



# **Untersuchung der Biozönose im Linthkanal im Bereich der Salzwassereinleitung der KVA Niederurnen**

## **Schlussbericht Juli 2001**

### **Eine Untersuchung von**

PD Dr. Patricia Holm (Projektorganisation), Roman Bucher, EAWAG  
Dr. Thomas Wahli, Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Universität Bern  
Prof. Daniel Dietrich, EUREGIO Ökotoxikologie Service-Labor, Universität Konstanz  
Aquatika GmbH, Oberwichtlach

### **Im Auftrag der**

KVA Linthgebiet Niederurnen, Baukommission



## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Vorwort	6
1. Einleitung	7
2. Teilbericht Holm / Wahli: Methoden	12
3. Teilbericht Holm / Wahli: Resultate und Diskussion	14
I) Histologische Veränderungen von Leber, Niere und Kieme	14
II) Immunhistochemischer Nachweis von metallbindenden Proteinen in Kiemen	19
III) Biometrische Masszahlen der Forellen, Vergleich der Probenahmen	25
4. Synthese der Teilberichte Holm / Wahli, EUREGIO und Aquatica GmbH	30
5. Parameter-übergreifende Bewertung	35
6. Ausblick und Empfehlungen	37
Literatur	39

## Zusammenfassung

Der Kehrichtzweckverband Niederurnen erteilte der EAWAG im Januar 2000 den Auftrag, die Wirkung des von der Kehrichtverbrennungsanlage (KVA) eingeleiteten Filterwaschwassers auf die Biozönose im Linthkanal zu untersuchen. Gemäss den Annahmen der Planer der Waschanlage werden im Filterwaschwasser u.a. bedeutende Frachten von Schwermetallen (Zink, Nickel u.a.), verschiedenen Stickstoffverbindungen (Nitrit, Ammoniak, Ammonium) und Salzen (Chlorid, Sulfat usw.) erwartet.

In verschiedenen Studien wurden deshalb vor und 1 Jahr nach dem Start der Einleitung des Waschwassers in den Linthkanal Erhebungen zur Beeinträchtigung von Daphnien (Wasserflöhe) und Fischen durchgeführt.

Der vorliegende Bericht beschreibt die Untersuchungen Holm / Wahli (Histologie von Niere, Leber und Kiemen von Forellen; induzierte Metallothioneine in der Kieme), fasst die Ergebnisse aus den anderen Studien zusammen (Metallothioneine in der Leber und Immunstatus der Fische; toxische Effekte auf Fischembryonen und Daphnien; Fischeier-Exposition) und führt eine Beurteilung aller Resultate (Synthese) durch.

Die Ergebnisse der Histologie von Kieme, Niere und Leber von Forellen lassen auf keine wesentliche Beeinträchtigung der Fischgesundheit schliessen. Die Indizes zur Beurteilung der Belastung der Organe liegen in einem tiefen Bereich und es konnten nur geringe Unterschiede zwischen den Probenahmestellen und –zeitpunkten erkannt werden. Werte in der gleichen Grössenordnung wurden in anderen Studien bei Fischen aus unbelasteten Fliessgewässern beobachtet.

Bei der Belastung durch Schwermetalle werden in den Fischen metallbindende Proteine, die sogenannten Metallothioneine, induziert. Die Untersuchung der Anzahl der induzierten Proteine in der Leber und in den Kiemen erlaubt eine Abschätzung der Belastung der Fische durch Metalle.

Die Anzahl der induzierten Proteine in der *Kieme* war im Jahr 2001 (also nach Beginn der Einleitung des Filterwaschwassers) gegenüber dem Vorjahr leicht erhöht. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Entnahmestellen oberhalb und unterhalb der Einleitstelle festgestellt werden. Die Werte bewegen sich in einem tiefen Bereich und sind mit Werten vergleichbar, die bei Fischen aus Trinkwasserkontrollen oder aus wenig belasteten Fliessgewässern gefunden wurden.

Im Gegensatz zur Kieme waren die Metallothioneine in der *Leber* ein Jahr nach Beginn der Einleitung weniger stark induziert als vor der Einleitung. Dieser Unterschied geht wahrscheinlich auf die verschiedenen Funktionen dieser beiden Organe zurück. Die Metallothioneine in der Leber scheinen eher zur Indikation einer chronischen Belastung geeignet, die Anzahl der Metallothioneine in der Kieme für die Abschätzung einer akuten Reaktion.

Die zahlreichen Parameter zur Abschätzung des Immunstatus der Forellen lassen keine Veränderung seit dem Beginn der Einleitung des Waschwassers erkennen.

Filterwaschwasser wurde in Tests in verschiedenen Verdünnungen zur Bestimmung der toxischen Wirkung auf Daphnien (Wasserflöhe) und Zebrafische eingesetzt.

Toxische Effekte wurden bei Verdünnungen von bis zu 1:100 beobachtet. Im Jahr 2001 waren die toxischen Effekte geringfügig stärker ausgeprägt. Diese Toxizitäten haben jedoch kaum praktische Bedeutung, weil die toxischen Konzentrationen weit höher sind, als sie im Linthkanal aufgrund der Verdünnung „real“ auftreten können, auch bei sehr niedrigem Abfluss (die Verdünnung des Waschwassers beträgt beim Q365, dem tiefsten Wasserstand an einem Tag pro Jahr, rund 1:5000).

Schliesslich wurde die Entwicklung von ausgebrachten Forelleneiern (Überlebensrate) an verschiedenen Stellen im Linthkanal (3 unterhalb und 3 oberhalb der Einleitstelle, an beiden Ufern des Kanals verteilt) untersucht. An fast allen Stellen konnten befriedigende Überlebensraten beobachtet werden. Die schlechte Überlebensrate an der Stelle 1200m unterhalb der Einleitstelle steht wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit dem Filterwaschwasser, sondern ist durch technische Schwierigkeiten bedingt.

**Zusammenfassend kann die Wirkung der Filterwassereinleitung der KVA Niederurnen auf die Biozönose als geringfügig eingestuft werden. Die fragmentarische Datenlage erlaubt jedoch keine abschliessende Beurteilung. Insbesondere fehlen Untersuchungen zur chronischen Belastung, zur Beeinträchtigung der Fischgesundheit durch schwankende Einleitungen (sog. „Intermittent exposure“) und zum Einfluss der Salzfahne auf das Laichverhalten der Seeforellen.**

## Vorwort

Aufgrund des Auftrags des Kehrrechtzweckverbandes Niederurnen an die EAWAG wurde die vorliegende Untersuchung durchgeführt. Im Pflichtenheft wurden histopathologische Erhebungen an Leber, Niere und Kieme, darüberhinaus eine auf Schwermetalle ausgerichtete Methode bei Fischen und Abklärungen an Fischeiern sowie an Wirbellosen gefordert. Die vorliegende Untersuchung geht mit der Betrachtung des Konditionsfaktors über die Anforderungen des Pflichtenheftes hinaus.

Die Studie stellt eine Kombination verschiedener Zugänge und Methoden dar, die auf dem spezialisierten wissenschaftlichen Know-How verschiedener Labors und Unterauftragnehmer basieren. Die heutige Spezialisierung und Diversifizierung in der Wissenschaft macht ein derartiges Zusammenwirken erforderlich. Dementsprechend setzen sich die Ergebnisse aus 3 Teilen zusammen:

- Teilbericht Holm / Wahli: umfasst die Untersuchungen zum Gesundheitszustand der Forellen und der Metallothionein-Synthese in der Forellengieme (im vorliegenden Bericht dargelegt, Kapitel 2 und 3).
- Teilbericht EUREGIO: beschreibt die Ergebnisse der Untersuchungen zur Metallothionein-Synthese in der Forellenleber, den Immunstatus der Forellen, sowie den Daphnientest und den Zebrafisch-Embryotest (Dietrich 2001).
- Teilbericht Aquatica GmbH: stellt die Untersuchungen des passiven Monitorings mit Forelleneiern im Linthkanal dar (Guthruf 2001).

Der vorliegende Schlussbericht umfasst die Methoden und Ergebnisse des Teilberichts Holm / Wahli sowie die Synthese und Parameter-übergreifende Beurteilung der Ergebnisse aus allen Untersuchungen.

## 1. Einleitung

Basierend auf dem Pflichtenheft für die Untersuchung der Biozönose im Linthkanal im Bereich der Salzwassereinleitung der KVA Niederurnen (Kant. Amt für Umweltschutz, Glarus, 6. Januar 2000) wurde am 4. Februar 2000 der Auftrag an die Projektorganisation erteilt.

**Ziel dieser Untersuchung** ist die Abschätzung der Wirkung des eingeleiteten Filterwaschwassers der KVA Niederurnen auf die Biozönose im Linthkanal. Die Planer der Waschanlage gehen von der Annahme aus, dass im Filterwaschwasser u.a. bedeutende Frachten von Schwermetallen (Zink, Nickel u.a.), verschiedenen Stickstoffverbindungen (Nitrit, Ammoniak, Ammonium) und Salzen (Chlorid, Sulfat usw.) zu erwarten sind.

Mit dem gewählten multidisziplinären Ansatz können verschiedene Effekte auf die aquatische Lebensgemeinschaft aufgezeigt werden: Die Feinstruktur von Organen und die Funktion des Immunsystems gibt Aufschluss über die Fischgesundheit. Die Schwermetallbelastung wird in zwei Organen von Forellen erfasst, die unterschiedlich in die Aufnahme und den Metabolismus der Schwermetalle eingebunden sind. Die Untersuchung an Wirbellosen ermöglicht eine Abschätzung der Wirkung auf andere Mitglieder der Biozönose.

**Design der Untersuchung:** Verschiedene, repräsentative Parameter wurden vor der Einleitung von Filterwaschwasser, sog. Status ante-Untersuchung im Februar 2000, sowie ein Jahr nach Beginn der Einleitung, sog. Status post-Untersuchung im Februar 2001 erhoben. Die Ergebnisse der beiden Untersuchungen wurden verglichen.

Folgende Parameter wurden erfasst:

1. Der *Gesundheitszustand* der Forellen oberhalb und unterhalb der Einleitstelle, anhand der histologischen Veränderungen von Leber, Niere und Kieme und zusätzlich anhand des Konditionsfaktors, der eine grobe Abschätzung der Fitness erlaubt.
- 2.a Die *Schwermetallbelastung* in der Kieme dieser Forellen anhand der Metallothionein-Synthese (immunhistochemischer Nachweis).
- 2.b Die *Schwermetallbelastung* in der Leber derselben Tiere anhand der Metallothionein-Synthese (immunbiochemischer Nachweis).

3. Der *Immunstatus* der Forellen, oberhalb und unterhalb der Einleitstelle, anhand verschiedener immunologischer Parameter
4. Die *Mortalität, Malformationen und Wachstumsinhibition* bei Zebrafisch-Embryonen (*Danio rerio*), die dem Flusswasser im Linthkanal von oberhalb der Einleitstelle und Abwasser der KVA exponiert worden sind.
5. Die akute *Immobilisation von Daphnien* (Wasserflöhe), die dem Flusswasser im Linthkanal oberhalb der Einleitstelle und Abwasser der KVA exponiert worden sind.
6. *Überlebensrate von Forelleneiern*, die im Linthkanal oberhalb und unterhalb der Einleitstelle exponiert wurden.

### **Begründung für die Auswahl der Parameter und Methoden**

#### *zu 1. Der Gesundheitszustand von Forellen...*

Es ist bekannt, dass Fische auf belastete Abwässer mit Verschlechterungen des Gesundheitszustandes reagieren, die sich im schlimmsten Fall als verringerte Fitness und erhöhte Sterblichkeit zeigen. Die Art der Abwässer und die Konzentration schädlicher Stoffe ist ausschlaggebend dafür, mit welchen Veränderungen der Fisch reagiert. Zur Zusammensetzung des Abwassers und der Konzentrationen kann sich die Untersuchung an den vorliegenden Garantiewerten des Abwassers orientieren. Bisherige Messungen der Konzentrationen und Abwassermengen zur Überprüfung der (errechneten) Garantiewerte ergeben tiefere Werte als die Garantiewerte. Die weiteren Messungen der effektiven Werte werden langfristig Aufschluss über die wirklichen Konzentrationen und Frachten ergeben (mdl. Mitteilung J. Marti, AfU Glarus).

