

Projekt «Fischnetz»

Einfluss von Kläranlagen auf den Gesundheitszustand von Bachforellen

Synthesebericht zum Projekt "Einfluss von Kläranlagen auf Fischbestände und Bachforelleneier" (Escher, 1999: BUWAL Mitteilungen zur Fischerei Nr. 61) unter Berücksichtigung histologischer Leber- und Gonadenuntersuchungen sowie Vitellogeninmessungen

Daniel Bernet ¹

Juli 2000

¹ Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin (FIWI), Nationale Fischuntersuchungsstelle, Institut für Tierpathologie, Universität Bern, Länggass-Strasse 122, 3012 Bern; e-mail: daniel.bernet@itpa.unibe.ch

Zusammenfassung

In einem gross angelegten Monitoring Projekt wurden die Effekte von 41 Abwasserreinigungsanlagen (ARAs) auf Fischbestände sowie auf den Gesundheitszustand und die Eientwicklung von Bachforellen in den Vorflutern untersucht (Escher, 1999). Leberproben der untersuchten männlichen Bachforellen wurden am Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin (FIWI), Bern, histologisch bewertet und deren Vitellogeningehalt immunhistochemisch gemessen. Gonaden wurden histologisch auf das Auftreten von Ovotestis untersucht. Die fischereibiologischen, makropathologischen und biometrischen Daten des Projekts (Escher, 1999), die Ergebnisse der histologischen Leber- und Gonadenuntersuchungen (Burkhardt-Holm et al., 1999b) sowie der immunhistochemischen Vitellogeninmessungen (Burkhardt-Holm et al., 1999a) lieferten das Datenmaterial für die vorliegende Synthese des Projekts. Die Ergebnisse werden in Verbindung gesetzt mit den zur Verfügung stehenden Kenndaten der Kläranlagen und der Morphologie der Vorfluter.

Die integrative Beurteilung der Auswirkungen der ARAs auf die Fische dokumentierte negative Effekte der ARAs Buttisholz, Sion-Châteauneuf, St.Imier/Villeret, Villars s/G und ganz besonders der ARAs Engelberg, Hagnau-Birsfelden, Kemmental, Mönchaltorf, Reinach und Teufenthal. Bei 22 ARAs wurden aufgrund der gemessenen Parameter keine oder nur geringe negative Effekte auf die Fische nachgewiesen. 9 ARAs (Altstätten, Brunnen, Eclubens, Eschenbach-Inwil, Fenin, Märstetten, Surental, Wartau, Zwingen) konnten nicht abschliessend beurteilt werden, weil unter- und/oder oberhalb keine oder zuwenig Bachforellen gefangen wurden. Die integrative Bewertung aller untersuchten Parameter erlaubte eine Abtrennung derjenigen ARAs, unterhalb deren ein Bestandesrückgang der Bachforellen nachgewiesen werden konnte, von den übrigen ARAs. Dies bestätigt einmal mehr die Empfehlungen aus vielen Biomonitoring-Studien, mehrere Parameter auf verschiedenen Organisationsstufen für die Bewertung der Wirkung von Schadstoffen auf Organismen in Kombination zu verwenden. Veränderungen an Fischen und Fischeiern oberhalb vieler ARAs deuten auf eine Grundbelastung der Gewässerläufe bereits oberhalb der Einleitestellen der ARA hin. Möglicherweise spielten dabei auch Wanderbewegungen der Fische eine Rolle (dies trifft jedoch nicht für die exponierten Fischeier zu). Grösse und Verdünnungsverhältnis der ARAs standen nicht in Beziehung mit dem Ausmass der vorgefundenen Ergebnisse. Indessen muss für die vorgefundenen Veränderungen dem qualitativen Schadstoffpotenzial des Abwassers (Inhaltsstoffe, Zusammensetzung etc.) Bedeutung zugemessen werden. Für alle ARAs gleichermassen zutreffende Aussagen (generelle Vergrösserung der Lebern, Vitellogenininduktion, histologische Veränderungen usw.) über die Wirkung auf die Fische bzw. die Eientwicklung sind nicht möglich. Vielmehr müssen die Effekte für jede Kläranlage einzeln beurteilt werden.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material	1
2.1. Fischerei- und populationsbiologische Daten der Abfischungen	1
2.2. Sektion von Bachforellen	1
2.3. Histologische Leber- und Gonadenuntersuchungen	2
2.4. Vitellogenin Messungen	2
2.5. Morphologie der Vorfluter und Eigenschaften der Kläranlagen	2
2.6. Integrative Beurteilung der Untersuchungsparameter	2
3. Resultate	4
3.1. Vitellogeningehalt	4
☛ Gibt es eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses unterhalb derjenigen ARA, wo eine Vitellogenin-Induktion bei den männlichen Bachforellen festgestellt wurde?	4
3.2. Konditions-Index	4
☛ Ist die gesteigerte Kondition der Forellen unterhalb einiger ARAs eine Folge niedriger Bestandsdichten der Bachforellen?	4
3.3. Hepatosomaler Index (HSI)	5
☛ Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der HSI-Werte und Charakteristika der einleitenden ARAs und/oder morphologischen Eigenschaften der Vorfluter?	6
☛ Sind Unterschiede im HSI zwischen unterhalb und oberhalb der ARAs eine Folge der unterschiedlichen Nahrungsbedingungen?	6
3.4. Gonadosomaler Index	7
☛ Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der GSI-Werte und den Charakteristika der einleitenden ARAs und/oder den morphologischen Eigenschaften der Vorfluter?	8
☛ Zeichnen sich ARAs unterhalb welcher bei den Fischen ein veränderter GSI nachgewiesen wurde durch bestimmte Charakteristika aus?	8
☛ Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der verschiedenen biometrischen Indizes? ...	9
3.5. Histologie der Gonaden	10
3.6. Histologie der Leber	10
☛ Welche histologischen Veränderungen wurden bei hohen Leberindex-Werten vor allem beobachtet? ...	10
☛ In welchen Vorflutern wurden Forellen mit hohen Leberindex-Werten gefunden?	11
☛ Weisen Standorte mit niedrigen bzw. hohen Leberindex-Werten gemeinsame Eigenschaften der einleitenden Kläranlagen und / oder morphologische Eigenheiten der Vorfluter auf?	12
☛ Weisen ältere und somit länger exponierte Fische stärkere histologische Veränderungen auf?	13
☛ Geben biometrische Indizes (HSI, GSI und Konditionsindex) und makroskopische Beurteilungen Hinweise auf histologische Veränderungen?	14
☛ Besteht ein Unterschied zwischen den histologischen Ergebnissen unterhalb und oberhalb der ARAs?	14
☛ Wenn alle Forellen betrachtet werden, existiert kein Unterschied zwischen den Leberindex-Mittelwerten unterhalb und oberhalb der Kläranlage. Wie sieht es jedoch aus mit den Extremwerten? Gibt es unterhalb der Kläranlagen mehr hohe und weniger tiefe Leberindizes als oberhalb?	17
☛ Weisen Standorte mit deutlichen Unterschieden zwischen ober- und unterhalb der Kläranlage gemeinsame Eigenschaften der einleitenden Kläranlagen und / oder morphologische Eigenheiten der Vorfluter auf?	17
4. Fazit	16
5. Referenzen	22

1. Einleitung

Aufgrund zahlreicher Meldungen kantonaler Fischverwaltungen über rückläufige Bachforellenbestände (z.B. Frick et al., 1998; Friedl, 1999) sind in den letzten Jahren grosse Anstrengungen unternommen worden, Ursachen für diese negative Tendenz abzuklären. Bei mehreren Projekten wurden die Effekte von Abwasser aus Kläranlagen, welche oft zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Wasserqualität in den Vorflutern führen, auf den Gesundheitszustand von Bachforellen untersucht (Escher, 1997; Schmidt, 1998; Burkhardt-Holm, 1998; Bernet, 1999; Lamche, 1999). Nicht zuletzt aufgrund dieser Ergebnisse wurden in einem gross angelegten Monitoring die Effekte von 41 Abwasserreinigungsanlagen (ARA) auf die Fischbestände in den Vorflutern sowie auf den Gesundheitszustand und die Eientwicklung von Bachforellen untersucht (ARA-Projekt; Escher, 1999). Leber- und Gonadenproben der untersuchten Bachforellen wurden ans Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin (FIWI) am Tierspital Bern geschickt, um sie einerseits histologisch zu beurteilen, andererseits um Vitellogenininduktion bei männlichen Bachforellen mittels Immunhistochemie abzuklären.

Der vorliegende Bericht ist eine Synthese der fischereibiologischen, makro-pathologischen und biometrischen Daten des ARA-Projekts (Escher, 1999), der histologischen Leber- und Gonadenuntersuchungen (Burkhardt-Holm et al., 1999b) sowie der immunhistochemischen Vitellogeninmessungen (Burkhardt-Holm et al., 1999a). Die Ergebnisse werden in Verbindung mit den zur Verfügung stehenden Kenndaten der Kläranlagen und der Morphologie der Vorfluter gesetzt. Der Bericht enthält einerseits Ergänzungen zu und Vergleiche zwischen den oben erwähnten bestehenden Berichten, andererseits Schlussfolgerungen zum ganzen Projekt. In Form von Fragen, welche mit dem Symbol ➔ gekennzeichnet sind, werden in den einzelnen Unterkapiteln besonders interessante Zusammenhänge diskutiert.

2. Material und Methoden

2.1. Fischerei- und populationsbiologische Daten der Abfischungen (Escher, 1999)

Unter- und oberhalb von 41 Kläranlagen wurden mittels Elektrofischfang fischerei- und populationsbiologische Daten erhoben. Von diesen Abfischungen sind Informationen über Artzusammensetzung, Diversität (Simpson-Index), Populationsgrösse der Arten (effektive Anzahl sowie Hochrechnung auf ein Hektar produktiver Wasserfläche), Biomasse (Stückgewicht sowie Gewicht pro Hektar produktiver Wasserfläche) und Grössenstruktur der Bachforellenpopulationen vorhanden.

2.2. Sektion von Bachforellen (Escher, 1999)

Im Idealfall wurden von den abgefischten Fischen unter- und oberhalb der Kläranlagen je 10 adulte fangmässige Bachforellen seziiert. Wenn zuwenig adulte Fische zur Verfügung standen, wurden zusätzlich juvenile Forellen untersucht. Trotzdem wurde die Stichprobengrösse von 10 an folgenden Stellen nicht erreicht: Valangin (unterhalb ARA), Fenin Villars (unterhalb, oberhalb ARA), Holzmühle (u), Vulliens (u,o), Ruswil (o), Buttisholz (u), Eclubens (u,o), Surental (u,o), Eschenbach-Inwil (u,o), Engelberg (u,o), Altstätten (u,o), Wartau (u,o), Densbüren

(u,o), Teufenthal (u,o), Gossau (u,o), Märstetten (u), Kemmental (o), Appenzell (u), Chevilly (u), Brunnen (u,o) und Villars s/G (u,o). Insgesamt wurden 751 Bachforellen seziiert.

Die Forellen wurden gemessen und gewogen und daraus der Konditionsindex nach Fulton, der Hepatosomale Index (HSI; prozentualer Anteil des Lebergewichts am Gesamtgewicht des Fisches) und Gonadosomale Index (GSI; prozentualer Anteil des Gonadengewichts am Gesamtgewicht des Fisches) bestimmt. Ferner wurden alle patho-anatomischen Veränderungen vermerkt.

2.3. Histologische Leber- und Gonadenuntersuchungen (Burkhardt-Holm et al., 1999b)

Pro Standort wurden - wenn möglich - die Lebern von 3 männlichen Tieren nach einem standardisierten Schema histologisch bewertet. Die Hoden wurden auf das Auftreten von Ovotestis untersucht. Bei denjenigen Standorten, wo Vitellogenin-Induktion auftrat (Kap. 3.1), wurden die Lebern von allen männlichen Bachforellen untersucht. Insgesamt wurden Lebern von 187 und Gonaden von 183 männlichen Bachforellen unter- und oberhalb von 36 Kläranlagen in 30 Vorflutern analysiert. Bei den übrigen 5 ARAs wurden keine männliche Bachforellen gefangen.

