

Wirkungsorientierte Gewässerüberwachung: Biomonitoring mit Forellen

Studie im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU)

Abschlussbericht 2017







Impressum

Herausgeber

Oekotoxzentrum, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL,
8600 Dübendorf

Im Auftrag von

Bundesamt für Umwelt (BAFU), Abteilung Wasser, CH-3003 Bern

Das BAFU ist ein Amt des Eidgenössischen Departements für Umwelt, Verkehr, Energie und Kommunikation (UVEK).

Autoren

Stephan Fischer, Melanie Fischer, Kristin Schirmer, Inge Werner
Oekotoxzentrum, Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL
Eawag, Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology

Danksagung

Die Autoren möchten folgenden Personen für Ihre Unterstützung und Ihre wertvollen Beiträge danken:

Nicole Munz, Jennifer Scholle Juliane Hollender	Eawag, Abteilung Umweltchemie, Messung von Mikroverunreinigungen in Wasserproben
Cornelia Kienle, Miriam Langer, Barbara Ganser und Sereina Gut	Oekotoxzentrum Betreuung des FELST mit Regenbogenforellen
Cornelia Kienle, Andrea Schifferli und Thomas Bucher	Oekotoxzentrum Durchführung des ER-CALUX-Test
Pascal Reichlin und Nils Schölzel	Oekotoxzentrum und Eawag, Abteilung Umwelttoxikologie Durchführung des Elektrofischen
Thomas Bucher	Oekotoxzentrum Unterstützung qPCR-Analyse Ellikon & Elgg
AuA-Lab Team	Eawag Durchführung der Wasserprobenanalyse
Beat von Siebental und Helmut Segner	Universität Bern Durchführung der Analyse zur Fischgesundheit
David Kistler	Eawag, Abteilung Umwelttoxikologie Durchführung der Metallanalyse

Hinweis

Diese Studie wurde im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt durchgeführt und durch das Schweizerische Zentrum für angewandte Ökotoxikologie kofinanziert. Der Herausgeber/Auftragnehmer ist allein für den Inhalt verantwortlich.

Kontakt

Stephan Fischer: stephan.fischer@eawag.ch / stephan.fischer@aquatox-solutions.ch

Inge Werner: inge.werner@oekotoxzentrum.ch

Kristin Schirmer: kristin.schirmer@eawag.ch



Abstract

Die Identifizierung und Überwachung von Chemikalieneffekten auf Organismen in der Umwelt beruht auf einem breiten Spektrum von Herangehensweisen und Messpunkten. Allerdings wurden bisher viele der existierenden Untersuchungsmethoden lediglich für wenige Modellorganismen entwickelt. Die Berücksichtigung der Artenvielfalt und der Vielfalt an Reaktionen auf Umweltstressoren ist daher nach wie vor eine grosse Herausforderung. Die Analyse von messengerRNA (mRNA), welche für ausgewählte Biomarkermoleküle kodieren, ist dagegen ein vielversprechender Ansatz, da er auf ein weites Spektrum an Organismen und biologische Antworten übertragbar ist.

In diesem Projekt sollten die Einflüsse von Mikroschadstoffeintrag von Abwässern auf Flussökosysteme untersucht werden. Es wurde ein Biomarker-Genset für die Bachforelle (*Salmo trutta*) und die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) etabliert, um die Wirkung von Mikroschadstoffen, wie Pharmaka und Pestizide, im Fisch nachweisen zu können. Ein typisches Biomarker-Set besteht aus 20-25 spezifischen Genen, welche verschiedene zelluläre Stressantworten, wie allgemeinen Stress, Metall- und oxidativen Stress, Biotransformation, Immunregulation usw. reflektieren. Die Regulation dieser Gene wurde in Leber und Nierengewebe in Bachforellen analysiert, welche ober- und unterströmig von vier verschiedenen Abwasserreinigungsanlagen (ARA) gefangen wurden. Zwei Standorte wurden doppelt untersucht: Herisau (Appenzell) vor und nach der Aufschaltung der Pulveraktivkohle (PAK)- Abwasserreinigungseinheit und Steinach (St. Gallen) vor und nach dem Stopp der Abwassereinleitung. An diesen Standorten sollte überprüft werden ob mit dieser Methode Veränderungen der Wasserqualität und der Effekte auf die Fische erfasst werden können. Die Daten zeigen, dass die mRNA Regulation standortspezifisch ist. Fische, welche Unterhalb der Kläranlagen gefangen wurden, zeigen eine erhöhte Stressantwort an. Zudem konnten wir aufgrund der Genexpression das Einwirken von spezifischen Gruppen von Chemikalien identifizieren, wie Schwermetalle, endokrine Disruptoren, Pharmaka oder Pestizide. Tatsächlich bestätigte die chemische Analytik das Vorhandensein solcher Chemikalien im Wasser an den Probenahmestandorten. Ebenfalls konnten positive Effekte auf die Wasserqualität durch die Umbauten der ARAs in Herisau und Steinach mittels Genexpressionsanalyse in den untersuchten Fischen bestätigt werden.