Daneben sollten mögliche synergistische Effekte mit im Linthkanal vorhandenen Substanzen berücksichtigt werden, auf die in der Limnex-Studie (Limmex 1996) als unbekannte Grösse verwiesen wurde (vgl. im Limnex-Bericht S. 7 für Schwermetallgehalte, S. 8 für Sulfid- und Fluoridgehalte und S. 10 für Ökotoxizität generell). Deshalb wurde ein passives Monitoring durchgeführt, bzw. eine Eiexposition im Wasser des Linthkanals vorgenommen.

Die drei Organe Leber, Niere und Kieme sind zentrale Stoffwechselorgane. Hier zeigen sich sowohl spezifische als auch unspezifische Veränderungen von Tieren sehr früh. Aus dem Verhältnis von Länge zu Gewicht kann der Konditionsfaktor als biome-

trischer Index berechnet werden. Er erlaubt eine grobe Abschätzung der Fitness der Fische. (Teilbericht Holm / Wahli)

=> Der Gesundheitszustand der Forellen oberhalb und unterhalb der Einleitstelle wird anhand der histologischen Veränderungen von Leber, Niere und Kieme sowie aufgrund des Konditionsindexes beurteilt.

#### *zu 2.a Die Schwermetallbelastung in der Kieme...*

Sowohl für Salze als auch für Schwermetalle stellt die Kieme die wichtigste Eintrittspforte in den Fisch dar. Bei Fischen, die erhöhten Salz- und/oder Schwermetallgehalten ausgesetzt waren, zeigen sich dementsprechend deutliche Veränderungen in den Kiemen. Schwermetalle werden dort, aber auch in Leber und Niere, an metallbindende Proteine (Metallothioneine) gebunden. Eine erhöhte Synthese dieser Proteine deutet auf eine Schwermetallbelastung und eine beginnende Vergiftung hin. (Teilbericht Holm / Wahli)

#### *zu 2.b Die Schwermetallbelastung in der Leber...*

Da in Leber und Niere die Metallothioneine durch die meisten Schwermetalle am stärksten induziert werden, wird auch die Leber in die Untersuchung einbezogen und eine semi-quantitative Analyse der Metallothioneine vorgenommen (s. Teilbericht EUREGIO, Dietrich 2001).

=> Es wird deshalb die Schwermetallbelastung von Kieme und Leber der Forellen aus dem Linthkanal oberhalb und unterhalb der Einleitstelle anhand der Metallothionein - Synthese untersucht.

#### *zu 3. Der Immunstatus von Forellen...*

Von vielen Metallen ist bekannt, dass sie eine Immunsuppression in Fischen bewirken. Daneben haben zahlreiche andere Stoffe, die zum Teil auch in verschiedenen Abwässern enthalten sind, Effekte auf das Immunsystem. Wechselwirkungen zwischen solchen Stoffen und Umweltbedingungen können toxische Wirkungen verstärken und den Fisch für Krankheiten anfälliger machen (Anderson 1995).

(s. Teilbericht EUREGIO, Dietrich 2001)

=> Der Immunstatus von Forellen, oberhalb und unterhalb der Einleitstelle, wird anhand verschiedener immunologischer Parameter erhoben.

zu 4. *Die Mortalität, Malformationen und Wachstumsinhibition bei Zebrafisch-Embryonen...*

80% der bekannten Schadstoffe wirken negativ auf Frühstadien der Fische. Es sollten deshalb Untersuchungen an Embryonen einbezogen werden (Dietrich 1998). Diese können aufgrund ihrer hohen Aussagekraft und allgemein anerkannter Kriterien ein sehr differenziertes Bild über Beeinträchtigungen der Frühstadien von Fischen liefern. (s. Teilbericht EUREGIO, Dietrich 2001)

=> Die Mortalität, Malformationen und Wachstumsinhibition bei Zebrafisch-Embryonen (*Danio rerio*), die dem Flusswasser im Linthkanal oberhalb der Einleitstelle und Abwasser der KVA in verschiedenen Verdünnungen exponiert worden sind, werden anhand einer standardisierten Methode bestimmt.

zu 5. *Die akute Immobilisation von Daphnien (Wasserflöhe)*

Untersuchungen an Invertebraten sollten die Studie ergänzen, da diese bedeutenden Anteil am funktionierenden Ökosystem haben und wichtige Fischnährtiere darstellen. Es bietet sich hierfür der Daphnientest an, bei dem Wasserflöhe im Labor in verschiedenen Verdünnungen im Wasser (mit und ohne Anteile von Filterwaschwasser) exponiert werden. (s. Teilbericht EUREGIO, Dietrich 2001)

=> Die akute Immobilisation von Daphnien nach Exposition im Flusswasser aus dem Linthkanal oberhalb der Einleitstelle und Abwasser der KVA in verschiedenen Verdünnungen wird anhand einer standardisierten Methode bestimmt.

zu 6. *Überlebensrate von Forelleneiern...*

Fischeier reagieren sehr sensitiv auf vielfältige Belastungen. Zur Abklärung von Effekten auf die frühembryonale Entwicklung werden deswegen oft Eiexpositionsexperimente herangezogen (z.B. Escher 1999). Die Erhebung der Mortalität stellt einen integrativen Parameter dar, der verschiedene Effekte integrieren kann und sehr sensitiv reagiert. (s. Teilbericht Aquatica GmbH, Guthruf 2001)

=> Das Überleben von Forelleneiern, die im Linthkanal oberhalb und unterhalb der Einleitstelle exponiert wurden, wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 183, 364 und 534 Tagesgraden) und an jeweils 3 Stellen auf beiden Seiten des Ufers (je 2 unterhalb und 1 oberhalb der Einleitstelle) erhoben.

Im folgenden sind die Methoden und Ergebnisse der Untersuchungen 1-2a zusammengefasst, im separaten Anhang sind die zugrundeliegenden Rohdaten zusammengestellt. Der Teilbericht EUREGIO (beiliegend) geht auf Untersuchungen 2b - 5 ein, der Teilbericht der Aquatica GmbH (beiliegend) beschreibt die Untersuchung 6, also die des passiven Monitorings mit Fischeiern.

Teilberichte zur Untersuchung der Biozönose im Linthkanal im Bereich der Salzwassereinleitung der KVA Niederurnen:

**Dietrich** (2001): Untersuchungen der Biozönose im Linthkanal im Bereich der Salzwassereinleitung der KVA Niederurnen. Konstanz, pp. 1-13.

**Guthruf** (2001): Untersuchung der Biozönose im Linthkanal im Bereich der Salzwassereinleitung der KVA Niederurnen, Exposition von Forelleneiern - ENTWURF 20.7.01. Oberwichteracht, pp. 1-20.

## 2. Teilbericht Holm / Wahli: Methoden

### *Fische*

Für die Status ante-Untersuchungen an den Forellen (vor Beginn der Einleitung des Waschwassers) erfolgten Probennahmen am 11.02.2000 unterhalb der (zukünftigen) Einleitstelle und am 14.02.2000 oberhalb der Einleitstelle des Filterwaschwassers. Für die Status post-Untersuchungen wurde die Probennahme am 13. 02.2001 oberhalb und unterhalb der (in Betrieb genommenen) Einleitstelle durchgeführt.

Je 20 Fische wurden mittels Elektrofischfang vom Ufer aus gefangen, vor Ort mit gepuffertem 3-Aminobenzoesäure-Ethylester-Methansulfonat (Finquel, Argent Chemical Labs., Redmond, USA) betäubt und getötet.

Die Tiere wurden gemessen und gewogen (Längen- und Gewichtsangaben s. Teilbericht EUREGIO, Tabellen 1 und 2), Leber, Niere und Kieme wurden entnommen und Teile davon in gepuffertem 4%-Formalin fixiert.

### *Histologische Untersuchungen*

Die histopathologische Beurteilung von Kieme, Leber und Niere erfolgt an Hämalaun-Eosin gefärbten Paraffinschnitten. Um einen Vergleich mit anderen Studien zu ermöglichen, wurde die Auswertung nach dem vom FIWI erstellten Histomatrix-Protokoll vorgenommen (Bernet 1998). Dazu wurde das Ausmass verschiedener histopathologischer Veränderungen in den Organen Leber, Niere und Kieme mit einer Skala von 0 (keine Veränderungen) bis 6 (sehr starke Veränderungen) bewertet.

Die Art der Veränderungen ist in 5 verschiedene Kategorien eingeteilt: (I) zirkulatorisch (z.B. Blutungen, Aneurismen), (II) regressiv (z.B. Cytoplasma und Kernveränderungen, Nekrosen), (III) progressiv (z.B. Hypertrophie, Hyperplasie), (IV) entzündlich (z.B. Infiltration von Zellen des Immunsystems), (V) neoplastisch (z.B. gutartige oder bösartige Neoplasien).

Organ-Indizes für Kiemen (IK), Leber (IL) und Niere (IN) wurden aus der Summe der einzelnen Werte der entsprechenden Organe errechnet. Die Summer aller 3 Organindizes ergab schliesslich den Totalindex (TotI) für jeden einzelnen Fisch. Der Totalindex liefert demnach eine gesamthafte Aussage zu allen Veränderungen in allen untersuchten Organen. Um eine Verschiebung im Bewertungsstabsstab im Laufe der jeweiligen Auswertungen (jeweils ca. 2-3 Stunden) zu verringern, wurde eine Blindbewertung der durchmischten Proben vorgenommen (d.h. die Gruppenzugehörigkeit der bewerteten Proben war nicht bekannt).

### *Immunhistochemische Untersuchungen*

Paraffinschnitte der Kieme wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Barsch-Metallothionein (freundlicherweise von C. Hogstrand, Kings College, London, zur Verfügung gestellt) und nachfolgend mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Zur Visualisierung wurde die PAP-Methode angewendet. Das Auftreten immunhistochemisch positiver Chloridzellen wurde lichtmikroskopisch ausgewertet. Für die semiquantitative Analyse wurden pro Kiemenbogen von jedem Tier 3 Kiemenfilamente in Bezug auf das Auftreten deutlich immunpositiver Chloridzellen ausgezählt (Burkhardt-Holm 1999). Zur Erhöhung der Vergleichbarkeit zwischen den beiden Untersuchungsjahren wurden alle Kiemenschnitte nochmals gemeinsam im Jahr 2001 ausgewertet.

### *Biometrischer Index*

Der Konditionsindex wurde nach der Fulton Formel berechnet (Steffens 1985):

$$KI = 100 * \text{Gewicht (in g)} / \text{Länge}^3 \text{ (in cm)}.$$

### *Datenanalyse*

Die gefundenen Werte wurden grafisch dargestellt und beschreibend bewertet (siehe auch die Teilberichte EUREGIO und Aquatica GmbH).

Die errechneten Indexwerte für Organveränderungen sowie die semi-quantitativen Daten der immunhistochemischen Untersuchung wurden ebenfalls grafisch dargestellt und beschreibend bewertet, sowie teilweise statistischen, nicht-parametrischen Tests unterzogen.

### 3. Teilbericht Holm / Wahli: Resultate und Diskussion

#### I) Histologische Veränderungen von Leber, Niere und Kieme

##### Vergleich Status ante mit Status post

1 Jahr nach Beginn der Einleitung der KVA-Abwässer in den Linthkanal wurde ein Totalindex für alle drei Organe von 43 oberhalb und 38 unterhalb der Einleitstelle erhoben (jew. Mittelwert angegeben, siehe Tabelle 1 und Abbildung 1). Im Jahr zuvor waren die Werte mit 53 (oberhalb) und 58 (unterhalb) etwas höher.