2.4. Vitellogenin Messungen (Burkhardt-Holm et al., 1999a)

Pro Probestelle wurden drei männliche, adulte Fische untersucht. An Standorten mit zuwenig Bachforellen wurden auch juvenile männliche Bachforellen untersucht. Für die Vitellogeninmessungen wurde insgesamt Lebergewebe von 208 Fischen unter- und/oder oberhalb von 38 Kläranlagen immunhistochemisch auf eine Ja/Nein Antwort untersucht. Der Vitellogeningehalt der Vitellogenin positiven Fische sowie alle übrigen männlichen Forellen der Vorfluter, wo Vitellogenin positive Forellen auftraten, wurden densitometrisch quantifiziert (20 Fische unter- und oberhalb von 3 Kläranlagen).

2.5. Morphologie der Vorfluter und Eigenschaften der Kläranlagen (Escher, 1999)

An jedem Standort wurden folgende morphologische Parameter der Vorfluter erhoben: Talform, Linienführung, Gefälle, Strömung, Abstürze, Überdeckungen, Sohlensubstrat, Sohlenkolmation, heterotropher Bewuchs, Algen, Makrophyten, Totholz, Sohlenbeschattung durch Ufergehölze, Uferböschung, Umlandnutzung, Tiefen- und Breitenvarianz, Q_{347} , Abflussregime und geologischer Untergrund. Für die statistische Analyse wurden die Werte im Bericht Escher (1999) für Q_{347} der Vorfluter Vedeggio, Staffeleggbach, Surb und Wyna um den Faktor 1000 multipliziert, da es sich bei den tabellierten Werten um die Einheit m^3/s handelte und hier generell die Einheit l/s verwendet wurde.

Die Eigenschaften der Kläranlagen wurden mit folgenden Parametern erfasst: Einwohnergleichwerte, Anzahl Einwohner, Abwasserausfluss aus der Kläranlage (effektiv und dimensioniert), Reinigungsart, Fällungsmittel, Flockungsmittel im Abwasser und im Schlamm, Sauberwasseranteil und Abwasserverdünnung. Für die Einwohnergleichwerte wurden die Angaben des BUWALs für Abwasserreinigungsanlagen benutzt.

2.6. Integrative Beurteilung der Untersuchungsparameter

Um die Auswirkungen der Kläranlagen auf die Bachforellen integrativ werten zu können, wurden alle untersuchten Parameter in die Beurteilung einbezogen (Tab. 1). Durch den Vergleich ober- und unterhalb der einzelnen ARAs wurde bewertet, bei welchen Parametern ein negativer Effekt der ARA erkennbar war. Die

Entscheidungskriterien für die Beurteilung eines negativen Effekts der ARA auf die Bachforellen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Untersuchungsparameter, die für die integrative Bewertung der Effekte der ARAs auf die Bachforellen und Bachforelleneier berücksichtigt wurden mit den entsprechenden Entscheidungskriterien

Kategorien	Untersuchungsparameter	Entscheidungskriterien für die Beurteilung eines negativen Effekts der ARA
1) Population	Bachforellenbestand Gesamtfischbestand	Bewertungen Escher (1999) Bewertungen Escher (1999)
2) Biometrische Indizes	Konditionsindex	bei Fischen unterhalb der ARA um mind. 0.05 kleiner als oberhalb
	HSI adulter Männchen HSI adulter Weibchen	} bei Forellen unterhalb der ARA um mind. 0.1 unterschiedlich zu oberhalb bei gleichbleibendem Konditionsindex
	GSI adulter Männchen GSI adulter Weibchen	} bei Forellen unterhalb der ARA um mind. 1.0 unterschiedlich zu oberhalb bei gleichbleibendem Konditionsindex
3) Vitellogenin	Vitellogenin-Induktion bei Männchen	Induktion von Vitellogenin
4) Ovotestis	Ovotestis	Auftreten von Ovotestis
5) Histologie	Index histologischer Leberveränderungen	bei Fischen unterhalb der ARA um mind. 10 Index-Punkte höher als oberhalb
6) "Early life stage" - Test	Mortalität exponierter Bachforelleneier	Bewertung Escher (1999)
7) Makroskopische Organveränderungen	Leber Niere Gonaden	} Häufigkeit bei Forellen unterhalb der ARA um mind. 30% grösser als oberhalb

Der integrative Index negativer ARA Effekte berechnete sich aus der Summe der sieben Kategorien pro ARA. Da pro Kategorie eine unterschiedliche Anzahl Parameter gemessen wurde (z.B. biometrische Indizes: 5 Parameter, makroskopische Veränderungen: 3 Parameter, Histologie: 1 Parameter), wurde pro Kategorie der relative Anteil negativer Effekte der ARA errechnet (Tab. 4). Nachfolgend zwei Beispiele: Wenn ein negativer Effekt der ARA auf den Bachforellenbestand, jedoch nicht auf den Gesamtfischbestand nachgewiesen wurde (vgl. Tab. 3), wurde die Kategorie "Population" in Tabelle 4 für die entsprechende ARA mit einem relativen Wert von 0.5 belegt (1 Parameter von 2). Wenn bei den biometrischen Indizes ein negativer Effekt beim Konditionsindex und beim HSI adulter Männchen bestand (vgl. Tab. 3), wurde in Tabelle 4 in der Kategorie "Biometrie" ein Wert von 0.4 (2 Parameter von 5) bewertet.

Bei den ARAs mit einem Index "negativer Effekte" > 2 wurde angenommen, dass sie einen negativen Einfluss auf die Fische bzw. Fischeier haben; sie sind in Tabelle 4 mit dem Symbol ↓ bezeichnet. ARAs mit Indizes "negativer Effekte" zwischen 1 und 2 (Symbol ↘) werden als ARAs mit leichtgradigem negativen Effekt bezeichnet. ARAs mit einem Indizes "negativer Effekte" von < 1 (Symbol →) gelten als Standorte, bei denen kein negativer Effekt auf Fische und Eier nachgewiesen werden konnte. Eine Bewertung des Index "negativer Effekte" wurde nur bei denjenigen ARA vorgenommen, wo mindestens 5 von 7 Kategorien gemessen werden konnten.

3. Resultate

3.1. Vitellogeningehalt

Mittels immunohistochemischer Analysen wurde unterhalb von 4 Kläranlagen (Echallens, Eschenbach-Inwil, Mönchaltorf, Teufenthal) bei männlichen Bachforellen eine Induktion von Vitellogenin in der Leber nachgewiesen. Die Nachweisgrenze von Vitellogenin lag dabei bei $100\mu\text{g/g}$ Lebergewebe. Die Induktion von Vitellogenin bei männlichen Fischen deutet auf die Anwesenheit von östrogenaktiven Substanzen im Vorfluter hin. Ein Nachweis bei männlichen Fischen oberhalb der Kläranlagen konnte nicht erbracht werden.

☉ ***Gibt es eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses unterhalb derjenigen ARA, wo eine Vitellogenin-Induktion bei den männlichen Bachforellen festgestellt wurde?***

Sumpter (1995) vermutet, dass östrogenaktive Substanzen während eines bestimmten Zeitfensters im Brüttingsalter zu einer Beeinflussung der Geschlechtsdetermination führen können. Die Vitellogenin-Induktion bei männlichen Bachforellen unterhalb der vier ARAs Echallens, Eschenbach-Inwil, Mönchaltorf und Teufenthal deutet auf die Präsenz von östrogenaktiven Substanzen hin.

Mit den vorliegenden Daten kann keine Aussage über einen Zusammenhang zwischen einem verändertem Geschlechterverhältnis und östrogenaktiven Substanzen gemacht werden: Unterhalb der ARA Echallens war das Geschlechterverhältnis gleich wie oberhalb. Bei den ARAs Eschenbach-Inwil, Mönchaltorf und Teufenthal wurden unterhalb bzw. oberhalb weniger als 10 Fische abgefischt, so dass an diesen Standorten das Geschlechterverhältnis zu wenig aussagekräftig ist.

3.2. Konditions-Index

Aufgrund der erhobenen Daten der einzelnen ARAs wurde eine Differenz zwischen ober- und unterhalb von mindestens 0.05 Index-Punkten als auffällig beurteilt. Unterhalb von 4 ARAs (Aadorf, Eclubens, Engelberg, Märstetten) waren die Konditionsindizes der Forellen um mindestens 0.05 schlechter als oberhalb. Unterhalb von 8 ARAs (Appenzell, Buttisholz, Densbüren, Einsiedeln, Gossau, Ruswil, Sion-Châteauneuf, Vulliens) wiesen die gefangenen Forellen einen um mindestens 0.05 besseren Konditionsindex auf als Forellen oberhalb der ARA.

☉ ***Ist die gesteigerte Kondition der Forellen unterhalb einiger ARAs eine Folge niedriger Bestandsdichten der Bachforellen?***

Für einen besseren Konditionszustand der Forellen unterhalb der Kläranlagen gibt es 2 Hypothesen. Die erste Hypothese besagt, dass durch die Einleitung von geklärtem Abwasser der ARAs das Nährstoffangebot im Vorfluter verbessert wird und als Folge davon sich das Nahrungsangebot für die Fische erhöht. Diese Hypothese kann mit den vorliegenden Daten nicht überprüft werden. Die zweite Hypothese nimmt an, dass durch den Eintrag von Schadstoffen die Mortalität der Forellen erhöht bzw. die Reproduktion reduziert ist, so dass für die restlichen Forellen aufgrund der reduzierten Dichte mehr Nahrung zur Verfügung steht (Adams et al., 1996). An 6 (Appenzell, Buttisholz, Gossau, Ruswil, Sion-Châteauneuf, Vulliens) der 8 Standorte mit grösserem Konditions-Index unterhalb der ARAs war die Bestandsdichte der Bachforellen unterhalb der ARAs tatsächlich 10 bis 75% geringer als oberhalb. Diese Befunde würden also die zweite Hypothese stützen. Unklar bleibt, ob die reduzierte Bestandesdichte unterhalb der ARA eine Folge des eingeleiteten Abwassers ist. Die Ergebnisse der beiden

anderen Standorte mit grösserem Konditions-Index unterhalb als oberhalb (ARAs Densbüren und Einsiedeln) bestätigten nicht die Hypothese. Beide wiesen unterhalb der ARA höhere Bestandszahlen auf als oberhalb (23 bzw. 259%). Die grösseren Dichteverhältnisse in diesen Vorflutern könnten jedoch bedingt sein durch die besseren morphologischen Verhältnisse unterhalb dieser ARAs.

Im Gegensatz zu den Standorten mit grösseren Konditionsindizes unterhalb der ARAs konnte an 3 der 4 Standorte mit kleinerem Konditionsindex unterhalb der ARAs (Eclubens, Engelberg, Märstetten) keine dichteabhängige Beziehung nachgewiesen werden.

3.3. Hepatosomaler Index (HSI)

Der HSI weist nachgewiesenermassen geschlechtsspezifische Unterschiede auf (Goede & Barton, 1990). Bei Weibchen wird in der Leber Vitellogenin gebildet, das Vorläuferprotein des Eidotters. In der Zeit vor dem Laichen weisen Weibchen einen erhöhten HSI auf, so dass schadstoffbedingte Veränderungen im HSI schwer erkennbar sind. Ausserdem wurde nachgewiesen, dass Schadstoffe in Lebern männlicher Fische andere Veränderungen bewirken als bei weiblichen Tieren (z.B. Braunbeck et al., 1989; Phromkunthong et al., 1994).

Bei den adulten weiblichen Tieren wurden denn auch keine eindeutigen Tendenzen im HSI festgestellt. Unterhalb 7 ARAs waren die HSI der Weibchen grösser (Aadorf, Boveresse, Dizy, Einsiedeln, Hagnau-Birsfelden, Seuzach, St. Imier) und unterhalb 12 ARAs kleiner als oberhalb (Chevilly, Court SECOR, Densbüren, Echallens, Egg-Oetwil, Engelberg, Kemmental, Konolfingen, Mönchaltorf, Sion-Châteauneuf, Teufenthal, Zwingen).

Bei den adulten männlichen Tieren zeigte Escher (1999), dass unterhalb der ARAs die mittleren HSI der adulten männlichen Bachforellen häufig höher sind als oberhalb. Bei 14 Standorten wiesen die männlichen Bachforellen unterhalb der ARAs einen um mindestens 0.1 Index-Punkte höheren HSI auf als Bachforellen oberhalb der ARA. Wogegen nur an drei Standorten der HSI der Bachforellen oberhalb der ARAs grösser war als unterhalb.