Im Projekt ReTREAT auf der ARA Neugut wurden verschiedene Nachbehandlungen, im Anschluss an die Ozonung von Abwasser, auf deren Leistungsfähigkeit untersucht, toxische Transformations- oder Oxidationsnebenprodukte zu reduzieren. Zur Erfassung der ökotoxikologischen Wirkung wurden zahlreiche Biotests durchgeführt, darunter auch ein *Fish Early Life Stage-Test* (FELST) mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Als Ergänzung zu den Standardendpunkten dieses Tests wurden normalerweise nicht erfassbare subletale Effekte mittels einem spezifischen Biomarker-Genset untersucht. Die Ergebnisse bestätigen die Effizienz der Ozonung, organische Mikroverunreinigungen aus dem Abwasser zu eliminieren und hervorgerufene subletale Effekte auf die Fische zu verringern. In Übereinstimmung mit den meisten anderen Tests konnte die gute Eignung der Nachbehandlung des ozonierten Abwassers durch den frischen Aktivkohlefilter (GAK2) bestätigt werden.

Damit ist dies eine vielversprechende Methode für die Überwachung der Wasserqualität und der Fischgesundheit. Die Biomarker-Gensets sind sehr flexibel; weitere Anpassung für spezifische Effektmessungen, Übertragung auf andere Fischarten sowie weitere Anwendungen sind möglich.

Zudem wird versucht das Umweltmonitoring auf etablierte Zelllinien vom Fisch zu erweitern, welche eine tierfreie Alternative für die Umweltüberwachung darstellen könnten. Dabei werden permanente Zelllinien der Regenbogenforelle eingesetzt. Diese werden direkt im Labor mit Wasserproben, die an den Feldstandorten gewonnen wurden, exponiert. Die danach in diesen Zellen gemessene Expression wurde mit der Genexpression von im Fluss gefangenen Fischen und der chemischen Analytik verglichen. Stimmen die biologischen Antworten überein, könnten die Fischzellen zukünftig die Umweltüberwachung „übernehmen“. Bisher konnte eine gute Übereinstimmung mit einigen Markergenen gefunden werden.



INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SELEKTION DER BIOMARKER-GENE	3
3	ARBEITSPAKET 1:	5
3.1	Hintergrund	5
3.2	Ausgangslage	5
3.3	Zielsetzung	6
3.4	Material und Methoden	6
3.4.1	Fish early life stage toxicity-Test mit Regenbogenforellen	6
3.4.2	Auswahl der Biomarker-Gensets für das ARA-Neugut Projekt	7
3.4.3	Primer-Design und Testung	8
3.4.4	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	8
3.4.5	Genexpressionsanalyse	9
3.4.6	Statistik	9
3.5	Ergebnisse und Interpretation	10
3.5.1	Beeinflussung der Genexpression durch niedrigeren Sauerstoffgehalt	10
3.5.2	Biomarker für oxidativen Stress	11
3.5.3	Biomarker für Metallbelastung	14
3.5.4	Biomarker für Biotransformation	15
3.5.5	Allgemeine Stressantwort	18
3.5.6	Endokrine Effekte	19
3.5.7	Immunregulation und pathogene Abwehr	20
3.5.8	Zellzyklus / Apoptose	21
3.5.9	Metabolismus	22
3.5.10	Wachstum	23
3.6	Principal Component Analyse (PCA)	24
3.7	Schlussfolgerung	25
4	ARBEITSPAKET 2:	26



4.1	Hintergrund:	26
4.2	Zielsetzung:	27
4.3	Änderungen zum Antrag:	27
4.4	Material und Methoden	27
4.4.1	Auswahl der Biomarker-Gensets für die Feldbeprobungen	27
4.4.2	Identifizierung der genetischen Sequenzen für die Bachforelle	28
4.4.3	Fischbeprobung	29
4.4.4	Fischgesundheitsparameter	29
4.4.5	Chemisch-analytische Bestimmung der Wasserqualität	30
4.4.6	ER-CALUX	30
4.4.7	Primer-Design und Testung	30
4.4.8	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	30
4.4.9	Genexpressionsanalyse	30
4.4.10	Bestimmung des Vitellogenin-Protein-Gehalts im Lebergewebe	30
4.4.11	Statistik	31
4.5	Standortauswahl	31
4.6	Ergebnisse Steinach (St. Gallen)	33
4.6.1	Feldparameter:	33
4.6.2	Wasserparameter im Labor gemessen	34
4.6.3	Schwermetallanalyse	35
4.6.4	Analyse von organischen Mikroverunreinigungen	35
4.6.5	Untersuchung des Östrogenen Potentials in den Wasserproben	37
4.6.6	Fischbeprobung	37
4.6.7	Vitellogenin (VTG)-Proteingehalt im Lebergewebe	40
4.6.8	Fischgesundheit	40
4.6.9	Biomarker-Genexpression	42
4.6.10	Principal Component Analysis (PCA) Steinach	52
4.6.11	Schlussfolgerung Steinach	55
4.7	Ergebnisse Herisau	56
4.7.1	Feldparameter:	56