Ähnlich geringe Unterschiede wurden bei der gesonderten Betrachtung der Organindizes festgestellt: die Organindizes lagen im Jahr 2000 oberhalb der Einleitstelle bei 25 (Leber), 18 (Niere), 17 (Kieme) und unterhalb bei 26 (Leber), 19 (Niere) und 18 (Kieme). In Untersuchungsjahr 2001 wurden Werte oberhalb der Einleitstelle von 20 (Leber), 13 (Niere), 10 (Kieme) und unterhalb von 20 (Leber), 11 (Niere) und 8 (Kieme) ermittelt (Abbildung 2).

Indizes	2000		2001	
	unterhalb	oberhalb	unterhalb	oberhalb
<b>Totalindex</b>	<b>58</b>	<b>53</b>	<b>38</b>	<b>43</b>
Leber (IL)	26	25	20	20
Niere (IN)	19	18	11	13
Kieme (IK)	18	17	8	10

Tabelle 1: Untersuchung der histologischen Veränderungen: Organindizes für Leber, Niere und Kiemen sowie der Totalindex der Veränderungen (Mittelwerte, jeweils 20 Forellen je Probenahmestelle). ‚Unterhalb‘ bezeichnet die Ergebnisse der Probenahme von unterhalb der Einleitstelle des Waschwassers, ‚oberhalb‘ bezieht sich auf die Probenahmestelle oberhalb der Einleitstelle.

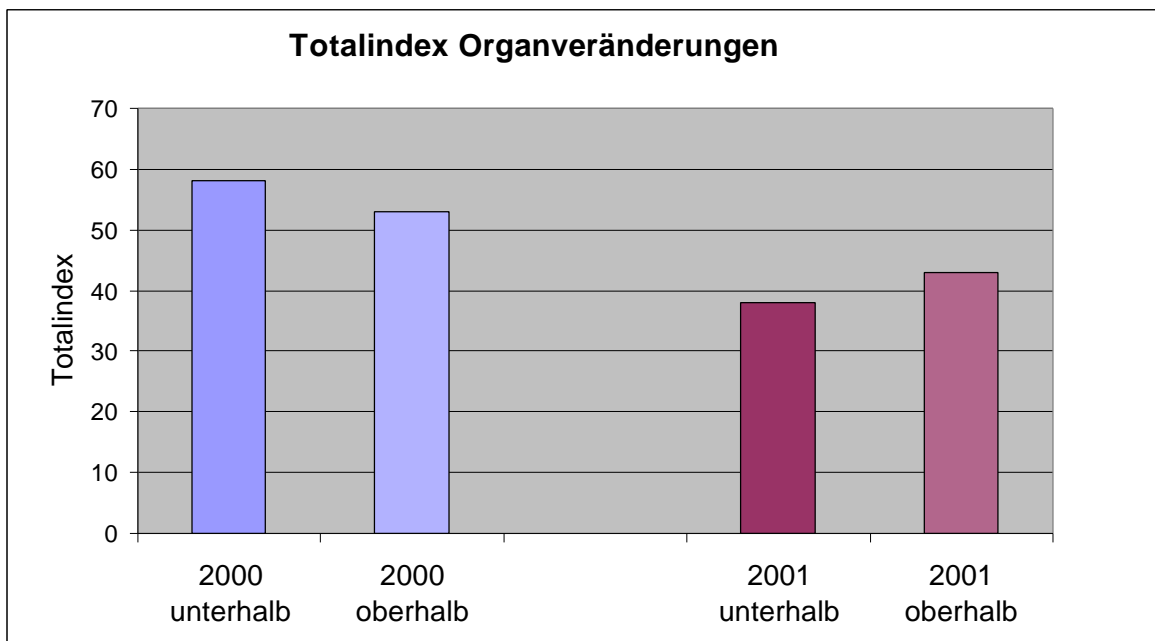


Abb. 1: Totalindex der histologischen Untersuchungen an Forellen oberhalb und unterhalb der Einleitstelle in den Jahren 2000 und 2001.

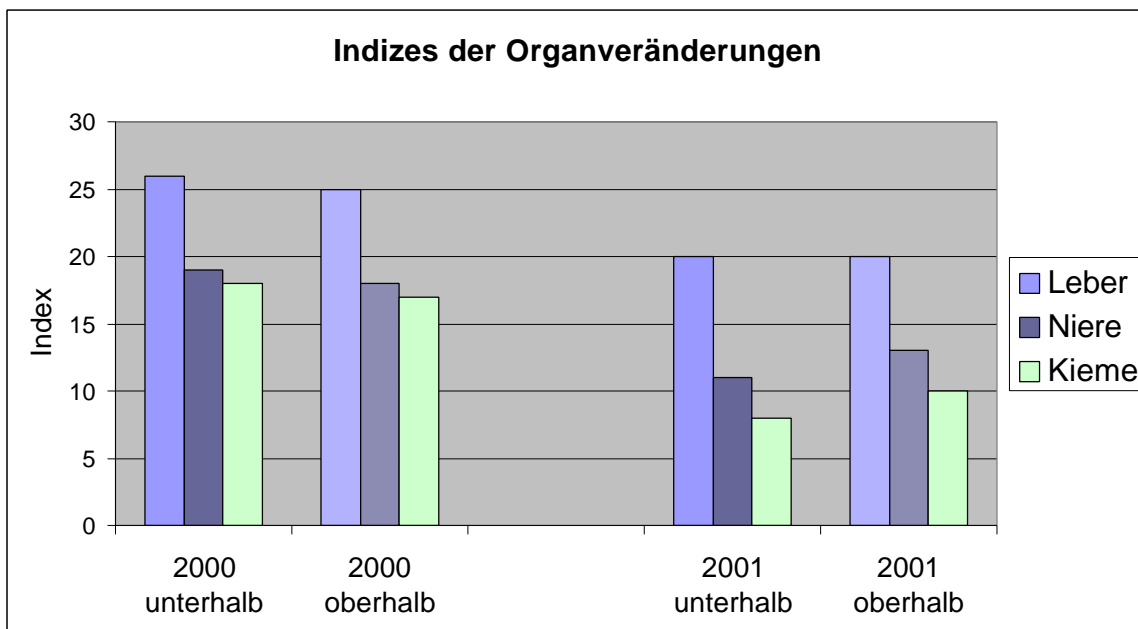


Abb. 2: Organindizes der histologischen Untersuchungen an Forellen oberhalb und unterhalb der Einleitstelle in den Jahren 2000 und 2001.

Die Kategorienindizes, bei denen nach der Art der Veränderung (regressiv, progressiv oder entzündlich) unterschieden wurde, laufen ebenfalls parallel und bewegen sich in vergleichbaren Grössenordnungen (Abbildung 3). Regressive Veränderungen machen in beiden Jahren mehr als 70% der Totalindizes aus.

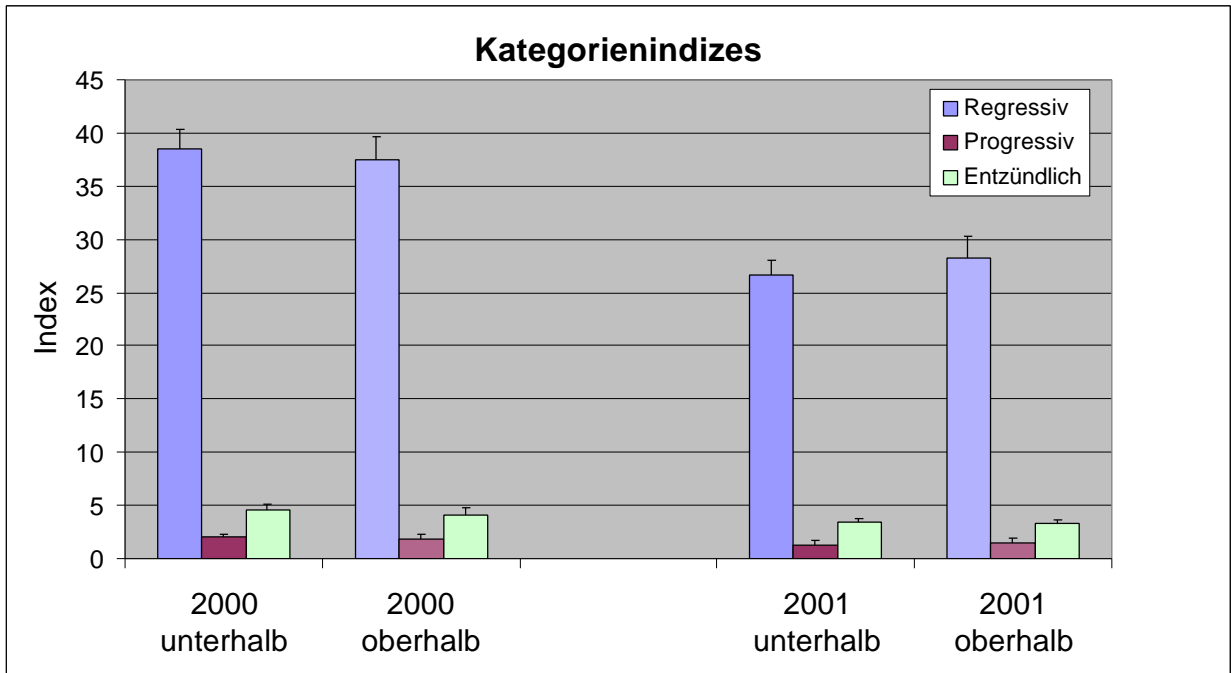


Abb. 3: Kategorienindizes der histologischen Untersuchungen an Forellen oberhalb und unterhalb der Einleitstelle in den Jahren 2000 und 2001. Zirkulatorische und neoplastische Veränderungen wurden nicht beobachtet.

Die Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungszeiträumen sind vernachlässigbar klein.

Wahrscheinliche Ursachen sind:

- Veränderte Rahmenbedingungen, die die Ausprägung der histologischen Indizes beeinflussen: Sowohl das Temperaturregime, als auch interspezifische und intra-spezifische Konkurrenz können sich auf den Gesamtstress, dem der Fisch im Lebensraum ausgesetzt ist, niederschlagen. Einen Einfluss hat auch das Abflussregime, zumal es unmittelbar das Verdünnungsverhältnis und damit die Konzentration von schädlichen Substanzen bestimmt. Da die Histopathologie ein integrativer

Parameter ist, kann aus einer Veränderung in den entsprechenden Indizes jedoch nicht auf die Ursache(n) geschlossen werden.

- Methodische Unterschiede: Die eingesetzte Methode ist als standardisiertes, semi-quantitatives Verfahren zu betrachten (Bernet 1998). Da eine Auszählung der betroffenen histologisch-cytologischen Einheiten jedoch technisch nicht machbar ist, muss sich das Evaluationsteam auf eine Abschätzung beschränken. Aufgrund einer Blindauswertung und der Einschätzung durch zwei unabhängige WissenschaftlerInnen ist eine Annäherung an eine objektive Beurteilung möglich. Das Evaluationsverfahren kann jedoch in seiner Objektivierbarkeit nicht mit rein quantitativen Bewertungen (technische Messungen) verglichen werden. Abweichungen von 1-2 Einheiten bei mehrmaliger Bewertung müssen deshalb als möglich in Betracht gezogen werden. Unter diesen Umständen ist den Unterschieden in den Indizes zwischen den Untersuchungsjahren kein relevanter Charakter beizumessen.

#### Vergleich mit anderen Studien

Alle erhobenen Indizes liegen in Grössenordnungen, die aus anderen Studien an Fischen aus eher wenig belastetem Wasser erhoben worden sind.

Bei Forellen relativ unbelasteter Gewässern im St. Galler Rheintal wurden Totalindizes (ebenfalls bestehend aus Indizes von Leber, Niere, Kieme, welche mit derselben Methodik ausgewertet wurden) im Bereich von 70 bis 80 festgestellt, im Trinkwasser gehältere Tiere wiesen Werte zwischen 40 und 50 auf (Eugster 2001).

In beiden Untersuchungsjahren wurden an der KVA Niederurnen die relativ höchsten Werte in der Leber festgestellt, gefolgt von Niere und Kieme (Tabelle 1, Abbildung 2). Auch die Werte in der Leber liegen im Bereich von Werten von Forellen gering belasteter Herkunft (Eugster 2001).