Der HSI kann durch verschiedene Stressfaktoren beeinflusst werden: Schadstoffe sind meist beschrieben, eine Erhöhung des HSI zu bewirken (z.B. Poels et al., 1980; Goede & Barton, 1990; Heath, 1995). Die Gewichtszunahme der Leber basiert dabei auf einer Zunahme der Zellzahl oder einer Vergrösserung der Zellvolumina. Mehrere Studien haben auch nachgewiesen, dass bei Fischen unterhalb von Papierfabriken dem gesteigerten HSI eine erhöhte Entgiftungsaktivität (EROD) zugrunde liegt (z.B. Munkittrick et al., 1992). Andersson et al. (1988) nahmen an, dass dabei die Gewichtszunahme auf eine Vermehrung des glatten endoplasmatischen Retikulums zurückzuführen ist, das dem Fisch eine gesteigerte Proteinproduktion zur Entgiftung ermöglicht.

Die Interpretation der HSI gestaltet sich jedoch schwierig, weil verschiedene andere Chemikalien (z.B. Larsson et al., 1984; Kiceniuk & Khan, 1987), Säurestress (Lee et al., 1983) und sogar veränderten Abflussverhältnissen (Barnes et al., 1984) auch als Faktoren beschrieben sind, bei Fischen zu einer Reduktion des HSI zu führen.

☛ **Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der HSI-Werte und Charakteristika der einleitenden ARAs und/oder morphologischen Eigenschaften der Vorfluter?**

Ein Zusammenhang zwischen der Differenz des HSI adulter Männchen unter- und oberhalb der ARA und dem Abwasseranteil der Kläranlagen bzw. deren Belastungsstärke konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 1). Bei den Weibchen zeigte sich, dass die HSI der Fische in Vorflutern von grossen ARAs oder ARAs mit schlechtem Verdünnungsverhältnis tendenziell kleiner waren als die HSI der Fische in Vorflutern von kleinen ARAs oder ARAs mit gutem Verdünnungsverhältnissen.

Bei beiden Geschlechtern zeigten die Daten eine tendenziell negative Korrelation zwischen HSI und Anteil an Sand und Steinen in der Gewässersohle. Neben besserer Filtration von Schadstoffen aus dem Wasserkörper durch eine sandreiche Gewässersohle sind auch unterschiedliche Nahrungsverhältnisse, die ihrerseits mit der Sohlenstruktur in Verbindung stehen, denkbare Ursachen.

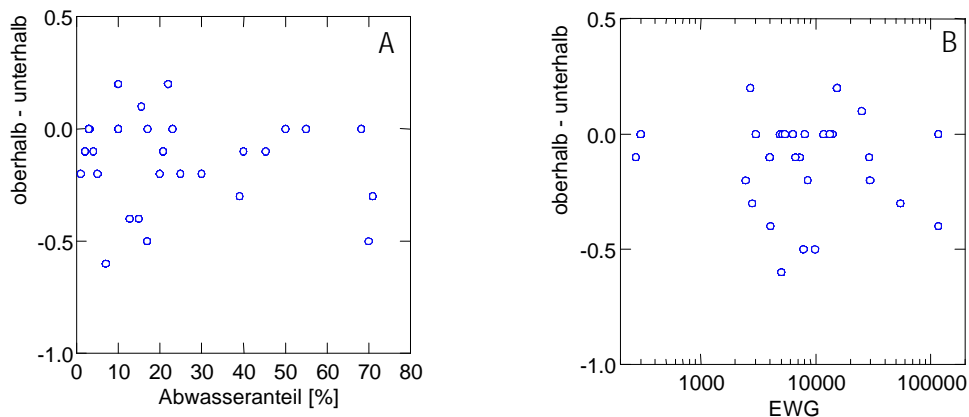


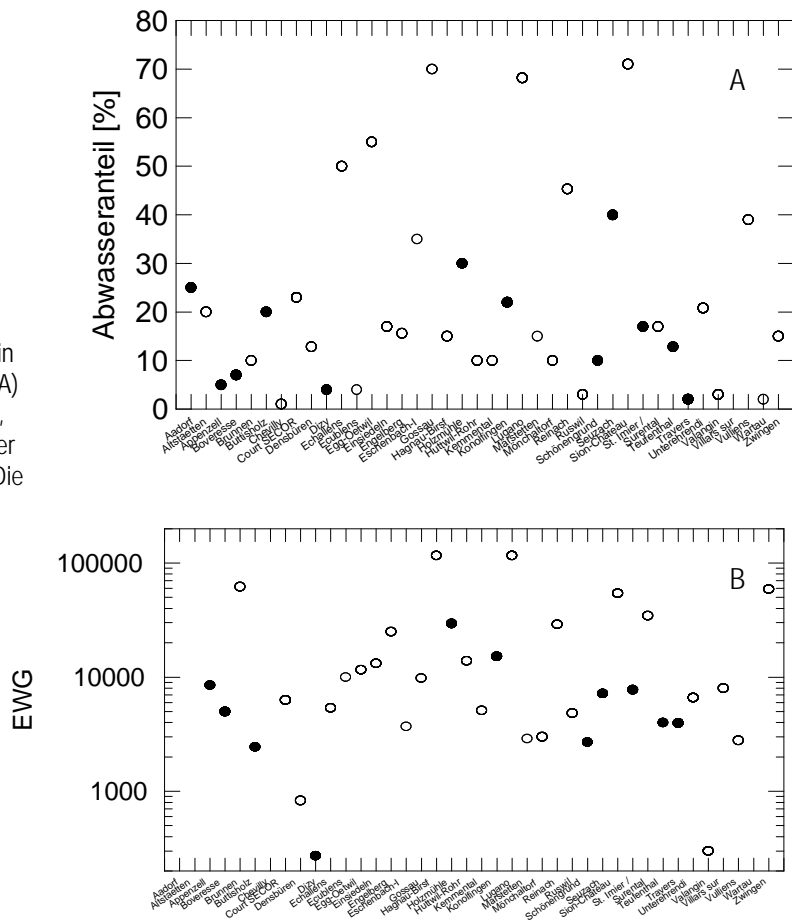
Abb. 1: Differenz des mittleren HSI der adulten Männchen zwischen unterhalb und oberhalb der ARAs in Abhängigkeit des Abwasseranteils im Vorfluter (A) und der Belastungsstärke der ARAs (B), ausgedrückt als Einwohnergleichwerte (EWG). Werte auf der Y-Achse kleiner Null bedeuten, dass der HSI unterhalb der ARA grösser war als oberhalb der entsprechenden ARA.

☛ **Sind Unterschiede im HSI zwischen unterhalb und oberhalb der ARAs eine Folge der unterschiedlichen Nahrungsbedingungen (vgl. Kap. 3.2.) ?**

Der HSI steht in Zusammenhang mit dem Nährzustand der Tiere. Hungerperioden bewirken bei Forellen einen kleineren HSI. Gut genährte Tiere weisen einen höheren HSI auf (Haider, 1984; Goede & Barton, 1990). Diese Resultate wurden mit den vorliegenden Daten bestätigt (Kap. 3.4.). Der Zusammenhang beruht auf der Speicherung von Glykogen, einer Energiespeicherform in der Leber.

Um einen Einfluss des Nährzustandes auf die unterschiedlichen HSI der adulten männlichen Forellen unter- und oberhalb der ARAs auszuschliessen (vgl. S. 5), sind vor allem diejenigen Standorte von Interesse, bei denen der Konditionsindex der Forellen unter- und oberhalb der ARAs gleich war (Differenz < 0.05 Index-Punkte). Es handelte sich dabei um die ARAs Aadorf, Appenzell, Boveresse, Buttisholz, Dizy, Holzmühle, Konolfingen, Schönengrund, Seuzach, St.Imier/Villeret, Teufenthal und Travers. Diese ARAs zeichnen sich nicht durch eine bestimmte Grösse oder einen bestimmten Abwasseranteil aus (Abb. 2).

Abb. 2: Hepatosomaler Index (HSI) in Abhängigkeit des Abwasseranteils (A) und der Belastungsstärke der ARAs, (B) ausgedrückt als EWG im Vorfluter unterhalb der Kläranlageneinläufe. Die schwarzen Punkte kennzeichnen diejenigen ARAs, unterhalb welcher der HSI der adulten männlichen Forellen um mehr als 0.1 Index-Punkte grösser bzw. kleiner war als oberhalb, und der Konditionsindex der Forellen unterhalb demjenigen oberhalb der ARA entsprach. Der Abwasseranteil von Villars s/G und die EWG von Aadorf, Altstätten, Chevilly und Wartau sind nicht bekannt.



3.4. Gonadosomaler Index

Männliche mit Östrogen behandelte Fische weisen einen reduzierten GSI auf (Chang et al., 1995; Panter et al., 1998). Diese Reduktion gründete in einer supprimierten Hodenentwicklung und Spermatogenese aufgrund einer gehemmten Testosteronproduktion.

Reduzierte GSI (um mind. 1 Index-Punkt) wurden bei adulten männlichen Bachforellen unterhalb der 4 ARAs Engelberg, Hagnau-Birsfelden, Teufenthal und Villars s/G nachgewiesen. Unterhalb einer dieser Kläranlagen (Teufenthal) wurde bei einem Männchen eine Induktion von Vitellogenin nachgewiesen (Kap. 3.1.), was auf die Anwesenheit östrogenaktiver Substanzen an diesem Standort hinweist. Unterhalb der ARAs Echallens und Mönchaltorf, wo ebenfalls bei männlichen Bachforellen Vitellogenin in der Leber nachgewiesen wurde, war der GSI der Fische unterhalb und oberhalb der ARAs unverändert. Bei der ARA Eschenbach-Inwil, dem vierten Standort mit Vitellogenin-Nachweis bei den männlichen Forellen, entfällt ein Vergleich des GSI unterhalb und oberhalb, weil oberhalb keine Bachforellen gefangen wurden.

Unterhalb von 12 ARAs (Aadorf, Appenzell, Dizy, Egg-Oetwil, Gossau, Holzmühle, Huttwil-Rohrbach, Kemmental, Reinach, St.Imier/Villeret, Unterehrendingen, Valangin) wiesen adulte männliche Tiere einen GSI auf, der mehr als 1 Index-Punkt grösser war als bei den Tieren oberhalb der entsprechenden ARA.

Bei den adulten weiblichen Tiere wurden keine einheitlichen Effekte des ARA-Abwassers auf den GSI nachgewiesen. Bei 11 ARAs (Appenzell, Buttisholz, Court SECOR, Dizy, Echallens, Einsiedeln, Engelberg, Huttwil-Rohrbach, Schönegrund, St.Imier/Villeret, Zwingen) war der GSI der Fische unterhalb um mindestens 1 Index-Punkt grösser und bei 11 ARAs (Aadorf, Chevilly, Egg-Oetwil, Gossau, Hagnau-Birsfelden, Kemmental, Reinach, Sion-Châteauneuf, Teufenthal, Travers, Valangin) um mindestens 1 Index-Punkt kleiner als bei den Fischen oberhalb der ARA. Der GSI der beiden Geschlechter änderte sich unterhalb identischer ARAs teilweise in entgegengesetzter Richtung. Unterhalb der ARAs Aadorf, Egg-Oetwil, Gossau, Kemmental, Reinach und Valangin waren die GSI der Männchen grösser als oberhalb, während diejenigen der Weibchen kleiner waren.

➔ Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der GSI-Werte und den Charakteristika der einleitenden ARAs und/oder den morphologischen Eigenschaften der Vorfluter?

Bei den adulten männlichen Tieren konnten keine Zusammenhänge zwischen dem GSI und den Charakteristika der ARA und des Vorfluters gefunden werden. Bei den adulten Weibchen war der GSI bei grösserem Q_{347} , erhöhtem Sandgehalt und Steinanteil im Vorfluter, schlechterem Verdünnungsverhältnis und grösserer Belastungsstärke der ARA tendenziell niedriger.

➔ Zeichnen sich ARAs, unterhalb welcher bei den Fischen ein veränderter GSI nachgewiesen wurde, durch bestimmte Charakteristika aus?

Um einen Einfluss des Nährzustandes auf den GSI ausschliessen zu können sind vor allem diejenigen Standorte von Interesse, bei denen die Forellen unter- und oberhalb der ARAs keinen veränderten Konditionszustand, jedoch einen veränderten GSI aufwiesen. Ein Unterschied im GSI zwischen ober- und unterhalb von mindestens 1 Index-Punkt wurde anhand der erhobenen Daten der einzelnen ARAs als sensitiv empfunden. Bei den adulten Männchen handelte es sich dabei um die ARAs Aadorf, Appenzell, Dizy, Holzmühle, Huttwil/Rohrbach, Kemmental, Reinach, St.Imier/Villeret, Teufenthal, Unterehrendingen, Valangin und Villars s/G. Diese ARAs weisen bezüglich Abwasserverdünnung und Belastungsstärke keine Charakteristika auf, die von den anderen Anlagen verschieden sind (Abb. 3 und Abb. 4).

