen soll schließlich ermittelt werden, welche Kombination von Parametern zur besten Unterscheidung zwischen den Versuchsgruppen führt. Auch wenn damit noch kein eindeutiger "Beweis" für die Ursache möglich ist, können so doch die in Frage kommenden Faktoren eingeschränkt werden.

Fließgewässerbeurteilung

Während in der ökotoxikologischen Prüfung bereits sehr gut ausgearbeitete Protokolle verwendet werden, um die Wirkung von Einzelsubstanzen oder Substanzgemischen auf aquatische Organismen oder Organismengemeinschaften im Laboratorium zu bestimmen, ist eine Standardisierung von Tests unter Freilandbedingungen und damit die Interpretation der Ergebnisse viel schwieriger. Die Bewertung von Fließgewässern wird in der Schweiz nach dem sogenannten Modul-Stufen-Konzept vorgenommen^[16], das die Fragen der Ökotoxikologie bisher nicht berücksichtigt. Wir, eine Arbeitsgruppe an der EAWAG, engagieren uns zur Zeit für die Einrichtung eines ökotoxikologischen Moduls, das ein zweistufiges Untersuchungsverfahren vorschlägt^[17]. Da durch Chemikalien verursachte Effekte meist bereits auf der molekularen oder suborganismischen Ebene deutlich werden, kann die Abschätzung des Gefahrenpotentials über suborganismische Testsysteme durchgeführt werden. Sie gestatten eine Aussage darüber, ob eine Substanz eine spezifische nachteilige Wirkung auf Zellen, Organe oder Organismen hat. Auf der ersten Stufe werden deshalb Wasserproben in einer Testbatterie untersucht, die – neben der direkten Toxi-

zität gegenüber Bakterien – Effekte auf die Photosynthese bei einzelligen Algen erfaßt sowie mit tierischen Zell-Linien auch Kanzerogenität, Hormonaktivität oder Schäden am Immunsystem ermittelt. Wenn alle Tests der ersten Stufe negativ ausfallen, sind die Wasserproben als ungefährlich zu beurteilen. Auf der zweiten Stufe werden nur die positiven Proben weiter getestet, und zwar nur an den Organismengruppen, bei denen bereits davor Effekte dieser Proben beobachtet wurden. Hier müssen dann Langzeittests auf der Organismen-Ebene stattfinden. Nur wenn auch diese positiv ausfallen, ist ein nachteiliger Effekt für die Lebensgemeinschaft des untersuchten Fließgewässer-Ökosystems zu erwarten. Gegebenenfalls muß durch chemische Analysen, zum Beispiel TIE, der fragliche Schadstoff oder eine Mischung von Schadstoffen identifiziert werden.

Natürlich können nicht alle möglichen Wirkungen damit einschränkunglos erfaßt werden, und nicht alle der im Test beobachteten Wirkungen haben im Ökosystem spürbare Folgen. Bei einer negativen Antwort ist die Wahrscheinlichkeit, daß Effekte im "Freiland" auftreten, die zuvor dem Testsystem entgangen waren, jedoch relativ gering. Allerdings bleibt immer zu klären, welche Arten als genügend sensitive Indikatoren erachtet werden und eingesetzt werden sollen. Die Erfahrung wird zeigen, wie ausgeprägt die Reaktionen sein sollen, um weitere Untersuchungen nach sich zu ziehen, und welche Antworten tolerabel sind.

Ein Entwurf des modularen Konzepts, das jederzeit um neue Testsysteme (mit neu als wichtig erkannten Endpunkten) aufgestockt werden kann, wird zur Zeit mit Experten im In- und Ausland, inter-