Die deutlichsten Veränderungen wurden in beiden Jahren in der Kategorie regressive Veränderungen beobachtet, während Veränderungen in den Kategorien progressiv und entzündlich vernachlässigbar waren. Veränderungen der Kategorien zirkulatorisch und neoplastisch waren nicht vorhanden (Abbildung 3). Dieses Bild und die Höhe der Werte entsprechen ebenfalls dem anderer Untersuchungen für Tiere aus Trinkwasserkontrollen (Schmidt-Posthaus 2000, Eugster 2001).

Histopathologische Veränderungen oberhalb und unterhalb von Punktquellen wurden in zahlreichen Studien untersucht, da derartige Parameter als verlässliche Indikatoren

für eine Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes der Fische gelten (Übersicht z.B. Adams 1990, Hinton 1990). In der Schweiz wurden vor allem Untersuchungen des Kläranlageneinflusses auf die Histologie der Leber (Burkhardt-Holm 2001), zusätzlich der Niere (Schmidt-Posthaus 2000), ergänzt mit Befunden zur Kieme (Eugster 2001) oder auch noch der Haut (Escher 1999, Schmidt 1999, Bernet 2000) durchgeführt. Die Resultate zeigen in einigen Fällen deutlich nachteilige Wirkungen der Kläranlagenabwässer, in anderen ist ein solcher jedoch nicht zu erkennen (z.B. ARA Lotzwil BE, Schmidt 1999). Wie auch im Fall der hier vorliegenden Studie erweist sich die Histopathologie als relevanter, jedoch nicht hochsensitiver Anhaltspunkt für eine Schädigung, welche nicht spezifisch für verursachende Faktoren ist. Aus dem Fehlen einer histopathologischen Schädigung kann deshalb nicht das Fehlen jeglichen negativen Einflusses geschlossen werden. So wurden Forellen von oberhalb und unterhalb von 41 Kläranlagen bezüglich histopathologischer Veränderungen der Leber verglichen: sie zeigten keine signifikanten Unterschiede. Auch bei Forellen, welchen Östradiol injiziert worden war, wurde keine dosisabhängige Wirkung auf die Leberhistologie beobachtet (Burkhardt-Holm 2001).

**=> Die in den verschiedenen Untersuchungsjahren und an den Probenahmestellen erhobenen histologischen Daten deuten auf eine nur geringfügige gesundheitliche Beeinträchtigung der Forellen hin, wie sie in fast allen Studien an Referenzgewässern beschrieben wird.**

## II) Immunhistochemischer Nachweis von metallbindenden Proteinen in Kiemen

Fischkiemen sind primäre Zielorgane für die Toxizität vieler Schwermetalle. Die Kiemen reagieren besonders empfindlich bei akuten Belastungen (McDonald 1993, Wendelaar Bonga 1997), während die Leber für chronische Belastungen mit Schwermetallen eines der empfindlichsten Organe darstellt. Die Menge an Metallothionein (einem metallbindenden Protein) in der Kieme spiegelt den Metallgehalt im Wasser sehr deutlich wieder (z.B. Olsvik 2000). Das Vorhandensein dieser Proteine in Leber und Kiemen ist bedingt durch den Metabolismus und den Ort der toxischen Wirkung von Schwermetallen. Da eine Zunahme der Metallothioneine deutlich den Effekt einer vorangegangenen Exposition anzeigt, eignen sie sich gut als Biomarker für eine Schwermetallbelastung.

### Vergleich Status ante mit Status post

Für die Bestimmung der Induktion von Metallothionein wurden pro Fisch in jeweils 3 Filamenten die Anzahl markierter Chloridzellen gezählt (an unterschiedlichen Regionen der Filamente: Spitze, Mitte und Basis). Der Durchschnitt der Zählungen an den 3 Filamenten ergibt die Belastung pro Fisch.

In fast allen Forellen (über 85% der Fische) wurden Metallothionein-positive Chloridzellen festgestellt, ihre Zahl war jedoch zwischen den Tieren sehr unterschiedlich. Das bestätigt frühere Befunde (Burkhardt-Holm 1999, Hogstrand, mdl. Mitteilung). Wenige Tiere (insgesamt n=13) ohne positive Metallothionein-Chloridzellen wurden in beiden Jahren ebenso beobachtet wie einzelne Tiere mit hohen Zahlen.

Bei den meisten Forellen wurden Chloridzellzahlen zwischen 0 und 6 gezählt. Zu beachten ist eine hohe Variabilität der Daten sowohl in 2000 wie auch 2001 (siehe die Minima und Maxima-Werte und die mittleren absoluten Abweichungen der Mediane MAD in Tabelle 2 und den Abbildungen 4 und 5).

Die folgende Tabelle zeigt die Resultate im Überblick:

Markierte Chloridzellen	2000		2001	
	unterhalb	oberhalb	unterhalb	oberhalb
Median	0.5	1.8	3	3.7
Mittlere absolute Abweichung MAD	0.5	1.2	2.7	2.0
Minima	0	0	0	0
Maxima	8	13	7.3	16.3

Tabelle 2: Immunhistochemischer Nachweis von metallbindenden Proteinen in Chloridzellen der Kieme (jeweils 20 Forellen je Probenahmestelle).

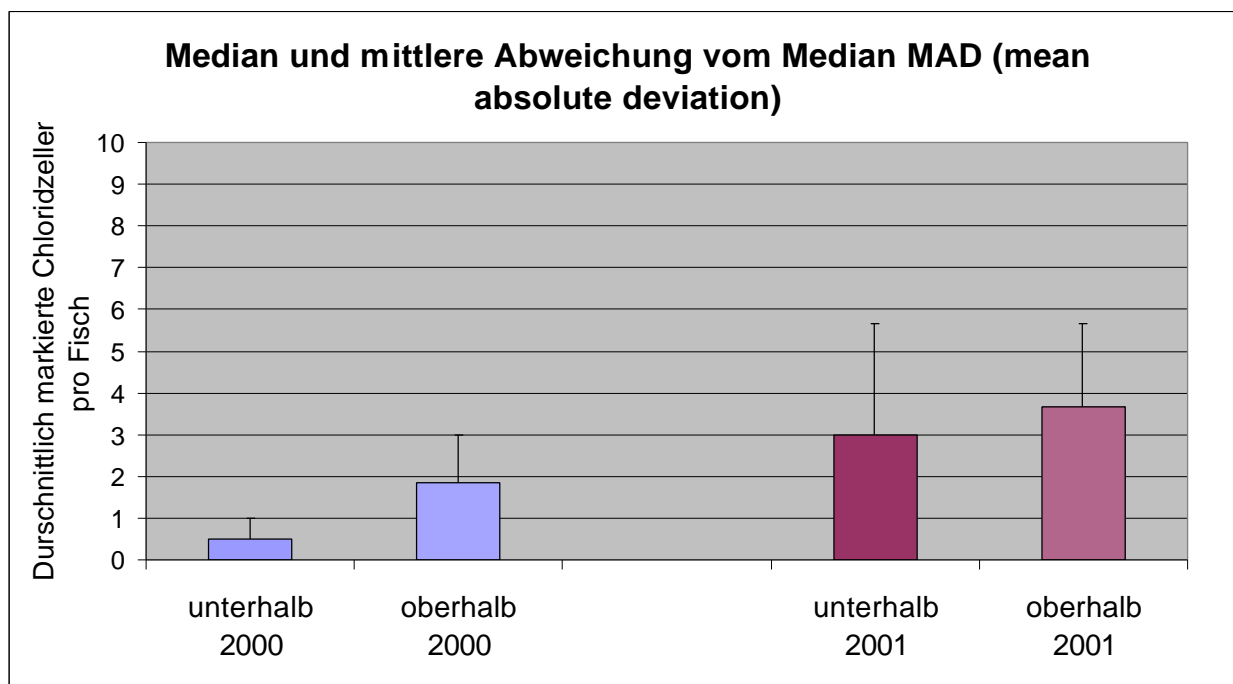


Abb. 4: Metallothionein-positive Chloridzellen an Kiemenfilamenten von Forellen oberhalb und unterhalb der Einleitstelle im Jahr 2000 und 2001: Median sowie die mittlere, absolute Abweichung MAD vom Median als robustes Mass der Streuung.

Die Unterschiede zwischen den Probenahmestellen waren in beiden Jahren gering, der Median oberhalb der Einleitstelle liegt 2001 bei 3.7 Chloridzellen pro Fisch, der Median unterhalb der Einleitstelle liegt 2001 bei 3.0 Chloridzellen (Tabelle 2 und Abbildung 5).

Im Vergleich zu den Daten vom Jahr 2000 ergeben sich ebenfalls geringe Unterschiede. Im Jahr 2000 betrug der Median oberhalb der Einleitstelle 1.8 markierte Chloridzellen, unterhalb der Einleitstelle betrug er 0.5 Chloridzellen. Im Jahr 2001 wurden an den Forellen von beiden Stellen gesamthaft mehr markierte Chloridzellen gezählt als im Jahr davor.

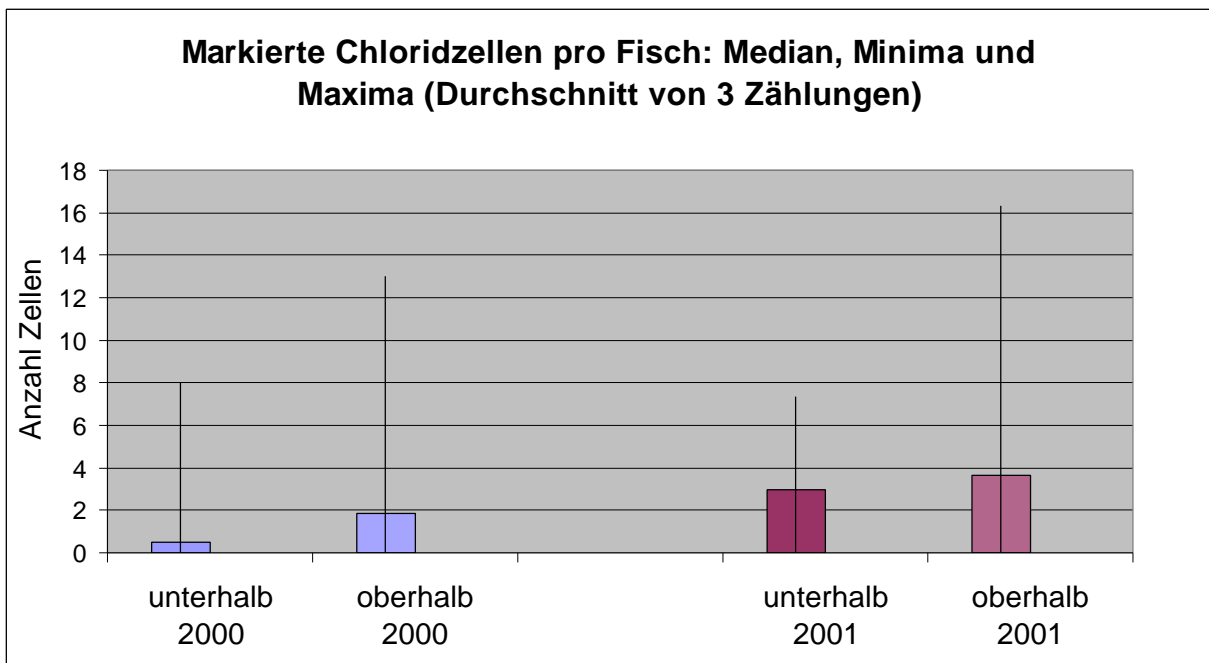


Abb. 5: Mittlere Anzahl markierter Chloridzellen pro Fisch: Median und Minimal- und Maximalwerte.

Die Anzahl markierter Chloridzellen pro Fisch zeigen zwischen der Probenahmestelle oberhalb und unterhalb keine grossen Unterschiede, wie aus den Abbildungen 4 und 5 ersichtlich ist.

In beiden Jahren wurden in Fischen aus der Probenahmestelle oberhalb der Einleitstelle mehr markierte Chloridzellen gezählt als in solchen, die unterhalb der Einleitstelle gefangen wurden.