Abb. 3: Gonadosomaler Index (GS) in Abhängigkeit des Abwasseranteils im Vorfluter unterhalb der Kläranlageneinläufe der ARAs. Die schwarzen Punkte kennzeichnen diejenigen ARAs, unterhalb welcher der GSI adulter Männchen um mehr als 1 Index-Punkt grösser bzw. kleiner war als oberhalb, der Konditionsindex der Forellen unterhalb demjenigen oberhalb der ARA entspricht. Der Abwasseranteil von Villars s/G ist nicht bekannt.

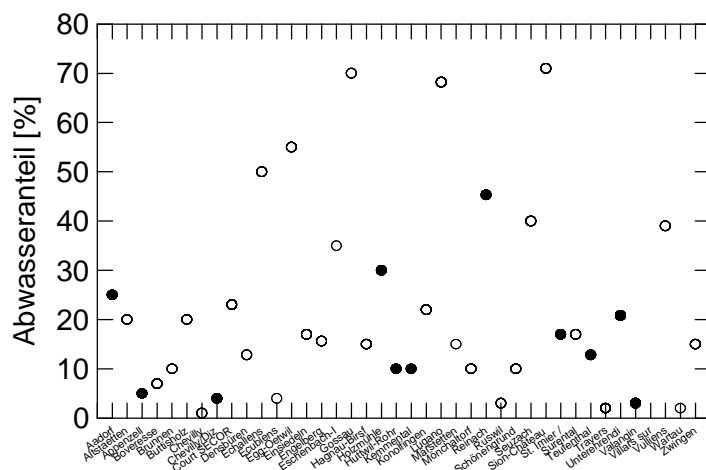
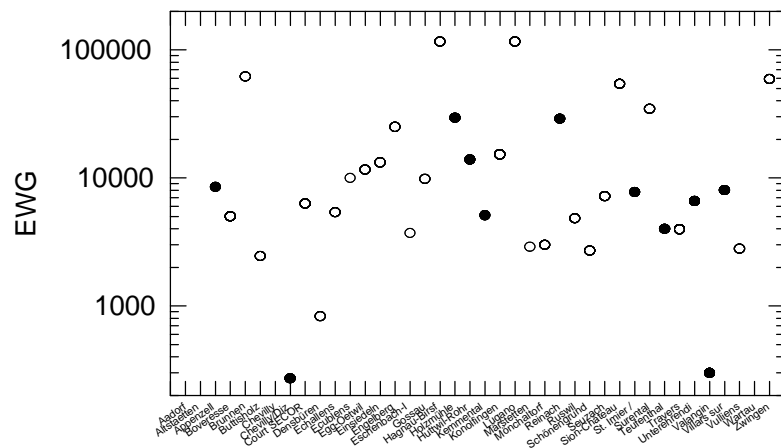


Abb. 4: Gonadosomaler Index (GSI) in Abhängigkeit der Belastungsstärke der ARAs ausgedrückt als EWG. Die schwarzen Punkte kennzeichnen diejenigen ARAs, unterhalb welcher der GSI adulter Männchen um mehr als 1 Index-Punkt grösser bzw. kleiner war als oberhalb, der Konditionsindex der Forellen unterhalb demjenigen oberhalb der ARA entsprach. Die Belastungsstärke der ARAs Aadorf, Altstätten, Chevilly und Wartau ist nicht bekannt.



☛ Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der verschiedenen biometrischen Indizes?

Der GSI adulter Männchen korrelierte negativ mit der Länge der Tiere (Spearman; $n=324$; $r=-0.31$; $P<0.001$). Grössere Männchen hatten also verhältnismässig kleinere GSI als kleinere Männchen (Abb. 5A). Dies konnte sowohl bei den Tieren oberhalb als auch unterhalb der Kläranlagen beobachtet werden. Bei den Weibchen war es gerade umgekehrt: Grössere Weibchen hatten verhältnismässig grössere GSI als kleinere Forellen (Spearman; $n=319$; $r=0.29$; $P<0.001$). Entsprechende Befunde konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Der HSI adulter Männchen korrelierte positiv mit dem Konditionszustand der Fische (Spearman; $n=324$; $r=0.27$; $P<0.001$). Fische mit gutem Nährzustand hatten einen höheren HSI als schlecht genährte Fische (Abb. 5B). Bei den weiblichen Forellen wurden die gleichen Zusammenhänge nachgewiesen (Spearman; $n=319$; $r=0.36$; $P<0.001$). Der HSI ist abhängig vom Nährzustand der Tiere, da in der Leber Energie in Form von Glykogen gespeichert wird. Schlecht genährte Forellen haben einen kleineren HSI, gut genährte einen höheren HSI (Haider, 1984; Goede & Barton, 1990).

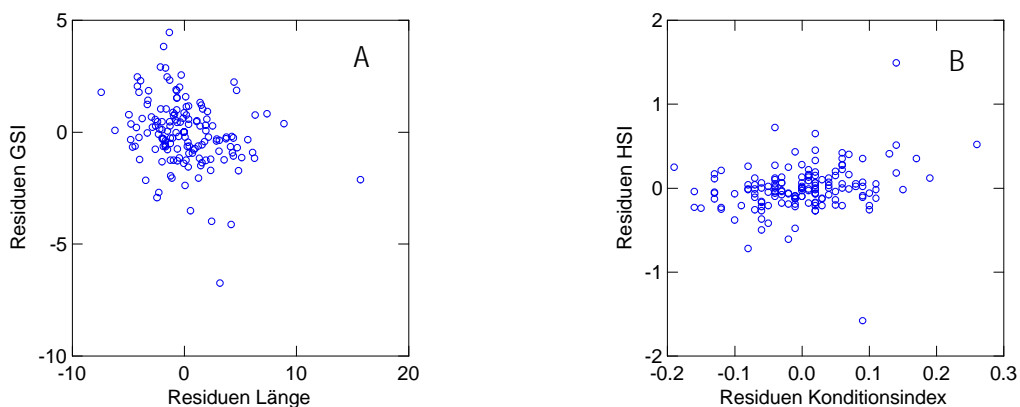


Abb. 5: Zusammenhang zwischen gonadosomalem Index (GSI) und Länge der Tiere (A) sowie hepatosomalem Index (HSI) und Konditionsindex (B). Dargestellt sind die Residuen, um Niveauunterschiede zwischen den einzelnen Vorflutern zu umgehen.

3.5. Histologie der Gonaden

Bei den untersuchten Gonaden (n=183) wurden keine Anzeichen für Ovotestisbildung beobachtet.

3.6. Histologie der Leber

Die Leberindizes der untersuchten Fische (n=187) streuten zwischen 7 und 52 (Abb. 6). Der Mittelwert (\pm SD) lag bei 27 (\pm 9.6). Das 95%-Vertrauensintervall des Mittelwertes streute zwischen 25.5 und 28.3. Die Verteilung der Daten ist statistisch nicht normalverteilt (Kolmogoroff-Smirnov-Test; $P_{\text{Lilliefors}}=0.02$).

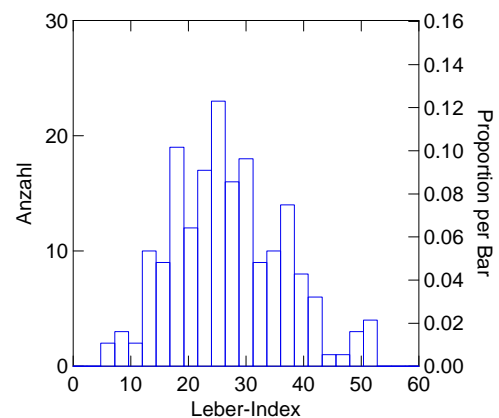


Abb. 6: Verteilungshistogramm der Leberindex-Werte

☛ Welche histologischen Veränderungen wurden bei hohen Leberindex-Werten vor allem beobachtet?

Der Anteil der kategoriellen Veränderungen (zirkulatorisch, regressiv, progressiv, entzündlich und tumorös) am Leberindex-Wert änderte sich nicht mit der Grösse der Leberindizes (Abb. 7). Dies bedeutet, dass höhere Leberindex-Werte nicht aufgrund der relativen Zunahme einer bestimmten Veränderungskategorie (z.B. hoher relativer Anteil von progressiven Veränderungen bei PKD-Erkrankungen) auftraten.

Regressive Veränderungen bildeten den grössten Anteil am Leberindex (ca. 65%). Die Höhe der Leberindex-Werte wurde somit vorwiegend durch das Auftreten und die Ausprägung von regressiven Veränderungen bestimmt. Dabei spielten vor allem Architekturveränderungen und Nekrosen in Hepatozyten und Gallengangszellen, sowie Kernveränderungen in Hepatozyten eine tragende Rolle (Tab. 2). Der relative Anteil von progressiven Veränderungen am Leberindex betrug rund 20%. Häufige progressive Veränderungen waren Gallengangssprossungen. Bei den Entzündungsreaktionen (rund 10%) sind Infiltrationen zu nennen (Tab. 2). Zirkulationsstörungen und Tumore spielten nur eine marginale Rolle für den Leberindex-Wert.

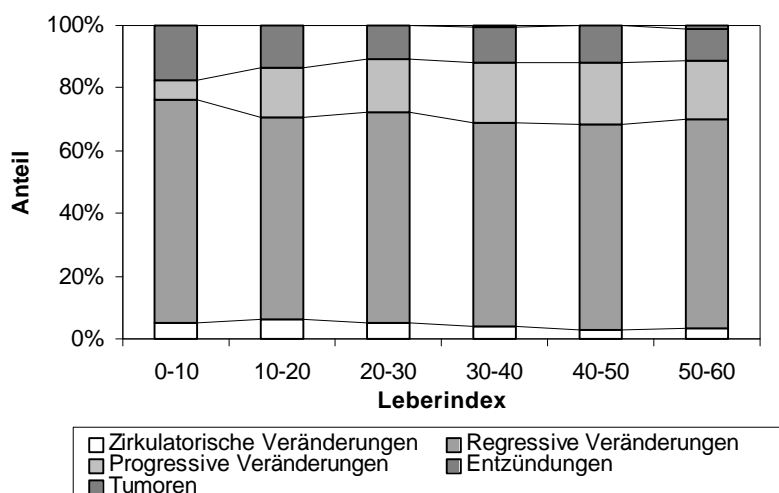


Abb. 7: Relativer Anteil der Veränderungskategorien (zirkulatorisch, regressiv, progressiv, entzündlich und tumorös) am Leberindex.

Tab. 2: Relativer Anteil bedeutender Veränderungen am Leberindex-Wert und Häufigkeit dieser Veränderungen unterhalb und oberhalb der ARAs sowie das Relative Risiko (RR) dieser Veränderungen unterhalb der ARAs häufiger aufzutreten als oberhalb (RR>0) oder umgekehrt (RR<0). n=187.

Art der Veränderung	Anteil am Leber-Index		Häufigkeit		
	%		unterhalb	oberhalb	RR
Regressive Veränderungen					
Architekturveränderung der Hepatozyten	9.5		97.9	97.8	1.0
Plasmaveränderungen der Hepatozyten	8.9		97.9	95.7	1.0
Kernveränderungen der Hepatozyten	13.0		93.6	93.5	1.0
Nekrosen der Hepatozyten	16.0		80.9	74.2	1.1
Progressive Veränderungen					
Hyperplasie der Gallengänge	8.2		51.1	57.0	0.9
Entzündungsreaktionen					
Infiltration mit Entzündungszellen	8.7		75.5	66.7	1.1

☛ In welchen Vorflutern wurden Forellen mit hohen Leberindex-Werten gefunden?

Als "hohe" Leberindizes wurden diejenigen Werte bezeichnet, welche einen höheren Indexwert als das 75%-Quantil aufwiesen. Dies sind diejenigen 25% der Tiere (47 Stk.) mit den höchsten Indizes. Das 75%-Quantil liegt bei 33 Indexpunkten.