essierten Kreisen aus der Chemischen Industrie und Behörden diskutiert. Noch in diesem Jahr wird an der EAWAG eine Pilotphase anlaufen, wobei die vorhandenen Testsysteme exemplarisch an gereinigtem und ungereinigtem Wasser einer ausgewählten Kläranlage erprobt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] C. Friedl: *Fischfangrückgang in schweizerischen Fließgewässern*, Mitteilungen zur Fischerei, Vol. 63, BUWAL, Bern (1999).
- [2] H. Schmidt, H. Posthaus, A. Busato, T. Wahli, W. Meier, P. Burkhardt-Holm: "Transient increase in chloride cell number and heat shock protein expression (HSP70) in brown trout (*Salmo trutta fario*) exposed to sudden temperature elevation", *Biological Chemistry* 379 (1998) 1227–1233.
- [3] P. Burkhardt-Holm, H. Schmidt, W. Meier: "Heat shock protein (HSP70) in brown trout epidermis after sudden temperature rise", *Comparative Biochemistry and Physiology A* 120 (1998) 35–41.
- [4] H. Schmidt, D. Bernet, T. Wahli, W. Meier, P. Burkhardt-Holm: "Active biomonitoring with brown trout and rainbow trout in diluted sewage plant effluents", *Journal of Fish Biology* 54 (1999) 585–596.
- [5] H. Schmidt, D. Bernet, T. Wahli, P. Burkhardt-Holm: "Morphological organ alterations and infectious diseases in brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to polluted river water", *Diseases of Aquatic Organisms*, im Druck.
- [6] P. Burkhardt-Holm, D. Bernet, C. Hogstrand: "Increase of metallothionein-positive chloride cells in the gills of brown trout and rainbow trout after exposure to sewage treatment plant effluents", *Histochemical Journal* 31 (1999) 339–346.
- [7] P. Burkhardt-Holm, A. Ochsenbein, D. Pugovkin, P. Girling, T. Wahli: "Estrogenic contamination and liver condition of brown trout: a first survey in Swiss rivers", *Journal of Fish Biology* (eingereicht).
- [8] M. Ahel, W. Giger, E. Molnar, S. Ibric: "Determination of nonylphenol ethoxylates and their lipophilic metabolites in sewage effluents by normal-phase high-performance liquid chromatography and fluorescence detection", *Croatica Chimica Acta* 73/1 (2000) 209–227.
- [9] A. Radvansky, C. Remy, B. Rimml, M. Wiesmann: *Nonylphenol in der Schweiz – Eine Abschätzung der Belastungssituation und der ökologischen Wirkungen* (Projektarbeit), IKAÖ, Universität Bern (2000).
- [10] M. Escher, T. Wahli, S. Büttner, W. Meier, P. Burkhardt-Holm: "The effect of sewage plant effluent on brown trout (*Salmo trutta fario*)", *Aquatic Sciences* 61 (1999) 93–110.
- [11] A. Gerecke, S. Müller, M. Sägesser, U. Ochsenbein, G. Popow: "Pestizideinträge via Kläranlage", *Gas, Wasser, Abwasser*, im Druck.
- [12] D. Bernet, H. Schmidt, T. Wahli, P. Burkhardt-Holm: "Effects of waste water on fish health: an integrated approach to biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta* L.)", *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, im Druck.
- [13] G. Lamche, P. Burkhardt-Holm: "Nonylphenol provokes a vesiculation of the Golgi apparatus in three fish epidermis cultures", *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47 (2000) 137–148.
- [14] G. Lamche, W. Meier, P. Burkhardt-Holm: "Die Fischepidermis als Modell für ökotoxikologische Studien", in H. Schöffl, H. Spielmann, H.A. Tritthart (Ed.): 6., 7., 8. *Österreichischer internationaler Kongress über Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen in der biomedizinischen Forschung* (Vol. 6), Springer-Verlag, Linz (2000), p. 221–227.
- [15] T. Braunbeck: *Zelltests in der Ökotoxikologie*, Landesanstalt für Umweltschutz, Karlsruhe (1995).
- [16] P. Liechti, U. Sieber, U. von Blücher, H.P. Willi, U. Bundi, A. Frutiger, M. Hütte, A. Peter, C. Göldi, U. Kupper, W. Meier, P. Niederhauser: *Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer: Modul-Stufen-Konzept*, BUWAL, Bern (1998).
- [17] N. Schweigert, R. Behra, R. Eggen, B. Escher, P. Holm: "Wie können Schadstoffeinträge in Fließgewässern nachgewiesen werden?", *EAWAG News*, im Druck.

(Eingegangen am 17. Januar 2001; OS)



Patricia Burkhardt-Holm: Geboren 1959 in Mainz, Rheinland-Pfalz. Studium der Biologie und Sportwissenschaften an der Universität Heidelberg; Promotion in Zoologie. Consultant in einem Büro für Biotechnologie und Ökologie. Postdoktorat in der Neurobiologie an der ETH Zürich. Von 1992 bis 1999 Oberassistentin an der Interfakultären Koordinationsstelle für Allgemeine Ökologie der Universität Bern. In dieser Zeit auch Durchführung und Betreuung zahlreicher Forschungsarbeiten am Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin des Instituts für Tierpathologie dieser Universität. Habilitation an der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät in Bern 1999 mit der Habilitationsschrift "The Fish as Bioindicator: The effect of

environmental influences on selected molecules, cells and organs". Die Arbeit wurde mit dem Umweltforschungspreis ausgezeichnet. Seither Privatdozentin an der Universität Bern. Seit 1999 an der EAWAG als Projektleiterin für das Projekt "Netzwerk Fischrückgang Schweiz" (Fischnetz; www.fischnetz.ch). Forschungsaufenthalte an der University of Cebu, Philippinen (1984); Universität Göteborg, Schweden (1986); University of Kentucky, USA (1998). – Aktuelle Arbeitsinteressen: Fische als Bioindikatoren mit Schwerpunkten auf: endokrine Disruptoren, Metallothioneine, Fischgesundheitsparameter, Verbindung individueller mit populationsrelevanten Parametern. Wissenschaftliche Bearbeitung von Fragestellungen aus der Praxis und transdisziplinäre Problemlösungen und -kommunikation.

Der Berner Umwelt-Forschungspreis bezweckt die Förderung der disziplinären und interdisziplinären Forschung im Bereich Ökologie/Umweltwissenschaften an der Universität Bern. Mit dem Preis sollen alle zwei Jahre Forscherinnen und Forscher für eine hervorragende wissenschaftliche Arbeit ausgezeichnet werden, die einen gesellschaftlich relevanten Beitrag zum besseren Verständnis von Umweltproblemen beziehungsweise deren Lösung leistet. Es sind Bewerbungen aus allen Disziplinen und Wissenschaftsgebieten möglich. Der Preis richtet sich besonders an Nachwuchsforscherinnen und -forscher. Die Ausrichtung des mit CHF 20 000.– dotierten Preises wird durch Beiträge des Handels- und Industrievereins des Kantons Bern und des Kantonal-bernerischen Gewerbeverbands ermöglicht.