Die Verteilung von Fischen mit einer definierten Anzahl von Chloridzellen zeigt 4 Individuen mit einer deutlich erhöhten Chloridzellzahl (13 markierte Zellen und mehr pro Fisch, Abbildung 6).

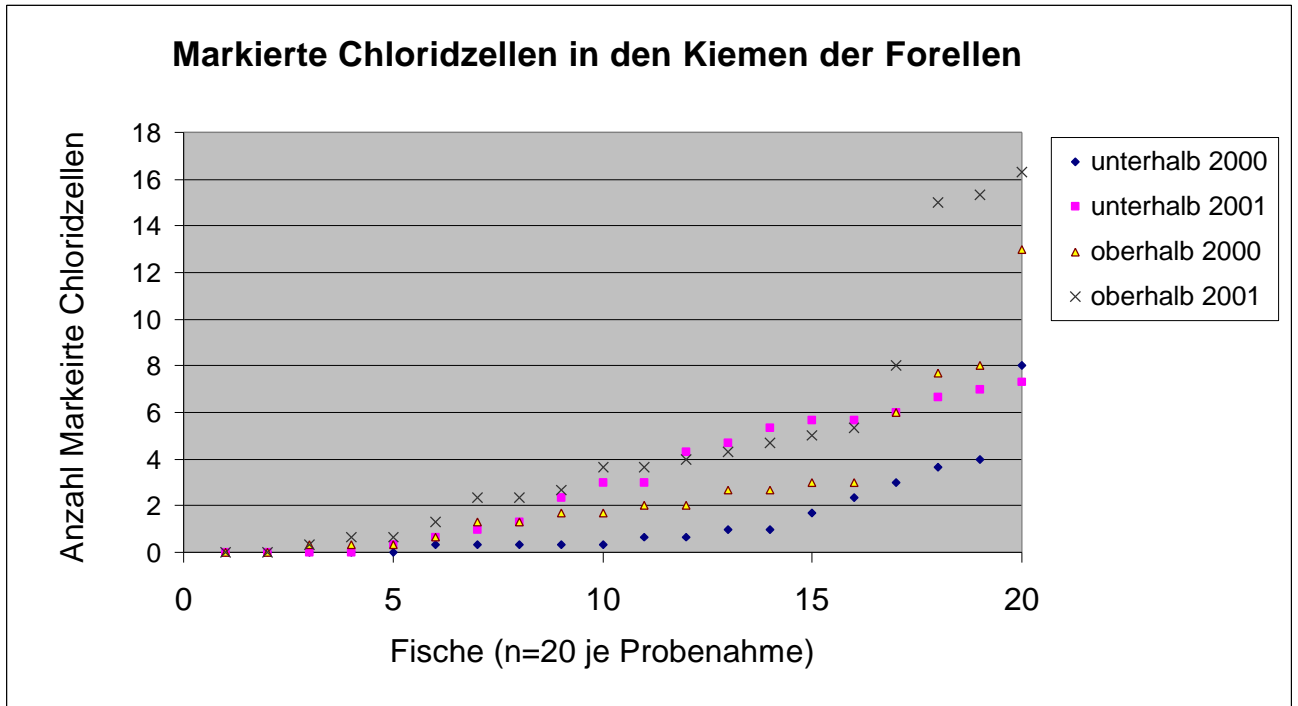


Abb. 6: Die Anzahl markierter Chloridzellen bei den Forellen der unterschiedlichen Jahre und Probenahmestellen. Zu beachten sind die vier hohen Werte von über 13 markierte Zellen pro Fisch.

Für die hohen Werte konnten aus den vorliegenden Daten keine offensichtlichen Korrelationen und Erklärungen gefunden werden (bsp. sehr lange Tiere, sehr magere Tiere). Eine Korrelation zwischen der Anzahl metallothionein-positiver Zellen und der Länge oder des Gewichtes der Fische ist visuell auf Grafiken (Daten nicht gezeigt) nicht ersichtlich.

Die Daten sind nicht normalverteilt, wie dies bei Zählwerten oft vorkommt (siehe Verteilungen der Anzahl markierter Zellen, Abbildung 7). Sogenannte Quartil-Quartil- oder Q-Q Plots der Daten bestätigen diese Annahme (Daten nicht gezeigt). Deshalb werden nicht-parametrische Tests durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen den Jahren und Probenahmestellen herauszufinden.

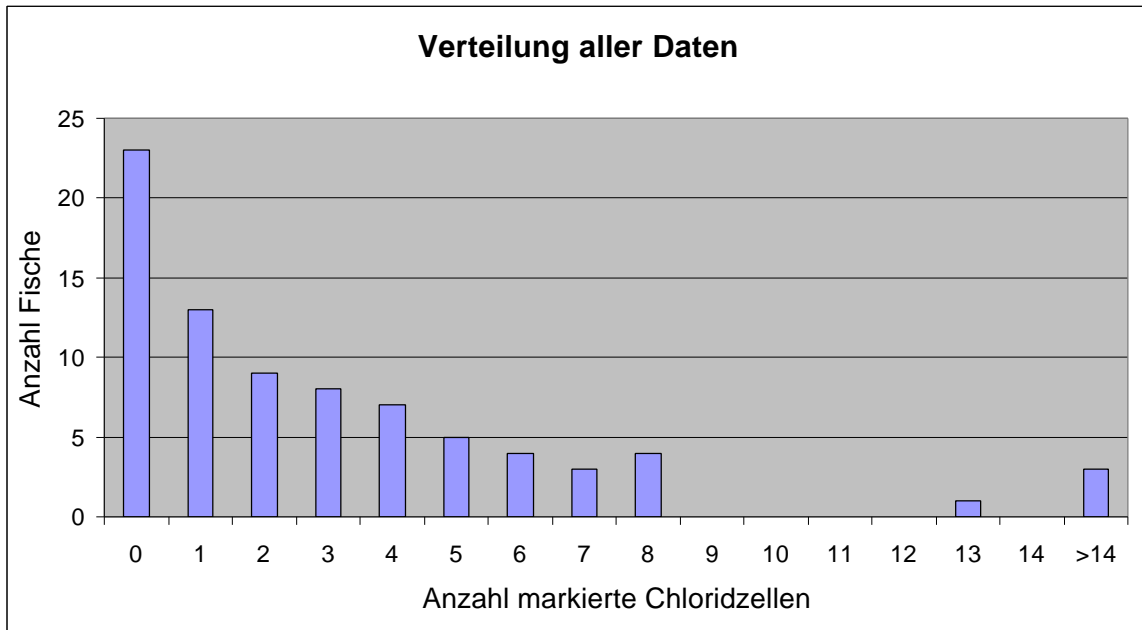


Abb. 7: Verteilung der Werte

Die statistischen Tests ergaben folgendes Ergebnis: Die nicht-parametrischen Tests (Kruskal-Wallis, Daten nicht gezeigt) ergeben signifikante Unterschiede innerhalb der Probenahmestellen ( $p = 0.051$ ) als auch bezüglich der Jahre ( $p = 0.013$ ). Dies ist auf die tiefen Werte im Jahr 2000 unterhalb der Einleitstelle zurückzuführen. Eine Betrachtung der Unterschiede zwischen den einzelnen Jahren und Probenahmeorten zeigt einzig eine Signifikanz zwischen den Werten der Stellen "Unten 2000" und "Oben 2001" (Mann-Whitney U, Daten nicht gezeigt) und unterstreicht die tiefen Werte von "Unten 2000".

Die übrigen Unterschiede sind nicht signifikant, insbesondere der interessierende Vergleich von Oben und Unten im Jahre 2001 ergibt keinen statistisch signifikanten Unterschied, wie auch die Betrachtung der Abbildung 4 und Boxplots mit Median und den 25 und 75% Quartilen (Daten nicht gezeigt) vermuten lässt.

### Vergleich mit anderen Studien

Wenige Untersuchungen beziehen sich auf die Messung von Metallothioneinen in Chloridzellen an Forellen aus freien Gewässern. In Flüssen, die durch Bergbau verschmutzt waren, wurden deutliche Anstiege im Metallothioneingehalt der Kiemen und anderer Organe festgestellt, die eine klare Korrelation zur Metallbelastung im Wasser zeigten (Olsvik 2000). In der Langeten, ein Fluss im Kanton Bern, der aufgrund seines geringen Bachforellenbestandes untersucht wurde, konnte eine Zunahme von Metallothionein-positiven Chloridzellen in der Kieme nur bei solchen Tieren festgestellt werden, die unmittelbar dem gereinigten Abwasser der ARA Lotzwil (bei einer Verdünnung 1:10) ausgesetzt waren. Mit zunehmender Entfernung von dieser Punktquelle und entsprechend zunehmender Verdünnung liess der Effekt deutlich nach (Burkhardt-Holm 1999).

Ein weiterer, sehr wesentlicher Unterschied zwischen den Resultaten der vorliegenden Studie und der Langeten-Untersuchung ist die Intensität der Methallothionein-Markierung: die Chloridzellen waren in Forellen des Linthkanals stets nur schwach markiert, während in der genannten Langetenstudie die gezählten Zellen immer eine sehr intensive braun-schwarze Färbung zeigten.

**=> Die oberhalb und unterhalb der KVA Niederurnen erhobenen Resultate weisen deshalb auf eine nur sehr geringe Belastung mit Metallothionein-induzierenden Faktoren auf die *Kieme* hin, die nach den vorliegenden Resultaten kaum über das übliche Mass der natürlichen Belastung hinausgeht.**

**Die Resultate zum Teilbereich 2b. Immunbiochemischer Nachweis von metallbindenden Proteinen in der *Leber* sind im Teilbericht EUREGIO im Detail aufgeführt.**

### III) Biometrische Masszahlen der Forellen, Vergleich der Probenahmen

#### Konditionsindex der Forellen

Um mögliche Unterschiede zwischen den Probenahmeorten und den Probenahmezeitpunkten besser erklären zu können, bzw. mit einer gegebenenfalls unterschiedlichen generellen Fitness der untersuchten Forellen in Beziehung setzen zu können, wurde der Konditionsindex berechnet. Ein Konditionsindex von 1 wird als durchschnittlich angegeben; er kann im Bereich um 1 schwanken. Die untersuchten Forellen aus dem Linthkanal wiesen einen leicht unterdurchschnittlichen Konditionsindex auf. Ein Vergleich der Konditionsindizes der Fische im Jahr 2000 und 2001 unter- und oberhalb der Einleitstelle (Abbildung 8) zeigt ein recht homogenes Bild. Die Daten ergeben keine grossen Unterschiede der Konditionsindizes der Forellen, die auf eine wesentliche Beeinträchtigung hinweisen würden. Die Stichproben sind vergleichbar.

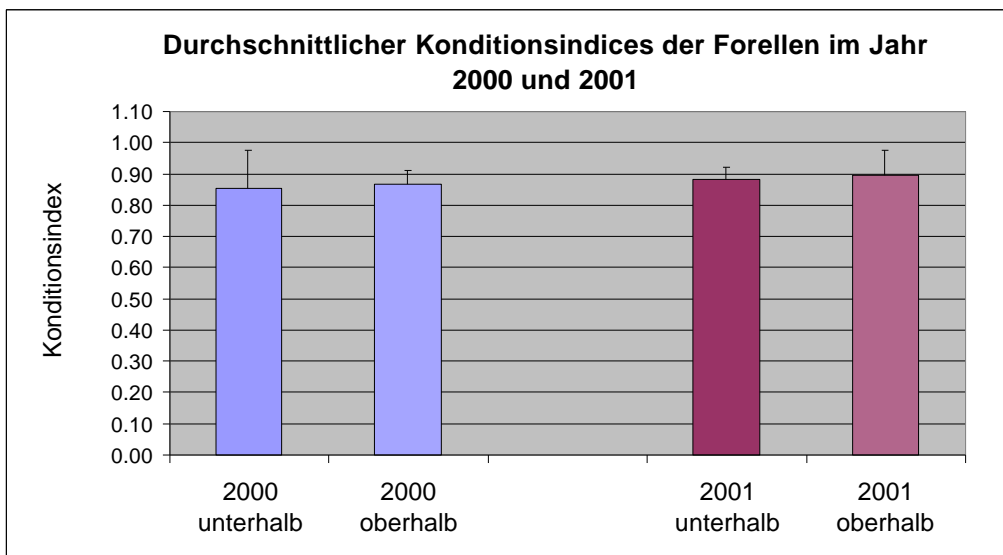


Abb. 8: Konditionsindizes der Forellen im Vergleich zwischen den Jahren 2000 und 2001 sowie der Probenahmestelle unterhalb und oberhalb der Einleitstelle.