Fische mit einem Leberindex > 33 kommen in 22 von 30 Vorflutern vor (73%), in denen Bachforellen histologisch untersucht wurden. Fische mit hohen Leberindizes waren also weit verbreitet. Es gibt keine Hinweise, dass hohe Leberindex-Werte besonders unterhalb von Kläranlagen auftraten. Hohe Indizes wurden auch oberhalb von Kläranlagen beobachtet. Hohe Gruppenmittelwerte (Index > 33) wurden oberhalb von 9 Kläranlagen (Dizy, Engelberg, Holzmühle, Märstetten, Mönchaltorf, St.Imier/Villeret, Travers, Valangin, Vulliens) und unterhalb von 6 Kläranlagen (Kemmental, Mönchaltorf, St. Imier, Travers, Villars s/G, Vulliens) gefunden (vgl. Abb. 14). Bei 4 der

6 Standorten mit hohen Gruppenmittelwerten unterhalb ARA traten jedoch bereits oberhalb der Kläranlage hohe Gruppenmittelwerte auf.

Vorfluter, in denen keine Forellen mit hohen Leberindizes auftraten, waren Alp, Lützelburg, Kanal Sion-Riddes, Staffeleggbach, Suhre, Talent, Tüfenbach und Vedeggio. Mit Ausnahme der Suhre ($Q_{347} = 1170$ l/s) und der Lützelburg ($Q_{347} = 550$ l/s) haben diese Vorfluter kleine Abflussregime ($Q_{347} < 300$ l/s).

☛ **Weisen Standorte mit niedrigen bzw. hohen Leberindex-Werten gemeinsame Eigenschaften der einleitenden Kläranlagen und / oder morphologische Eigenheiten der Vorfluter auf?**

Sowohl niedrige als auch hohe Leberindex-Gruppenmittelwerte sind nicht mit Belastungsstärke und Verdünnungsgrad der ARAs in Verbindung zu bringen. Hohe Leberindizes wurden auch unterhalb von Kläranlagen-Ausflüssen (Kemmental, Mönchaltorf, St.Imier/Villeret, Travers, Villars s/G, Vulliens) gefunden, die mässig bis gute Verdünnungsverhältnisse (Abwasseranteile 2-39%) und geringe Belastungsstärke (2791 bis 7750 EWG) aufwiesen (Abb. 8). Gleichzeitig wurden unterhalb von grossen ARAs (Belastung: 22'500 bis 186'600 EWG; Engelberg, Holzmühle, Lugano, Reinach, Sion-Châteauneuf, Surental) und ARAs mit einem schlechten Verdünnungsverhältnis (Abwasseranteile: 45-71%; Echallens, Egg-Oetwil, Gossau, Lugano, Reinach, Sion-Châteauneuf) Fische beprobt, die leicht- bis mittelgradige Leberveränderungen aufwiesen. Aufgrund der Grösse der ARA und der Verdünnung des Abwasser lässt sich somit nicht auf die Stärke der histologischen Leberveränderungen der Forellen unterhalb der ARAs schliessen. Auch wenn sowohl Grösse der ARA als auch Verdünnung des Abwassers zusammen mit den Leberindizes betrachtet werden, kann kein Zusammenhang zwischen diesen drei Parametern erkannt werden (Abb. 9). Vielmehr dürfte sich die Qualität des Abwassers entscheidend auf die histologischen Leberveränderungen auswirken. Leider liegen jedoch diesbezüglich in den zur Verfügung stehenden Daten keine Angaben vor.

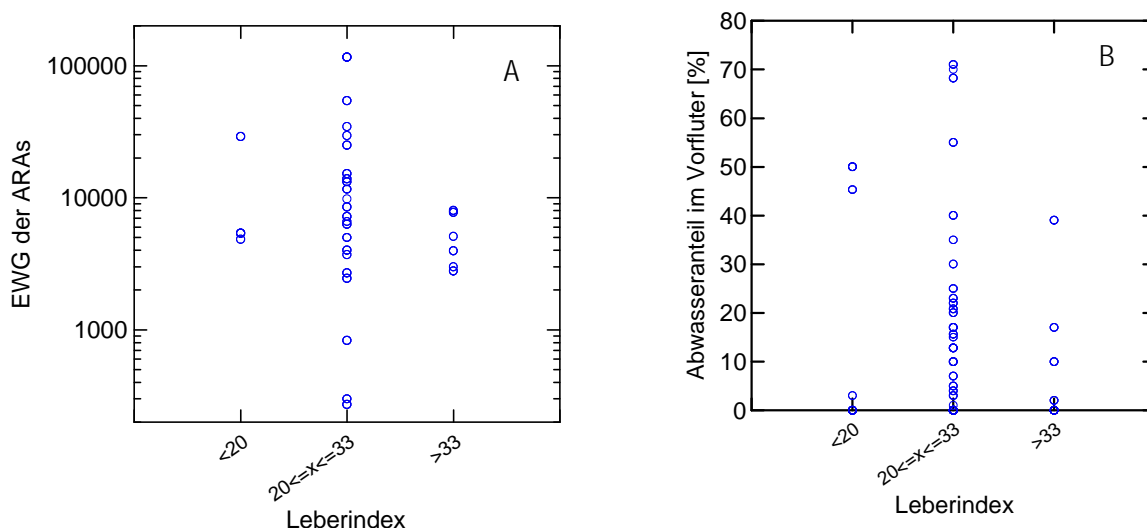
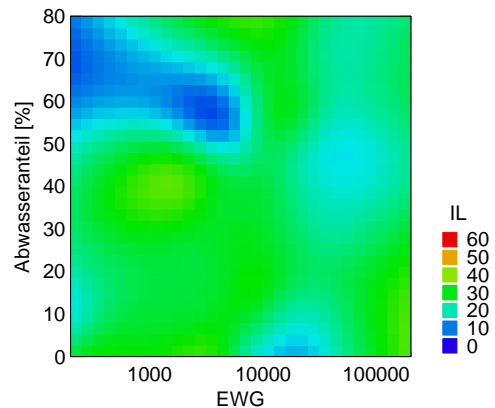


Abb. 8: Beziehung zwischen Leberindex und Belastungsstärke der ARAs (angegeben in Einwohnergleichwerten [EWG]; A) sowie Verdünnung des Abwasser durch den Vorfluter (angegeben als Abwasseranteil im Vorfluter; B). Die Leberindizes sind anhand der Gruppenmittelwerte pro Standort in drei Gruppen eingeteilt.

Abb. 9: Leberindexwerte (IL) in Abhängigkeit von Abwasseranteil und Grösse der ARAs (dargestellt als Belastung in Einwohnergleichwerten [EWG]). Die Farbgebung entspricht der durchschnittlichen Höhe der Leberindex der entsprechenden Kombination von Abwasseranteil und EWG. Die blauen Bereiche kennzeichnen Leber-Indexwerte von 0 bis 20. Diese Bereiche befinden sich in der vorliegenden Grafik jedoch an Stellen, deren Kombinationen von Abwasseranteil und EWG nicht vorkamen. Die grünen Bereiche kennzeichnen Leberindizes von 30 bis 40.



Unter den morphologischen Eigenheiten der Vorfluter zeigte sich einzig beim Sandanteil in der Gewässersohle eine leichtgradige Tendenz, sich auf die Leberwerte auszuwirken (Abb. 10). Inwieweit zwischen diesen beiden Parametern ein funktionaler Zusammenhang besteht bleibt unklar. Möglicherweise ist ein hoher Anteil von Sand in der Gewässersohle verbunden mit einem grösseren Potenzial, Schadstoffe aus dem Wasserkörper zu filtern und zu binden. Vielleicht ist die negative Korrelation jedoch eine Folge der kleineren Stichprobengrösse an Standorten mit höherem Sandanteil, so dass an diesen Standorten nicht die ganze Variationsbreite der Leberindizes erfasst werden konnte.

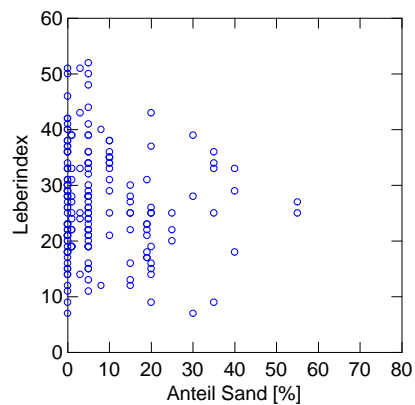
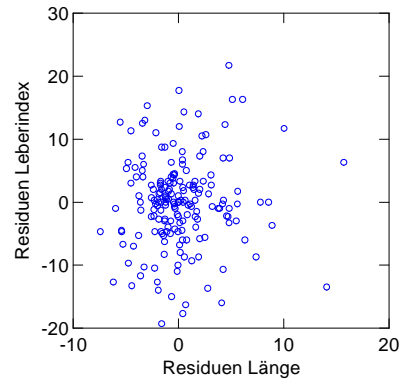


Abb. 10: Leberindex in Abhängigkeit zum Sandgehalt in der Gewässersohle

➡ **Weisen ältere und somit länger exponierte Fische stärkere histologische Veränderungen auf?**

Als Richtwert für das Alter der Tiere wurde die Länge der Tiere herangezogen. Im Gegensatz zu Ergebnissen aus Untersuchungen von Forellen aus dem St. Galler Rheintal (Wahli & Girling, in Vorb.) konnte keine Abhängigkeit der histologischen Leberveränderungen von der Grösse der Fische nachgewiesen werden (Abb. 11).

Abb. 11: Residuen der Leber-Indexwerte in Abhängigkeit der Länge der Forellen. Dargestellt sind die Residuen (Wert eines Individuums minus Mittelwert des Parameters am entsprechenden Standort). Damit können Standortunterschiede (z.B. grössere Fische in grösseren Gewässern) umgangen werden.



☛ **Geben biometrische Indizes (HSI, GSI und Konditionsindex) und makroskopische Beurteilungen Hinweise auf histologische Veränderungen?**

Der einzige Zusammenhang zwischen der Stärke der histologischen Leberveränderungen und den biometrischen Indizes wurde beim HSI gefunden (Abb. 12). Der Leberindex der Tiere mit kleinerem HSI war signifikant höher (Spearman; $r=-0.28$, $n=183$, $P<0.01$).

Eine Einschätzung der histologischen Leberindex-Werte aufgrund der makropathologischen Ergebnisse war nicht möglich.

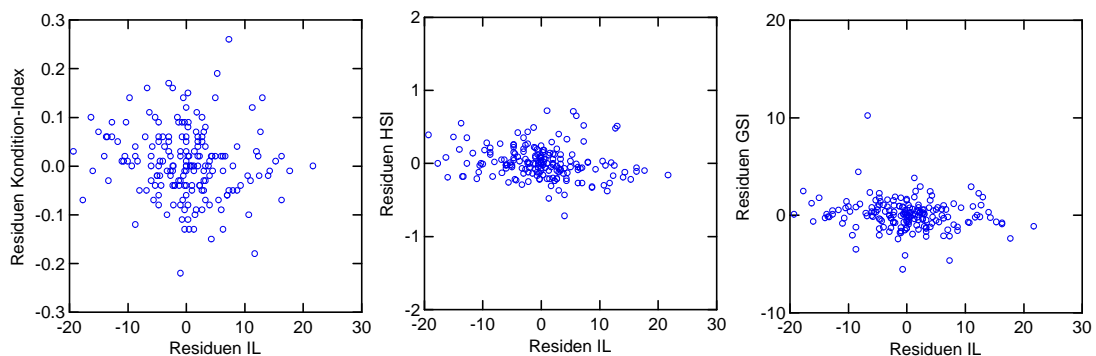
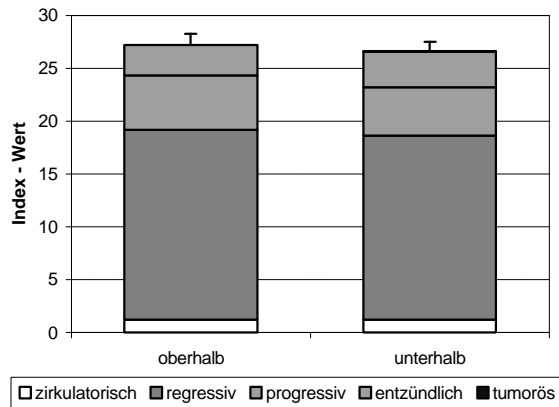


Abb. 12: Zusammenhang zwischen Leberindex (IL) und den drei biometrischen Indizes Konditions-Index, hepatosomaler Index (HSI) und gonadosomaler Index (GSI). Dargestellt sind die Residuen (Wert eines Individuums minus Mittelwert des Parameters am entsprechenden Standort) um standörtliche Niveauunterschiede zu umgehen.