Die Einteilung der Konditionsindizes nach Grössenklassen zeigt, dass die Daten annähernd normalverteilt sind (Abbildung 9).

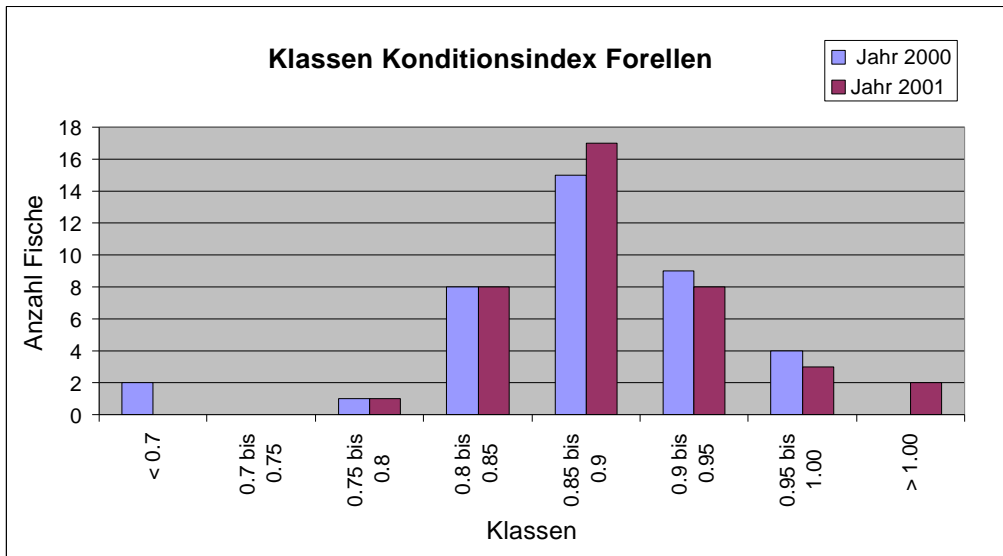


Abb. 9: Verteilung der klassierten Konditionsindizes. Die Verteilungen sind nicht durch grosse Unterschiede gekennzeichnet.

#### Grössenklassen und Verteilung der Forellen

Ferner wurden die Längen der Forellen und Gewichte in Bezug auf ihre Verteilung betrachtet. Es ergibt sich eine annähernde Normalverteilung der Daten. Die Unterschiede zwischen den Jahren sind gering (Abbildungen 10 und 11). Es besteht eine hohe Korrelation zwischen der Länge und dem Gewicht der Fische (Daten nicht gezeigt).

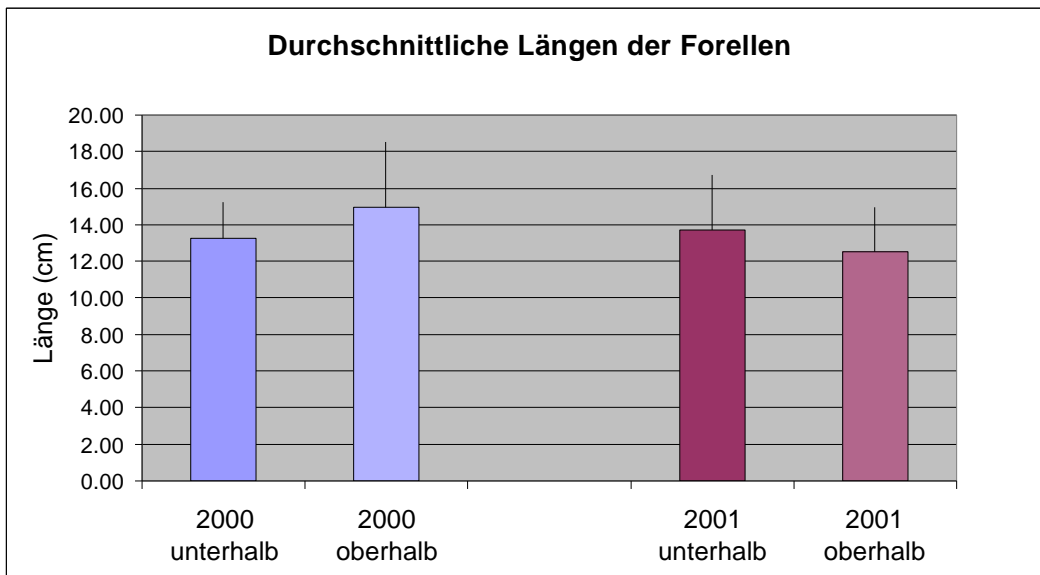


Abb. 10: Die Betrachtung der durchschnittlichen Längen der Forellen weist auf keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Jahren und Probenahmestellen hin.

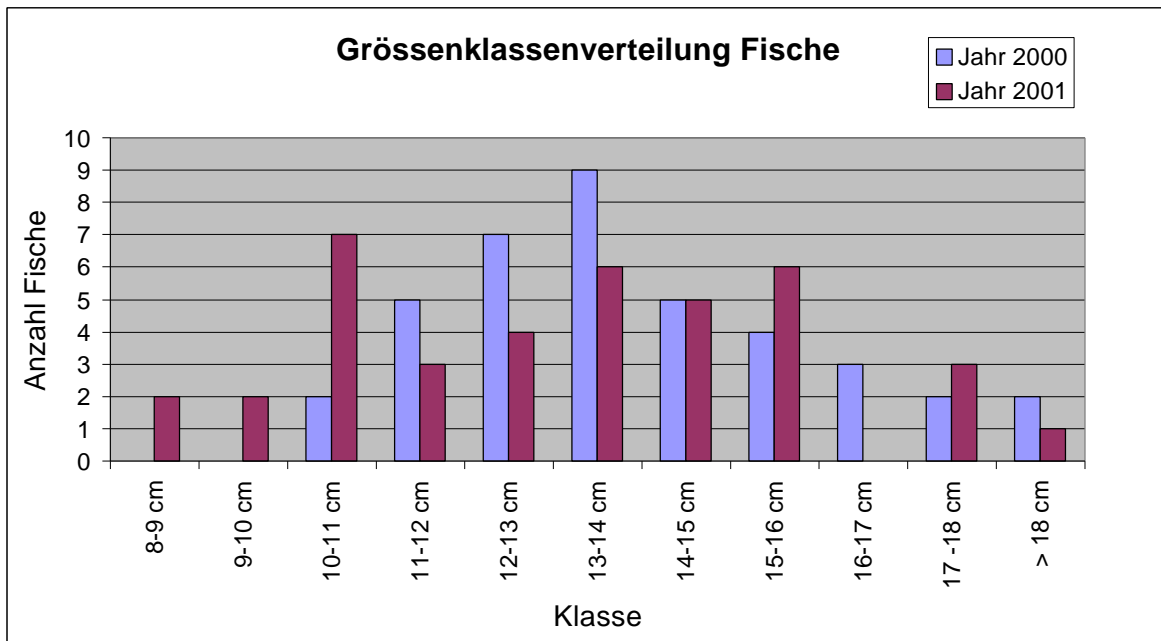


Abb 11: Verteilung der Längen in verschiedene Grössenklassen: Es sind keine wesentlichen Unterschiede der verschiedenen Jahre ersichtlich.

Wenn man zusätzlich die überdurchschnittlich grossen Tiere aus der Datenmenge ausscheidet sind die Verteilungen noch homogener (Daten nicht gezeigt).

**=> Die Untersuchung der Konditionsindizes sowie der Längen und Gewichte der Forellen deuten keine bedeutenden Unterschiede zwischen den verschiedenen Stichproben hin (die Stichproben sind vergleichbar).**



**Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse aus den verschiedenen Untersuchungen**

Allgemeine Parameter		unterhalb			Jahr 2000			oberhalb			Jahr 2001		
		Mittelwert	SD°		Mittelwert	SD°		Mittelwert	SD°		Mittelwert	SD°	
Längen	cm	13.2	2	=	14.7	3.5	=	13.7	2.9	=	12.5	2.4	
Gewicht	g	21.4	11.6	=	33.8	40.4	=	26.3	19.2	>	19	10.7	
Konditionsindex		0.85	0.12	=	0.87	0.04	=	0.88	0.04	=	0.90	0.08	
<b>1. Organe, Indizes</b>		unterhalb			Jahr 2000			oberhalb			Jahr 2001		
Leber		26		=	25		>	20		=	20		
Niere		19		=	18		>	11		=	13		
Kieme		18		=	17		>	8		=	10		
TOTALINDEX		58		>	53		>	38		<	43		
<b>2. Metallothioneine (MT)</b>		unterhalb			Jahr 2000			oberhalb			Jahr 2001		
		Median	MAD°		Median	MAD°		Median	MAD°		Median	MAD°	
2a. MT in Kieme		0.5	0.5	<	1.83	1.16	<	3	2.66	=	3.67	2.0	
2b. MT in Leber	im Jahr 2001 deutlich niedrigere Werte als im Jahr 2000 (siehe Werte und Grafik im Bericht EUREGIO)												
<b>3. Immunstatus</b>		unterhalb			Jahr 2000			oberhalb			Jahr 2001		
		Mittelwert	SD°		Mittelwert	SD°		Mittelwert	SD°		Mittelwert	SD°	
Hämatokrit	%	38	3	=	41	3	=	39	4	=	38	4	
Leukokrit	%	0.9	0.5	<	1.5	0.4	<	1.6	0.4	=	1.4	0.5	
Erythrozyten	%	94	1.2	=	94	1.2	=	95	1.8	=	94	1.7	
Granulozyten	%	0.16	0.13	<	0.31	0.21	=	0.2	0.2	=	0.2	0.2	
Lymphozyten	%	3.2	0.92	=	3.6	1.38	=	2.7	1.5	=	3.5	1.8	
Smudge Cells	%	1	0.48	<	0.7	0.31	>	0.5	0.3	=	0.5	0.3	
Thrombozyten	%	0.57	0.45	<	0.82	0.56	<	1	0.7	=	0.9	0.5	
Mitotic Cells	%			Keine						Vereinzelte			
Makrophage							keine Unterschiede						
<b>4. Early Life DRETA</b>		keine Mortalität nirgends											
Missbildung		Jahr 2000	ab Verdünnung 1:100					Jahr 2001	ab Verdünnung 1:50				
<b>5. Daphnien</b>		Jahr 2000	ab Verdünnung 1:10 Immobilisation 20-100%					Jahr 2001	ab Verdünnung 1:10 Immobilisation 100%				
<b>6. Eiexposition</b>		Stelle*	Links Mitte	Links Unten	Rechts Unten		Links Oben	Rechts Oben	Rechts Mitte	Kontrolle			
Anzahl Überlebende	%	Jahr 2001	82	45	85		83	76	75	72			

SD: Standardabweichung MAD: Mittlere absolute Abweichung (mean absolute deviation)

\*Links/Rechts bezeichnet die Uferseite; Unten/Mitte/Oben die Lage im Kanalverlauf. Die Stellen *Links Mitte*, *Links Unten* und *Rechts Unten* befinden sich im Einflussgebiet des Waschwassers

#### **4. Synthese der Teilberichte Holm / Wahli, EUREGIO und Aquatica GmbH**

Der Linthkanal ist Lebensraum (zeitweise oder ständig) für mindestens 23 Fischarten, von denen mehr als die Hälfte (gemäss Verbreitungsatlas) *stark gefährdet*, *gefährdet* oder *potentiell gefährdet* sind (Limnex 1996). Für die stark gefährdete Seeforelle des Zürichsee ist der Linthkanal das einzige Aufstiegsgewässer. Die nachgewiesenermassen benutzten Laichabschnitte wurden kartiert und liegen alle oberhalb der realisierten Einleitstelle (Limnex 1996). Laichgruben im Bereich der Einleitstelle und weiter unterhalb wurden zumindest bei einer Aufnahme 1996 nicht beobachtet .

Trotzdem ist eine Prüfung der Wirkung des Waschwassers der KVA sowohl auf die Eier wie auch auf andere Lebensstadien der Forellen ein vordringliches Anliegen. Daneben wird in den vorliegenden Studien der spezifischen Belastungen durch Schwermetalle als auch möglichen Beeinträchtigungen anderer Tiere der Biozönose, (wie den Wirbellosen) Rechnung getragen.

##### 1. Histologische Untersuchungen der Organe

Im Jahre 2000 wurden sowohl in den einzelnen Indizes der Organe Leber, Niere und Kieme wie auch entsprechend im Totalindex höhere Werte gemessen als im darauffolgenden Jahr nach Beginn der Einleitung des Filterwaschwassers. Zwischen den Probenahmestellen unter- und oberhalb der Einleitstelle sind nur geringfügige Unterschiede festzustellen. Die Werte sind vergleichbar mit denen, die an Bachforellen aus wenig belasteten Fliessgewässern erhoben wurden.

Im Vergleich der Organe untereinander sind die Veränderungen in der Leber relativ am stärksten, auch diese Werte bewegen sich im Rahmen von Werten von Bachforellen aus wenig belasteten Gebieten.

##### 2a. Metallothioneine in der Kieme

Die geringen Werte deuten auf eine niedrige Belastung der Fische mit Metallothionein-induzierenden Metallen hin.

Die Werte oberhalb der Einleitstelle sind etwas höher als die Werte unterhalb, und sind im Jahr 2001 (nach dem Beginn der Einleitung des Waschwassers) höher als im Jahr zuvor. Da die Werte jedoch durchwegs gering sind und sich im Rahmen vergleichbarer Studien an Fischen aus wenig belasteten Fliessgewässern bewegen, (resp. Laborkontrollen mit Trinkwasser) und darüberhinaus nur eine schwache Markie-

rung der Chloridzellen (bezogen auf eine vergleichbare Datenerhebung einer Studie zu Forellen aus der Langete BE) festgestellt wurde, ist die Belastung durch Metallothionein-induzierenden Substanzen in der Kieme als gering einzuschätzen.

Die Zahl der markierten Chloridzellen in den Kiemen wurde hinsichtlich einer möglichen Korrelation zu Länge oder Gewicht der Forellen ausgewertet. Die visuelle Beurteilung der Grafiken ergibt keine Korrelation (Abbildung 12 mit Beispiel des Scatterplot Länge versus Anzahl markierte Chloridzellen). Ebenfalls konnten mit transformierten Daten (nicht normalverteilte Daten) keine Korrelationen der Induktion von Metallothioninen in der Kieme und der Länge / des Gewichtes gefunden (Daten nicht gezeigt).

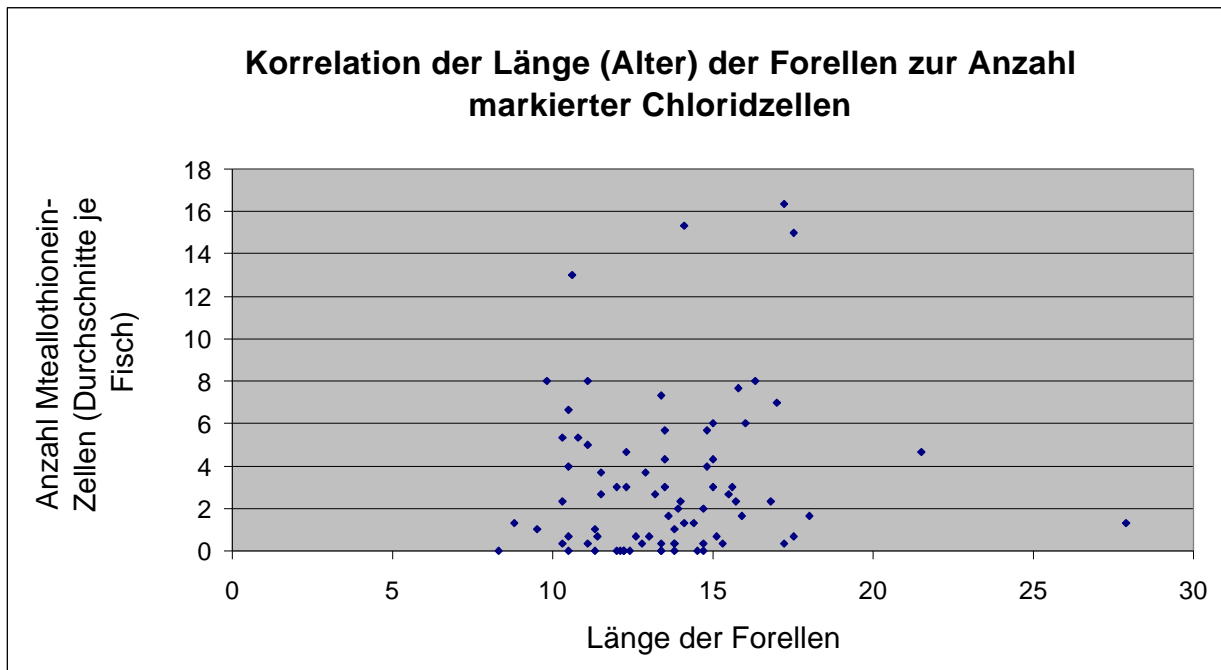


Abb. 12: Scatterplot Länge der untersuchten Forellen versus der Anzahl der markierten Chloridzellen in den Kiemen. Es ist visuell keine bedeutende Korrelation ersichtlich.

Daraus lässt sich schliessen, dass hohe Werte zwar nur bei einzelnen Individuen festgestellt wurden, diese Individuen jedoch nicht besonders gross oder besonders mager waren. Individuelle unterschiedliche Empfindlichkeiten, bevorzugte Aufenthaltsorte oder die Stellung im hierarchischen Gefüge können als Gründe nur vermutet werden.

Eine Interpretation der Werte ist ausserdem weder in Bezug auf die Beeinträchtigung der individuellen Gesundheit, noch auf die der Population möglich.

Die vorliegende kurze Zeitreihe und geringe Zahl der Probenahmen ermöglicht zwar keine umfassende und abschliessende Beurteilung, aber die Beeinträchtigung des Vorfluters mit Schwermetallen, die eine Wirkung auf die Kieme haben, ist als gering einzuschätzen.

#### 2b. Metallothioneine in der Leber

Die Werte der Metallothioneine in der Leber (Teilbericht EUREGIO) zeigen keine Unterschiede zwischen den Probenahmestellen unterhalb und oberhalb der Einleitstelle. Im Jahr 2001 wurden deutlich niedrigere Werte als im Jahr zuvor festgestellt. Für die Werte des Metallothionein in der Kieme ist diese Tendenz gerade umgekehrt (dieser Sachverhalt wird in Kapitel 5. Parameter-übergreifende Bewertung diskutiert). Aufgrund der herangezogenen Literatur und der Einschätzung der Autoren (s. Teilbericht EUREGIO) kann von keiner Beeinträchtigung der Leber durch Schwermetalle aus dem Waschwasser der KVA ausgegangen werden.

Die Ergebnisse sind nicht korreliert mit den Ergebnissen der Metallothionein-Untersuchung in der Kieme (Daten nicht gezeigt).

#### 3. Immunstatus der Forellen, 4. Beeinträchtigung von Zebrafisch-Embryonen und 5. Immobilisation von Daphnien

Die Auswertung des Blutbildes und des Immunstatus der Fische (Teilbericht EUREGIO) ergibt keine Hinweise auf eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes der Forellen zwischen Status ante und Status post.

Dies gilt weitgehend auch für den Early-Life-Stage-Test mit Zebrafischembryonen und die Untersuchungen mit Daphnien. In den Untersuchungen im 2001 (Status post) wurden in diesen Tests Veränderungen bereits bei niedrigen Verdünnungen (Missbildung beim Zebrafischtest bei 1:50 im Jahr 2001 im Vergleich von 1:100 im Jahr 2000) oder stärkere Effekte bei identischen Verdünnungen (bei den Daphnien, Verdünnung 1:10) beobachtet.

Da sich jedoch der kritische Verdünnungsbereich weit unterhalb der Bereiche befindet, der im Betrieb nach Verdünnung im Linthkanal auftritt, ist dieses Resultat nur von theoretischem Interesse. Bei 'normalen Verhältnissen', selbst bei niedrigen Abflüssen,

besteht eine Verdünnung des Abwassers von rund 1:12'000. Die Verdünnung für den Q365, den tiefsten Wasserstand des ganzen Jahres, bewegt sich bei rund 5200 (Auskunft von J. Marti, AfU Glarus). So wäre mit keiner bedeutenden Belastung zu rechnen. Grössere Tagesschwankungen der Einleitung finden nicht statt. Die Einleitung des Filterwaschwassers findet während 16 – 18 Stunden pro Tag statt in einer Menge von 7 m<sup>3</sup>/h (entspricht 0.002 m<sup>3</sup>/sec).

Zusätzliche Untersuchungen (weitere Abfischungen, die Hälterung und Exposition von Tieren vor Ort) könnten eine genauere Aussage im Hinblick auf die akuten und vor allem die chronischen Belastungen ergeben.

## 6. Eiexposition

Die Eiexposition konnte nur im Jahr 2001 durchgeführt werden (Teilbericht Aquatica GmbH). Ein Vergleich mit dem Vorjahr entfällt. Zudem haben technische Schwierigkeiten die Untersuchung beeinträchtigt (Schüttung von Sand statt Kies, Verlust von einigen Einheiten).

Die Struktur des Linthkanales ändert sich zwischen den Probenahmestellen "Oben", "Mitte" und "Unten" nicht, der Verlauf ist gradlinig und die Sohlenbeschaffenheit ist grundsätzlich gleich. Die Einleitstelle des Waschwassers befindet sich auf der Höhe der Probestelle „Mitte“, sonst erfolgen ganzen Abschnitt keine weiteren Einleitungen. Die Entwicklung der Eier und der Embryonen entsprach in fast allen Probenahmestellen der Entwicklung der Kontrolle in Labor. Einzig die Stelle 1200m unterhalb der Einleitstelle, linksseitig, zeigt eine klare Verminderung der Entwicklung der Eier und eine stark erhöhte Mortalität. Insgesamt wurden an dieser Stelle mehrere Eiboxen verschlammte und entsprechend waren ungünstige chemische Verhältnisse für die Eier vorhanden. Ein direkter Bezug zur Einleitung des Waschwassers scheint nicht wahrscheinlich. Als nachteilig erweist sich der technisch notwendig gewordene Verzicht auf eine Durchführung der Eiexposition im Jahr 2000, wie sie zunächst vorgesehen war. Wenn, wie wir vermuten, die hohen Mortalitätswerte an der Stelle links unten tatsächlich unabhängig von der KVA Einleitung ist, wären sie vermutlich auch im Jahr zuvor aufgetreten und hätten jetzt klar abgegrenzt werden können.

Der grosse Unterschied zwischen diesen Probenahmeorten könnte aufgrund einer lokalen Veränderung der Sohlestruktur (mehr Sand, ebenfalls Schüttung) bedingt sein. Bei der betroffenen Probestelle könnte die Fliessgeschwindigkeit gering sein, insbesondere wenn der Abfluss (wie in der zweiten Hälfte der Untersuchung) tief ist (es sind

leider keine Messungen von Abflussgeschwindigkeiten an den einzelnen Probenahmestellen vorhanden). Ablagerungen von Feinsedimenten wären möglich. Der im Oberlauf und an verschiedenen Probestellen geschüttete Sand (Mitte links, sowie Oben links und rechts) könnte einen erhöhten Transport und die Ablagerung von Feinsedimenten an der unteren Stelle bewirkt haben.