☛ **Besteht ein Unterschied zwischen den histologischen Ergebnissen unterhalb und oberhalb der ARAs?**

Wie bereits Burkhardt-Holm et al. (1999b) gezeigt haben, unterschied sich der Mittelwert der Leberindex-Werte der Fische unterhalb der ARAs nicht von denjenigen oberhalb. Ebenso konnten keine Unterschiede auf Ebene der Kategorien-Indizes zwischen oberhalb und unterhalb der ARAs gefunden werden (Abb. 13). Auf Ebene der einzelnen Veränderungen konnte bei Fischen unterhalb von Kläranlagen einzig ein erhöhtes relatives Risiko ($RR=1.5$) für Nekrosen in Gallengangszellen nachgewiesen werden (Häufigkeit dieser Veränderung unterhalb der ARAs: 18.1%; oberhalb der ARAs: 11.8%).

Abb. 13: Mittelwert und Standardfehler des Leberindex von Forellen oberhalb und unterhalb der ARAs, aufgetrennt in die Kategorien-Indizes zirkulatorische, regressive, progressive, entzündliche und tumoröse Veränderungen.



Werden jedoch für jede Kläranlage die histologischen Ergebnisse für sich betrachtet (gepaarter Vergleich), werden Unterschiede zwischen ober- und unterhalb der ARA festgestellt. Aufgrund der kleinen Stichprobengrößen pro Standort konnten jedoch keine statistischen Berechnungen durchgeführt werden. Die histologischen Ergebnisse oberhalb und unterhalb der ARAs wurden grafisch verglichen (Abb. 14). Aufgrund der grossen Varianz der Daten und der kleinen Stichprobengröße wurden Unterschiede zwischen ober- und unterhalb der ARAs als auffallend beurteilt, wenn sich die Mittelwerte um mindestens 10 Index-Punkte unterschieden.

Anhand der vorliegenden Daten wurde unterhalb der Kläranlagen Hagnau-Birsfelden, Kemmental und Villars sur Glâne ein Einfluss auf den Leberindex vermutet (Abb. 14). Bei 21 ARAs konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Standorten unterhalb und oberhalb gefunden werden. Von diesen Standorten fallen vor allem Mönchaltorf, St. Imier/Villeret, Travers und Vulliens mit hohen Mittelwerten unterhalb und oberhalb der ARA auf. Unterhalb von 7 Kläranlagen wiesen Fische einen Gruppenmittelwert auf, der um mehr als 10 Index-Punkte kleiner war als derjenige der Fische von oberhalb. Dabei von einem "positiven" Effekt durch Kläranlagenabwasser zu sprechen wäre verfehlt, da oberhalb von 5 Kläranlagen (Dizy, Huttwil-Rohrbach, Reinach, Ruswil und Valangin) der hohe Mittelwert durch je einen Einzelfisch verursacht und bei Dizy und Valangin oberhalb der ARA nur ein Fisch untersucht wurde.

Bei den ARAs Densbüren, Eschenbach-Inwil, Märstetten, Surental und Zwingen wurden nur Forellen unterhalb oder oberhalb histologisch untersucht. In den Vorflutern der ARAs Altstätten, Brunnen, Eclubens und Wartau wurden keine Bachforellen histologisch untersucht.

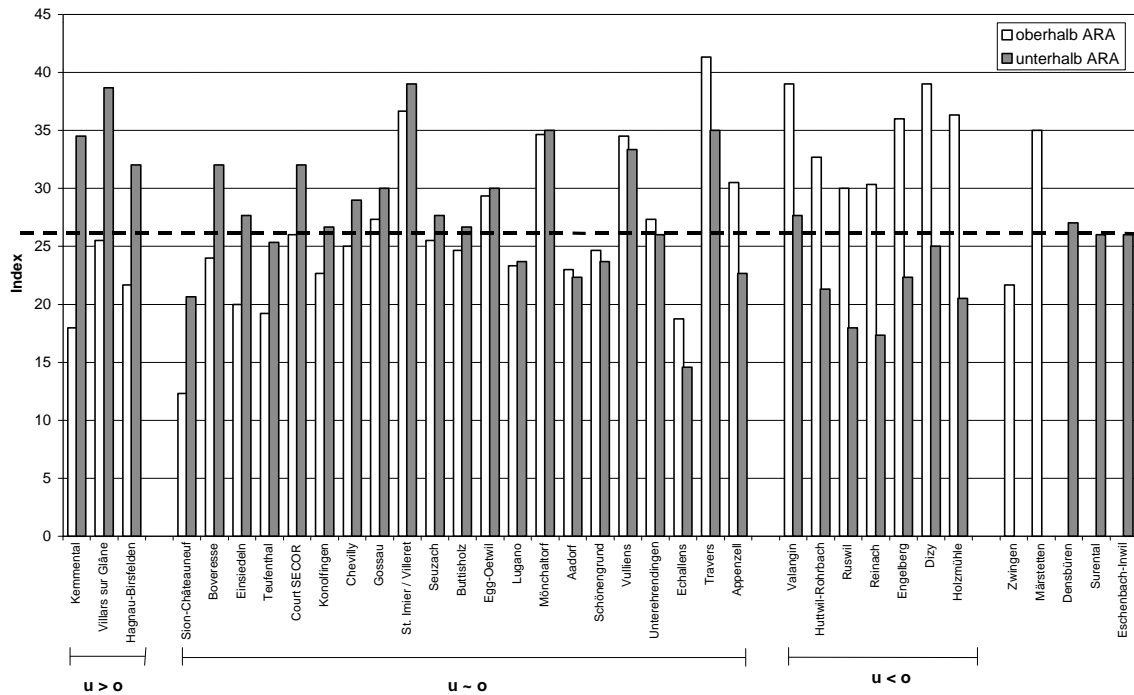


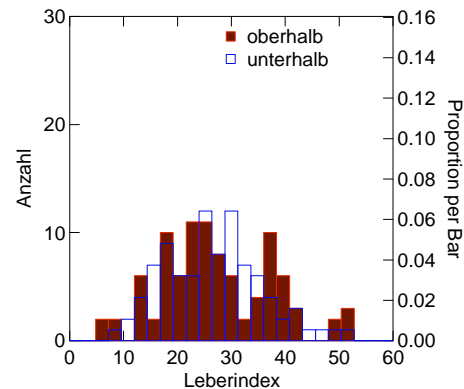
Abb. 14: Mittelwerte der histologischen Leber-Indizes der einzelnen Probestellen unterhalb (u) und oberhalb (o) der Kläranlagen. Die gestrichelte horizontale Linie kennzeichnet den Mittelwert aller Werte (26.9). In einer ersten Gruppe auf der X-Achse ($u > o$) sind diejenigen ARAs dargestellt, unterhalb welcher die Forellen einen Leberindex-Mittelwert aufwiesen, der über 10 Index-Punkte höher lag als derjenige der Forellen von oberhalb. In der zweiten Gruppe ($u \sim o$) befinden sich die ARAs, unterhalb welcher die Forellen einen Leberindex-Mittelwert aufwiesen, der sich nicht deutlich von dem der Forellen oberhalb unterschied ($-10 < \text{Differenz unterhalb minus oberhalb} < 10$). In der dritten Gruppe ($u < o$) befinden sich die ARAs, unterhalb welcher die Leberindex-Mittelwerte der Forellen um mehr als 10 Index-Punkte kleiner waren als oberhalb. An den restlichen Standorten wurden nur oberhalb bzw. unterhalb der ARAs adulte männliche Bachforellen gefangen.

In Vorflutern mit deutlichen histologischen Unterschieden zwischen ober- und unterhalb der ARA ($|\text{Differenz}| > 10$; $n=10$), wurde unterhalb von 6 ARAs (Hagnau-Birsfelden, Holzühle, Kemmental, Reinach, Ruswil, Valangin) ein Rückgang des relativen Anteils an regressiven Veränderungen und eine Zunahme von progressiven und/oder entzündlichen Veränderungen beobachtet. In drei Vorflutern konnte keine Verschiebungen der relativen Anteile der Kategorien-Indizes festgestellt werden (Dizy, Engelberg und Huttwil). In einem Vorfluter (Villars s/G) bewirkte die Einleitung von geklärtem Abwasser eine Erhöhung der regressiven Veränderungen und eine Senkung der progressiven und entzündlichen Veränderungen. Die Einleitung von geklärtem Abwasser erhöhte also tendenziell den relativen Anteil an progressiven und entzündlichen Veränderungen auf Kosten der regressiven Veränderungen. Diese Tendenz besteht unabhängig davon, ob unterhalb oder oberhalb der ARA die höheren histologischen Leberveränderungen gefunden wurden. Diese tendenzielle Beeinträchtigung von geklärtem Abwasser auf histologische Veränderungen wurde sowohl bei Untersuchungen im Kanton Bern (Schmidt, 2000) als auch im Kanton St. Gallen und Liechtenstein (Wahli & Girling, in Vorb.) gefunden.

☛ **Wenn alle Forellen betrachtet werden, existiert kein Unterschied zwischen den Leberindex-Mittelwerten unterhalb und oberhalb der Kläranlage. Wie sieht es jedoch aus mit den Extremwerten? Gibt es unterhalb der Kläranlagen mehr hohe und weniger tiefe Leberindizes als oberhalb?**

Nein. Die Verteilungskurve der Leberindizes unterhalb der ARAs unterscheidet sich nicht signifikant von derjenigen von Fischen oberhalb der ARAs (Abb. 15; 2-Weg K-S-Test; $n_u=93$; $n_o=94$; $p=0.46$). Unterhalb der ARAs streuten die Leberindizes von 9 bis 51, oberhalb von 7 bis 52. Die Häufigkeit von Extremwerten unterhalb und oberhalb der Kläranlagen entsprechen sich.

Abb. 15: Verteilungshistogramm der Leberindizes aufgeteilt in ober- und unterhalb der Kläranlagen



☛ **Weisen Standorte mit deutlichen Unterschieden zwischen ober- und unterhalb der Kläranlage gemeinsame Eigenschaften der einleitenden Kläranlagen und / oder morphologische Eigenheiten der Vorfluter auf?**

Aufgrund der Grösse der Vorfluter (ausgedrückt als Q_{347}), der Verdünnung des Abwassers im Vorfluter und der Belastungsstärke der ARA (ausgedrückt als Einwohnergleichwerte) lassen sich die unterschiedlichen Leberindizes unterhalb und oberhalb nicht erklären (Abb. 16). Trotz schlechten Verdünnungsverhältnissen (Abwasseranteile von über 30%) waren beispielsweise die Leberindex-Werte der Forellen unterhalb von 7 Kläranlagen nicht schlechter als oberhalb, bzw. unterhalb von zwei Kläranlagen sogar noch besser als oberhalb.

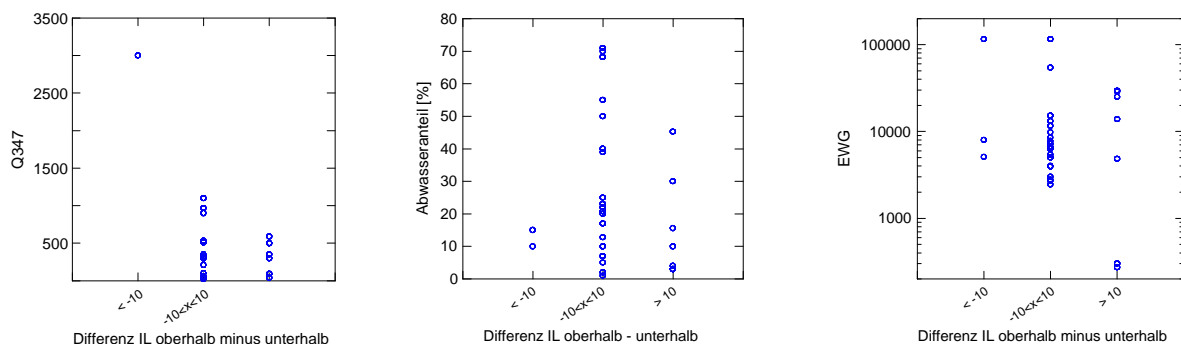


Abb. 16: Q_{347} der Vorfluter (A), Abwasseranteil im Vorfluter (B) und Grösse der ARA ausgedrückt als Einwohnergleichwerte EWG (C), aufgeteilt in drei Gruppen. Die erste Gruppe (<-10) beinhaltet ARAs, unterhalb derer Fische um 10 Index-Punkte höhere Leberveränderungen zeigten als oberhalb. Die zweite Gruppe ($-10 < x < 10$) beinhaltet ARAs, bei denen die Leberindizes der Fische unter- und oberhalb weniger als 10 Index-Punkte differierten. In der dritten Gruppe (> 10) sind diejenigen ARAs aufgelistet, unterhalb derer die Leberindizes der Fische um mindestens 10 Punkte niedriger waren als oberhalb der ARAs.