Allenfalls könnte die hohe Salzkonzentration in der Probenahmestelle Mitte desinfizierend wirken (und die Verpilzung der Eier vermindern)

Oder eine konzentrierte Fahne von reduzierenden, allenfalls fischtoxischen Substanzen (Ammonium etc.) könnte für die erhöhte Mortalität im unteren Bereich mitverantwortlich sein, während die Probenahmestelle "Mitte" überhaupt nicht oder nur gelegentlich durch die Salzfahne betroffen ist.

Die Überlebensraten der Fischeier sind grundsätzlich als genügend zu betrachten. Die negativen Ergebnisse links unten sind mit den bisherigen Daten schwierig interpretierbar. Die Verschlammung der Boxen hat die hohen Mortalitäten verursacht (nicht-verschlammte Eiboxen aus der Stelle unten links hatten tiefe Mortalitätsraten). Ein Zusammenhang des Waschwassers der KVA und der Verschlammung ist kaum wahrscheinlich.

Die Ursache für den Unterschied der Eimortalität, insbesondere zwischen "Mitte" und "Unten" ist mit den bisherigen Untersuchungen der Eiexposition nicht eindeutig zu erklären. Eine kontinuierliche Untersuchung der Leitfähigkeit an verschiedenen Stellen im Kanal könnte ein genaueres Bild der Vermischung und Verdünnung des Waschwassers ergeben. Die Auswertung der chemischen Analyse des Waschwassers (ist in Untersuchung) wird darüberhinaus Aufschluss über die wirkliche Belastung (im Vergleich zu den berechneten Werten) ergeben.

Bei den Verdünnungsverhältnissen, wie sie im Jahr 2001 auftraten, muss für die angenommenen Konzentrationen jedoch nicht mit kritischen Konzentrationen gerechnet werden.

## 5. Parameter-übergreifende Bewertung

In den vorliegenden Studien wurde ein breiter Ansatz gewählt, um die Auswirkungen des Filterwaschwassers der KVA auf verschiedene Organismen und Teilbereiche der Biozönose des Linthkanals zu untersuchen. Dabei wurden Parameter berücksichtigt, welche spezifische Belastungen indizieren (Metallothioneine für die Belastung durch Schwermetalle) wie auch Parameter, welche eine integrative Beurteilung der Belastung erlauben (Histologie der Organe, biometrische Daten, Immunstatus, Daphnien, Fischeier-Exposition).

Die Ergebnisse der Histologie und die Untersuchung des Immunstatus von Forellen ergaben keine bedeutende Beeinträchtigung der Gesundheit und zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Probenahmen vor und nach Beginn der Einleitung des Filterwaschwassers. Es ist deshalb (aufgrund der bisherigen Datenlage) kaum mit schwerwiegenden Gesundheitsbeeinträchtigungen der Forellen im Linthkanal zu rechnen, die durch die Einleitung des Waschwassers bedingt wären.

Die Induktion von Metallothioneinen in der Leber und in der Kieme sind Indikatoren für eine Schwermetallbelastung der Fische. Im Jahr 2001 wurde gegenüber dem Vorjahr eine erhöhte Anzahl von Metallothionein-induzierten Chloridzellen in den Kiemen gefunden, hingegen waren die Metallothionein-Konzentrationen in der Leber deutlich geringer als im Jahr zuvor, vor der Einleitung des Waschwassers. Diese unterschiedlichen Ergebnisse hängen wahrscheinlich damit zusammen, dass Leber und Kiemen unterschiedliche Indikatoren zur Belastung mit Schwermetallen sind. In der Kieme widerspiegeln sich akute Belastungen, während die Leber als Indikator für die chronische Belastung dienen kann. Darüberhinaus ist grundsätzlich eine organspezifisch unterschiedliche Aufnahme und Speicherung für die verschiedenen Metalle bekannt (Hofer 1995, Olsson 1998). Die Relevanz der Unterschiede zwischen der Induktion in der Leber und Kieme als Indikator von akuten und chronischen Belastungen durch Schwermetalle könnte mit zusätzlichen Langzeitbeobachtungen weiter eingekreist werden.

Unterhalb der Einleitstelle waren die Werte in den Kiemen im Jahr 2001 (wie auch 2000) etwas tiefer als oberhalb. Ein Klärung des Wanderverhaltens der Tiere im Linthkanal würde Aufschlüsse über die beobachteten Unterschiede zwischen den Pro-

benahmestellen bringen, ist allerdings sehr aufwendig. Man kann davon ausgehen, dass das Verhalten der Forellen generell wie auch zeitlich sehr individuell und unterschiedlich ist. Wanderungen von Forellen sind in diesem gradlinigen und monotonen Fliessgewässer und offenen System nicht unwahrscheinlich.

Es treten bei allen Parametern (zusätzlich Immunstatus von Forellen, toxische Effekte des Abwassers auf Daphnien und Zebrafischembryonen) nur geringe Unterschiede in Bezug auf den "Status ante" zum "Status post" auf. Alle Werte bewegen sich in einem Rahmen, der bei Forellen aus wenig belasteten Fliessgewässern oder bei Versuchen mit gering belastetem Wasser ermittelt wurden.

Die Exposition von Forelleneiern im Kanal im Winter 2000 / 2001 (nach Beginn der Einleitung des Waschwassers) erbrachte zumeist gute Überlebensraten der Eier, welche sich nicht von der Überlebensrate der im Trinkwasser gehälterten Eier (Kontrolle) unterschied. Einzig an einer Stelle unterhalb der Einleitung wurde eine deutlich verminderte Überlebensrate beobachtet, welche mit der Verschlammung der Eiboxen im Zusammenhang steht. Ein direkter Zusammenhang mit der Einleitung des Waschwassers ist nicht gegeben, eine abschliessende Beurteilung ist aber nicht möglich.

=> Trotz der bei allen Untersuchungen ermittelten niedrigen Werte ist auf die Erhöhung der Zahl von Metallothionein-positiven Chloridzellen und die erhöhte Mortalität der ausgesetzten Forelleneier unterhalb der Einleitstelle hinzuweisen.

Dementsprechend kann eine spezifische Beeinträchtigung der Fische nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die stossweise Belastung des Kanals durch Abwasser der KVA (Tag-Nacht-Schwankungen) könnte eine Erklärung für den Nachweis von markierten Chloridzellen in der Kieme (und die geringen Werte in der Leber), sowie gegebenenfalls für die Mortalität der Eier sein.

## 6. Ausblick und Empfehlungen

Eine Interpretation zur chronischen Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes der Fische und Wirbellosen ist aufgrund der Datenlage nur bedingt möglich. Dazu fallen unter anderem die zum Zeitpunkt des Versuchsdesigns wenig beachteten Tag-Nacht-Schwankungen ins Gewicht.

Diesem Phänomen von Beeinträchtigungen durch Belastungsschwankungen (sog. "Intermitted exposure") wird in neuerer Zeit in der ökotoxikologischen Forschung vermehrt Beachtung geschenkt. Breit abgestütztes Grundlagenwissen fehlt indes noch. Eine zeitweise starke Belastung der Fliessgewässer kann zur gesundheitlichen Beeinträchtigung der Tiere führen, da dann die bereits erreichte Adaptation an den chronischen Zustand nicht mehr ausreicht, wenn die Tiere erneut und schnell auf kurzfristige, hohe Belastungsschüsse reagieren müssen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wären Daten zu den Korrelationen von Tag- und Nachtschwankungen (chemische Analysen) mit der Beeinträchtigung bei den Fischen (v.a. Parameter, die akute Belastungen indizieren) sinnvoll.

Aus den gegenläufigen Indikationen in der Leber und den Kiemen ergibt sich eine unterschiedliche Reaktion auf die Belastung durch Schwermetalle hinsichtlich des zeitlichen Musters. Die Reaktionen könnten akut in der Kieme und chronisch in der Leber auftreten.

Um die gezogenen Schlüsse zu überprüfen, müssten bei weiteren, längerfristigen Untersuchungen (Follow up) identische Methoden für die Bestimmung der Induktion von Metallothioneinen in der Leber und der Kieme angewandt werden, um einen sauberen Vergleich zu ermöglichen.

Die Weiterführung der Untersuchungen in den nächsten Jahren ist zu empfehlen, um die vorläufigen Resultate abzusichern und chronische Belastungen erkennen zu können (Stichproben über einen längeren Zeitraum mit parallel dazu geführten chemischen Analysen).

Im offenen System des Linthkanals muss mit Wanderungen der Fische gerechnet werden. Das Wanderverhalten ist jedoch sehr individuell und variabel. Deshalb wären vor allem Untersuchungen im Sinne eines aktiven Monitorings (Hälterung von Tieren im Fluss- und Abwasser, Eiexposition) geeignet, um die hohe Variabilität der Resultate zu verringern.

Darüberhinaus wäre es sinnvoll, das Verhalten der Seeforellen (sowie der Aeschen) in der Laichzeit zu beobachten (allenfalls Meidereaktion der Forellen durch die Salzfahne und entsprechender Abbruch des Aufstieges zu den Laichplätzen).

### **Projektorganisation**

PD Dr. Patricia Holm

EAWAG

Postfach 611

Tel. 01-823 55 64

Fax 01- 823 53 75

Email: [patricia.holm@eawag.ch](mailto:patricia.holm@eawag.ch)

## Literatur

**Adams** (1990): Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. Bethesda, Maryland, Biological Indicators of Stress in Fish. American Fisheries Symposium 8 1-8.

**Anderson** (1995): Immunotoxicology in Fish. Washington, Fundamentals of Aquatic Toxicology

**Bernet** (1998): Histopathology in fish: proposal for a method to assess aquatic pollution. J. Fish Dis. 22: 25-34.

**Bernet** (2000): 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 8: 143-151.

**Burkhardt-Holm** (1999): 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: 339-346.

**Burkhardt-Holm** (2001): Estrogenic contamination and liver condition of brown trout: a first survey in Swiss rivers. Journal of Fish Biology submitted.

**Dietrich** (1998): Zebrafish (*Danio rerio*) embryo toxicity and teratogenicity assay. Toxicological Sciences 42: 1279.

**Dietrich** (2001): Untersuchungen der Biozönose im Linthkanal im Bereich der Salzwassereinleitung der KVA Niederurnen. Konstanz, pp. 1-13.

**Escher** (1999): Einfluss von Abwassereinleitungen von Kläranlagen auf Fischbestände und Bachforelleneier. Bern, Mitteilungen zur Fischerei 61: pp. 1-201.

**Escher** (1999): The effect of sewage plant effluent on brown trout (*Salmo trutta fario*). Aquatic Sciences 61: 93-110.

**Eugster** (2001): Gesundheitszustand der Fische im Rheintal - Untersuchungen 1997 bis 2000: Synthesebericht. St. Gallen, pp. 1-131.

**Guthruf** (2001): Untersuchung der Biozönose im Linthkanal im Bereich der Salzwassereinleitung der KVA Niederurnen, Exposition von Forelleneiern - ENTWURF 20.7.01. Oberwichtertracht, pp. 1-20.

**Hinton** (1990): Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. Bethesda USA, Biological Indicators of Stress in Fish 8.

**Hofer** (1995): Fischtoxikologie - Theorie und Praxis. Jena, Stuttgart, 164.

**Limnex** (1996): Einleitung von Waschwasser aus der Rauchgasreinigung der KVA Niederurnen in den Linthkanal. Zürich, pp. 1-18.

**McDonald** (1993): Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. London, Fish Ecophysiology 9: 297 - 315.

**Olsson** (1998): Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. London, Metal Metabolism in Aquatic Environments 321-350.

**Olsvik** (2000): Metal accumulation and methallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during run-off episode. Aquatic Toxicology 50: 301-316.

**Schmidt** (1999): Active biomonitoring with brown trout and rainbow trout in diluted sewage plant effluents. Journal of Fish Biology 54: 585-596.

**Schmidt-Posthaus** (2000): Biomonitoring in Fließgewässern des Kantons Bern; Teilprojekt Passives Monitoring an Bachforellen. Bern, pp. 1-53.

**Steffens** (1985): Grundlagen der Fischernährung. Jena, pp. 1-226.

**Wendelaar Bonga** (1997): The stress response in fish. Physiological reviews 77: 591-625.