4. Fazit

Das ARA-Projekt Escher (1999) hatte zum Ziel, Zusammenhänge zwischen der Wasserbelastung in Vorflutern aufgrund einleitender Kläranlagen und (1) den Fischbeständen, (2) dem Gesundheitszustand der Bachforellen sowie (3) der Entwicklung von Bachforelleneiern zu untersuchen. Da man Wert auf ein flächendeckendes Monitoring legte, das 41 Kläranlagen in der ganzen Schweiz berücksichtigte, musste die Stichprobengrösse der Bachforellen auf je 10 Tiere pro Standort unterhalb und oberhalb einer ARA limitiert werden. In einigen Gewässern führten kleine Bachforellenbestände sowie geschlechtsspezifische Unterschiede, die eine getrennte Analyse nach Geschlechtern implizierte, für die Beurteilung des Gesundheitszustandes der Forellen zu Stichprobengrössen < 3 . Dies limitierte die Anwendung bzw. Aussagekraft von statistischen Tests.

Unter Berücksichtigung aller durchgeführten Untersuchungen wurde versucht, Effekte der ARAs auf die Fische und Bachforelleneier integrativ zu beurteilen (Tab. 4). Anhand dieser Bewertung wirkten sich die ARAs Buttisholz, Sion-Châteauneuf, St.Imier/Villeret, Villars s/G und ganz besonders der ARAs Engelberg, Hagnau-Birsfelden, Kemmental, Mönchaltorf, Reinach und Teufenthal negativ auf die Fische und Bachforelleneier im Vorfluter aus. Diese ARAs sollten bezüglich fischbeeinträchtigenden Effekten besonders beachtet werden. Bei 22 ARAs wurden keine oder nur geringe negative Effekte auf die Fische nachgewiesen. 9 ARAs (Altstätten, Brunnen, Eclubens, Eschenbach-Inwil, Fenin, Märstetten, Surental, Wartau, Zwingen) konnten nicht abschliessend integrativ beurteilt werden, weil unter- und / oder oberhalb keine oder zuwenig Bachforellen gefangen wurden und daher viele Parameter nicht gemessen werden konnten. Von diesen ARAs fällt vor allem Eclubens auf, bei der trotz fehlenden Werten für die biometrischen Indizes, Vitellogenin Messungen, Ovotestis und Histologie ein hoher Index Wert für negative ARA Effekte nachgewiesen wurde.

In 15 von 28 beurteilbaren Vorflutern wird aufgrund der Abfischungen ein Rückgang der Bachforellenpopulation unterhalb der Einleitestellen der ARAs vermutet (Tab. 3). In diesen Vorflutern war unterhalb der ARAs der Index potenziell negativer Effekte durch die ARA anhand der untersuchten Parameter signifikant höher als in den übrigen Vorflutern (Abb. 17; Kruskal-Wallis Test; $U=9.6$; $n_{\text{grösser}}=10$; $n_{\text{gleich}}=3$; $n_{\text{kleiner}}=15$; $P=0.01$). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass der festgestellte Rückgang der Populationsdichte der Bachforellen unterhalb bestimmter ARA in Zusammenhang steht mit Veränderungen an mehreren Untersuchungsparametern. Damit wäre ein Link zwischen physiologischen Untersuchungsparametern (Vitellogenin), Parametern auf Stufe des Organs (HSI, GSI, Leberindex, Ovotestis) und des Organismus (Kondition) mit einem Parameter auf populationsbiologischer Stufe (Fischbestand) gegeben.

Kein untersuchter Parameter konnte für sich alleine betrachtet die Effekte der einzelnen ARAs genügend verlässlich aufzeigen. Die Resultate der einzelnen Untersuchungsparameter waren im Vergleich zueinander teilweise nicht kohärent. Während beispielsweise unterhalb von vier ARAs eine Vitellogenin-Induktion bei männlichen Fischen festgestellt wurde, war der GSI der Forellen nur unterhalb einer dieser Anlagen verändert. Dies bestätigt einmal mehr die Aussagen vieler Autoren, dass bei Biomonitorings über die Wirkung von Schadstoffen die verlässlichsten Resultate erhalten werden, wenn mehrere Untersuchungsparameter aus verschiedenen Organisationsstufen in Kombination verwendet werden (Adams et al., 1989; Adams et al., 1992; Heath, 1995; Goksoyr et al., 1996; Vethaak et al., 1996; Khan & Payne, 1997).

Tab. 3: Zusammenstellung der Ergebnisse der gemessenen Parameter. Schraffierte Zellen kennzeichnen Untersuchungen, die mangels Bachforellen nicht durchgeführt werden konnten oder wo keine Beurteilung möglich war. Gerasterte Zellen kennzeichnen diejenigen Ergebnisse, die auf einen negativen Effekt der ARA hinweisen. u=unterhalb ARA; o=oberhalb ARA; Werte von 0 bis -3 sind Intensitätsstufen.

	Population		Biometrische Indizes				Vitellogenin (Burkhardt-Holm et al., 1999a)	Ovotestis (Burkhardt-Holm et al., 1999b)	Histologie Leber IL um mind. 10 Punkte höher ...	Early life stage (Escher, 1999)	Makroskopische Veränderungen		
	Effekt ARA auf Bachforellen- Bestand (Escher, 1999)	Effekt ARA auf Fischbestand (Escher, 1999)	Konditionsindex um mind. 0.05 grösser...	HSI ad. M bei gleichbleibendem Kond um mind. 0.1 grösser...	HSI ad. W bei gleichbleibendem Kond um mind. 0.1 grösser...	GSI ad. M bei gleichbleibendem Kond mind. 1.0 grösser...					GSI ad. W bei gleichbleibendem Kond mind. 1.0 grösser...	Leberverände- rungen um mind. 30% häufiger...	Nierenverände- rungen um mind. 30% häufiger...
Aadorf	1	1	o	u		u				-2			
Altstätten		1											
Appenzell	0	-1	u	u		u					o		u
Boveresse	0	0		u	u					0	u		u
Brunnen										-2			
Buttisholz	-2	-2	u	u						-2	o		o
Chevilly										0			
Court SECOR					o		u						
Densbüren	1	1	u							-2			
Dizy	0	0		u		u	u		o	1			
Echallens	0	0						u		-3			
Ecublens	-2	-1	o							-3	u		
Egg-Oetwil	-1	-1			o		o			0			o
Einsiedeln			u		u		u			-3			o
Engelberg	-2	-2	o		o		u		o	-2			u
Eschenbach-Inwil								u					
Finin Villars, Saules													
Gossau	-2	-2	u				o			0			u
Hagnau-Birsfelden					u		o			-3	u		
Holzühle	-2	0		u		u			o	0			u
Huttwil-Rohrbach	-1	-1				u	u		o		u		u
Kemmental	-1	0			o	u	o		u	-2			
Konolfingen	0	0		o	o					0			
Lugano										-2			
Märstetten	-1	-1	o							0	o		u
Mönchaltorf	-1	1			o			u		-1			
Reinach	-2	-1				u			o	-3	u		
Ruswil	0	0	u						o	0	u		
Schönengrund	0	0		o			u			-1			
Seuzach	-1	-1		u									
Sion-Châteauneuf	-3	-2	u		o		o			-3			
St. Imier / Villeret	0	-1		u	u	u	u			-3			
Surental										0			
Teufenthal	-2	-1		u	o	o	o	u		-3			u
Travers	0	2		u			o						
Unterehrendingen	1	1				u				-3			
Valangin	0	0				u	o		o				
Villars sur Glâne						o			u	-2		u	
Vulliens	-2	-2	u							0			
Wartau		-2								-3			
Zwingen										0			

Tab. 4: Integrative Beurteilung negativer Effekte der ARAs auf die Fische bzw. die Eientwicklung der Bachforellen, basierend auf Populationsuntersuchungen, biometrischen Indizes, Vitellogenin-Untersuchungen, Ovotestis, Leberhistologie, "Early life stage"-Tests und makroskopischen Veränderungen (die Zahlen dieser Spalten repräsentieren den relativen Anteil an nachgewiesenen negativen Effekten der ARAs pro Kategorie). Der Index negativer ARA Effekte berechnete sich aus der Summe der relativen Anteile der 7 Kategorien. Die Methode der Bewertung ist in Kap. 2.6 beschrieben. Schraffierte Zellen kennzeichnen Untersuchungen die mangels Bachforellen nicht oder nur unvollständig durchgeführt werden konnten und / oder wo keine Beurteilung möglich war.

		Index negativer ARA Effekt	Population	Biometrische Indizes	Vitellogenin	Ovotestis	Histologie Leber	Early life stage	Makroskopische Veränderungen
Aadorf	↘	1.6		0.6				1	
Altstätten									
Appenzell	↘	1.2	0.5	0.4					0.3
Boveresse	→	1		0.4					0.6
Brunnen		1						1	
Buttisholz	↙	2.2	1	0.2				1	
Chevilly	→	0							
Court SECOR	→	0.4		0.4					
Densbüren	↘	1						1	
Dizy	↘	1.6		0.6				1	
Echallens	↘	2			1			1	
Ecublens		2.3	1					1	0.3
Egg-Oetwil	↘	1.4	1	0.4					
Einsiedeln	↘	1.4		0.4				1	
Engelberg	↙	2.9	1	0.6				1	0.3
Eschenbach-Inwil		1			1				
Fenin Villars, Saules									
Gossau	↘	1.5	1	0.2					0.3
Hagnau-Birsfelden	↙	2.7		0.4			1	1	0.3
Holzühle	↘	1.2	0.5	0.4					0.3
Huttwil-Rohrbach	↘	2	1	0.4					0.6
Kemmental	↙	3.1	0.5	0.6			1	1	
Konolfingen	→	0.4		0.4					
Lugano	↘	1						1	
Märstetten		1.3	1						0.3
Mönchaltorf	↙	2.7	0.5	0.2	1			1	
Reinach	↙	2.5	1	0.2				1	0.3
Ruswil	→	0.3							0.3
Schönengrund	↘	1.4		0.4				1	
Seuzach	↘	1.2	1	0.2					
Sion-Châteauneuf	↙	2.4	1	0.4				1	
St. Imier / Villeret	↙	2.3	0.5	0.8				1	
Surental		0							
Teufenthal	↙	4.1	1	0.8	1			1	0.3
Travers	→	0.4		0.4					
Unterehrendingen	↘	1.2		0.2				1	
Valangin	→	0.4		0.4					
Villars sur Glâne	↙	2.3					1	1	0.3
Vulliens	↘	1	1						
Wartau		1.5	0.5					1	
Zwingen		0							

Unterhalb von vier ARAs wurde bei einigen männlichen Bachforellen eine Vitellogenin-Produktion nachgewiesen. Dies deutet auf die Anwesenheit von östrogen wirksamen Substanzen im Wasser hin. Jobling et al. (1998) berichteten, dass östrogen wirksame Substanzen bei Rotaugen zu einem gehäuftem Auftreten von Ovotestis, d.h. zu einer Ausbildung von Eierstockgewebe im Hodengewebe männlicher Fische führten. Obwohl in der

vorliegenden Arbeit bei keiner männlichen Bachforellen Ovotestisbildung nachgewiesen werden konnte, kann nicht gefolgert werden, dass trotz Vitellogenin-Induktion in männlichen Forellen kein Problem mit östrogenen Wirkungen besteht. Denn die erhöhte Produktion von Vitellogenin kann sich auch in subtilerer Form als Ovotestis-Bildung auswirken.

Oberhalb einiger ARAs wurden stärkere Veränderungen vorgefunden als unterhalb der Einleitestelle der ARA. Dies dürfte kaum auf eine fördernde Wirkung des eingeleiteten Abwassers der ARA, als vielmehr auf eine Grundbelastung des Wassers im Oberlauf des Gewässers hindeuten (beispielsweise durch andere Kläranlagen oder landwirtschaftliche oder industrielle Einträge), was bereits oberhalb der ARAs zu Veränderungen führt. Diese Vorbelastung des Wassers erschwert die Bewertung der Kläranlagen bezüglich ihrer Effekte auf die Gesundheit der Fische. Möglicherweise spielten auch Wanderbewegungen der Fische eine Rolle. Es muss davon ausgegangen werden, dass ein Teil der grossen Variabilität der untersuchten Parameter auf Migration der Forellen zwischen oberhalb und unterhalb der ARAs zurückzuführen ist. Nur an den Standorten Chevilly, Engelberg, Reinach, Valangin und Vulliens sowie teilweise auch bei der ARA Hagnau-Birsfelden, kann aufgrund natürlicher und künstlicher Hindernisse im Flusslauf angenommen werden, dass Fische nicht oder nur selten von unterhalb der Einleitestelle der ARA nach oberhalb der ARA schwammen.

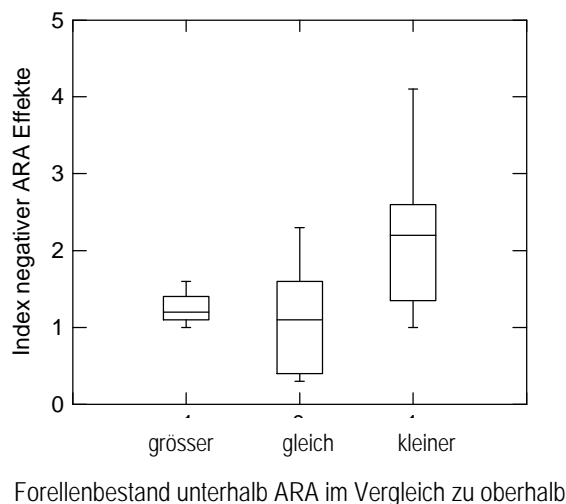


Abb. 17: Index negativer Effekte der ARAs an Standorten, bei denen die Populationsdichte der Bachforellen unterhalb der ARAs grösser, gleich oder kleiner waren als oberhalb der ARA (Einteilung gemäss Escher (1999)).

Die vorliegenden Daten der einzelnen Untersuchungen sowie die integrative Beurteilung zeigen, dass keine allgemein zutreffenden Aussagen (generelle Vergrösserung der Lebern, Vitellogenininduktion, histologische Veränderungen usw.) über die Wirkung von ARAs auf die Fische bzw. die Eientwicklung möglich sind. Vielmehr bedarf es einer Einzelbeurteilung für jede Kläranlage. Die unterschiedlichen Effekte der einzelnen ARAs sind durchaus zu erklären. Jede einzelne ARA hat bestimmte Charakteristika wie Einzugsgebiet, Wasserzusammensetzung, angeschlossene Einwohner, Klärvorgänge usw. Dass sich diese Voraussetzungen unterschiedlich auf die exponierte biotische Umwelt auswirken, scheint verständlich. Daher wurde versucht, die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsparameter mit den Charakteristika der ARAs und der Vorfluter in Verbindung zu bringen. Die Belastungsstärke anhand der Einwohnergleichwerte und/oder des Verdünnungsgrads des eingeleiteten Abwassers in den Vorfluter schienen jedoch nur die HSI und GSI Werte der adulten Weibchen zu beeinflussen. Andere Zusammenhänge zwischen Belastungsstärke und

Verdünnungsverhältnis und dem Ausmass der pathologischen Effekte der Bachforellen unterhalb der ARAs konnten nicht erbracht werden. Escher (1999) stellte fest, dass Veränderungen im Bachforellenbestand ober- und unterhalb einer ARA tendenziell mit dem Verdünnungsverhältnis der ARA korrelierten. Tatsächlich war der Bachforellenbestand unterhalb der ARAs mit den schlechtesten Verdünnungsverhältnissen (Seuzach, Egg-Oetwil, Sion-Châteauneuf und Gossau) kleiner als oberhalb der entsprechenden ARAs. Trotzdem wurden auch unterhalb von ARAs mit "gutem" Verdünnungsverhältnis verringerte Bachforellenbestände gefunden (z.B. Teufenthal). Je nach Schadstoffpotenzial der Abwässer können auch kleine ARAs mit einem gutem Verdünnungsverhältnis durchaus pathologische Auswirkungen auf die Bachforellen haben. Dies würde die vorliegende Situation erklären, dass mit den Kenndaten der Abwasserverdünnung und der Belastungsstärke der ARAs anhand der Einwohnergleichwerte keine Rückschlüsse auf den Gesundheitszustand der Forellen im Vorfluter unterhalb der Einleitestellen möglich sind, ohne das Schadstoffpotenzial der Abwässer der ARA zu kennen. Die chemisch-analytischen Wasseruntersuchungen der einzelnen ARAs lagen jedoch für die vorliegenden Analysen nicht vor. Sie bilden sozusagen eine Black-Box, über deren Einfluss auf die erhobenen Daten keine Aussagen gemacht werden können.

5. Referenzen

- Adams, S.M., Crumby, W.D., Greeley, M.S., Shugart, L.R. & Saylor, C.F. (1992). Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 24, 347-360.
- Adams, S.M., Ham, K.D., Greeley, M.S., LeHew, R.F., Hinton, D.E. & Saylor, C.F. (1996). Downstream gradients in bioindicator responses: point source contaminant effects on fish health. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 53, 2177-2187.
- Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley Jr, M.S., Jimenez, B.D., Ryon, M.G., Shugart, L.R., McCarthy, J.F. & Hinton, D.E. (1989). The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research* 28, 459-64.
- Andersson, T., Forlin, L., Hardig, J. & Larsson, A. (1988). Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft mill effluents. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 45, 1525-1536.
- Barnes, M.A., Power, G. & Downer, R.G.H. (1984). Stress-related changes in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) associated with a hydroelectric control structure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 41, 1528-1533.
- Bernet, D. (1999). Biomonitoring eines belasteten Fließgewässers: Einsatz und Evaluation eines Testsystems zur Beurteilung pathologischer Effekte von geklärtem Abwasser auf die Bachforelle (*Salmo trutta* L.). Inauguraldissertation. Zoologisches Institut. Universität Bern.
- Braunbeck, T., Storch, V., Nagel, R. (1989). Sex-specific reaction of liver ultrastructure in zebra fish (*Brachydanio rerio*) after prolonged sublethal exposure to 4-nitrophenol. *Aquatic Toxicology* 14: 185-202.
- Burkhardt-Holm, P. (1998). The fish as bioindicator: the effect of environmental influences on selected molecules, cells and organs. Habilitationsschrift. Zoologisches Institut. Universität Bern.
- Burkhardt-Holm, P., Ochsenbein, A., Pugovkin, D., & Wahli, T. (1999a). Untersuchung männlicher Bachforellen auf das Vorhandensein von Vitellogenin (östrogensensitive Reaktion) sowie von histologischen Veränderungen in der Leber. Teil A: Vitellogenin Untersuchung. Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Bern.
- Burkhardt-Holm, P., Ochsenbein, A., Pugovkin, D., & Wahli, T. (1999b). Untersuchung männlicher Bachforellen auf das Vorhandensein von Vitellogenin (östrogensensitive Reaktion) sowie von histologischen Veränderungen in der Leber. Teil B: Untersuchung von histologischen Veränderungen in der Leber. Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Bern.
- Chang, C.F., Lau, E.L. & Lin, B.Y. (1995). Estradiol-17-beta suppresses testicular development and stimulates sex reversal in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Fish Physiology & Biochemistry* 14, 481-488.

- Escher, M. (1997). Abklärungen zum Einfluss von Abwasser aus einem ARA-Auslauf auf den Gesundheitszustand von Bachforellen. Inauguraldissertation. Institut für Tierpathologie. Tierspital Bern. Universität Bern.
- Escher, M. (1999). Einfluss von Abwassereinleitungen aus Kläranlagen auf Fischbestände und Bachforelleneier. BUWAL: Mitteilungen zur Fischerei Nr. 61, 201 S.
- Frick, E., Nowak, D., Reust, C. & Burkhardt-Holm, P. (1998). Der Fischrückgang in den schweizerischen Fließgewässern. Gas-Wasser-Abwasser 4, 261-264.
- Friedl, C. (1999). Fischfangrückgang in schweizerischen Fließgewässern. BUWAL, Mitteilungen zur Fischerei Nr. 63, 32 S.
- Goede, R.W. & Barton, B.A. (1990). Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. American Fisheries Symposium 8, 93-108.
- Goksoyr, A., Beyer, J., Egaas, E., Grosvik, B.E., Hylland, K., Sandvik, M. & Skaare, J.U. (1996). Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring. Marine Pollution Bulletin 33, 36-45.
- Haider, G. (1984). Untersuchungen zur Verwendung des somatischen Leberindex (LI) in der Fischtoxikologie. Fisch und Umwelt 13, 101-138.
- Heath, A.G. (1995). Water pollution and fish physiology. CRC Lewis Publisher, Boca Raton.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler C.R., Brighty, G. & Sumpter, J.P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. Environmental Science and Technology 32, 2498-2506.
- Khan, R.A. & Payne, J.F. (1997). A multidisciplinary approach using several biomarkers, including a parasite, as indicators of pollution: a case history from a paper mill in Newfoundland. Parasitologia 39, 183-188.
- Kiceniuk, J.W. & Khan, R.A. (1987). Effect of petroleum hydrocarbons on Atlantic cod, *Gadus morhua*, following chronic exposure. Canadian Journal of Zoology 65, 490-494.
- Lamche, G. (1999). Fish epidermis in vitro: techniques for cell and tissue culture and use of the systems for ecotoxicological studies. Inauguraldissertation. Zoologisches Institut. Universität Bern.
- Larsson, A., Haux, C., Sjöbeck, M.-L. & Lithner, G. (1984). Physical effects of an additional stressor on fish exposed to a simulated heavy-metal-containing effluent from a sulfide ore smeltery. Ecotoxicology and Environmental Safety 8, 118-128.
- Lee, R.M., Gerking, S.B. & Jezierska, B. (1983). Electrolyt balance and energy mobilization in acid-stressed rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and their relation to reproductive success. Environmental Biology of Fishes 8, 115-123
- Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., Portt, C.B., Van Der Kraak, G.J., Smith, I.R., & Dixon, D.G. (1992). Changes in maturity, plasma sex steroid levels, hepatic mixed-function oxygenase activity, and the presence of external lesions in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluent. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 49, 1560-1569.
- Panter, G.H., Thompson, R.S. & Sumpter, J.P. (1998). Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. Aquatic Toxicology 42, 243-253.
- Phromkunthong, W., Storch, V., Braunbeck, T. (1994). Sexual dimorphism in the reaction of zebrafish (*Brachydanio rerio*) to ascorbic acid deficiency: Induction of steatosis in hepatocytes of male fish. Journal of Applied Ichthyology 10: 146-153.
- Poels, C.L.M., van der Gaag, M.A. & van de Kerkhoff, J.F.J. (1980). An investigation into the long-term effects of Rhine water on rainbow trout. Water Research 14, 1029-1035.
- Schmidt, H. (1998). Wirkung von Umwelteinflüssen auf Bachforellen (*Salmo trutta fario*) und Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Inauguraldissertation. Institut für Tierpathologie. Tierspital Bern. Universität Bern.
- Schmidt, H., Bernet, D. & Wahli, T. (2000): Biomonitoring in Fließgewässern des Kantons Bern. Teilprojekt: Passives Monitoring an Bachforellen. Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin. Institut für Tierpathologie. Universität Bern.
- Sumpter, J.P. (1995). Feminized responses in fish to environmental estrogens. Toxicology Letters, 737-742.
- Vethaak, A.D., Jol, J.G., Meijboom, A., Eggens, M.L., ap Rheinallt, T., Wester, P.W., van de Zande, T., Bergman, A., Dankers, N., Ariese, F., Baan, R.A., Everts, J.M., Opperhizen, A. & Marquenie, J.M. (1996). Skin and liver diseases induced in flounder (*Platichthys flesus*) after longterm exposure to contaminated sediments in large-scale mesocosms. Environmental Health Perspectives 104, 1218-1229.
- Wahli, T. & Girling, P.J. Histological alterations increase significantly in brown and rainbow trout at further downstream sites in tributaries of the Rhine, Switzerland. in Vorbereitung.