4.7.2	Wasserparameter im Labor gemessen	57
4.7.3	Schwermetallanalyse	58
4.7.4	Analyse von organischen Mikroverunreinigungen	58
4.7.5	Untersuchung des Östrogenen Potentials in den Wasserproben	60
4.7.6	Fischbeprobung	61
4.7.7	Vitellogenin (VTG)-Proteingehalt im Lebergewebe	63
4.7.8	Fischgesundheit	63
4.7.9	Biomarker-Genexpression	66
4.7.10	Principal Component Analysis (PCA) Herisau	74
4.7.11	Schlussfolgerung Herisau	77
4.8	Ergebnisse Ellikon	77
4.8.1	Feldparameter:	77
4.8.2	Wasserparameter im Labor gemessen	78
4.8.3	Schwermetallanalyse	79
4.8.4	Analyse von organischen Mikroverunreinigungen	79
4.8.5	Untersuchung des Östrogenen Potentials in den Wasserproben	81
4.8.6	Fischbeprobung	82
4.8.7	Vitellogenin (VTG)-Proteingehalt im Mucus	83
4.8.8	Fischgesundheit	83
4.8.9	Reduzierte Analyse durch Verlust der Gewebeproben von Ellikon und Elgg	84
4.8.10	Biomarker-Genexpression	84
4.8.11	Allgemeiner Stress	85
4.8.12	Zellzyklus /Apoptose/ Karzinogenese	86
4.8.13	Biotransformation	87
4.8.14	Immunregulation / Pathogenabwehr	88
4.8.15	Metall und Oxidativer Stress	89
4.8.16	Endokrine Effekte	91
4.8.17	Metabolismus	92
4.8.18	Principal Component Analysis (PCA) Ellikon	92
4.8.19	Schlussfolgerung Ellikon	93



4.9	Ergebnisse Elgg	94
4.9.1	Feldparameter:	94
4.9.2	Wasserparameter im Labor gemessen	94
4.9.3	Schwermetallanalyse	95
4.9.4	Analyse von organische Mikroverunreinigungen	95
4.9.5	Untersuchung des Östrogenen Potentials in den Wasserproben	97
4.9.6	Fischbeprobung	98
4.9.7	Vitellogenin (VTG)-Proteingehalt im Lebergewebe	99
4.9.8	Fischgesundheit	99
4.9.9	Biomarker-Genexpression	100
4.9.10	Allgemeiner Stress	100
4.9.11	Zellzyklus /Apoptose/ Karzinogenese	101
4.9.12	Biotransformation	102
4.9.13	Immunregulation / Pathogenabwehr	103
4.9.14	Metall und Oxidativer Stress	104
4.9.15	Endokrine Effekte	105
4.9.16	Metabolismus	106
4.9.17	Principal Component Analysis (PCA) Elgg	106
4.9.18	Schlussfolgerung Elgg	107
4.10	Zelllinienversuche	108
4.10.1	Material und Methoden	108
4.10.2	Ergebnisse und Interpretation	108
4.10.3	Schlussfolgerungen und Ausblick Zelllinienversuche	112
5	ALLGEMEINE SCHLUSSFOLGERUNG	113
6	AUSBLICK	114
7	ANHANG	114
8	REFERENZEN	115



1 EINLEITUNG

Die Erfassung und das Monitoring unerwünschter biologischer Effekte von Mikroverunreinigungen aus ARA-Abläufen erfolgt derzeit vorwiegend über die chemische Analyse von Umweltproben oder mit Hilfe von standardisierten Biotests im Labor (*in vitro* oder *in vivo*). Auch mit *in situ*-Versuchen mit aquatischen Organismen oder durch die Analyse von Artengemeinschaften (Makroinvertebraten, Diatomeen) im Gewässer können solche Effekte erkannt werden. Die Ergebnisse dieser Methoden sind stark abhängig von der Art der Beprobung (Zeitpunkt, Stich- oder Sammelprobe, Passive Sammler) und der Auswahl der Testorganismen und Effektparameter. Es gibt jedoch für viele Wirkmechanismen noch keine geeigneten Biotestsysteme und die vorhandenen Tests sind in der Regel nur für wenige Modellorganismen oder Zelllinien etabliert. Die Vielzahl der Arten und ihre unterschiedliche Reaktion auf Umweltschadstoffe stellt demnach für die ökotoxikologische Effektmessung nach wie vor eine grosse Herausforderung dar. Insbesondere für die Effektmessung in Fischen stehen nur relativ wenige Methoden zur Verfügung. Hinzu kommt, dass man aus Kosten- und Zeitgründen meist nur eine begrenzte Anzahl an Parametern messen kann, wodurch das Risiko besteht, relevante toxische Wirkungspotenziale zu übersehen. Feldmethoden sind insgesamt aussagekräftiger, jedoch lässt die Analyse von Artengemeinschaften meist keine eindeutigen Schlüsse auf den Einfluss von Mikroverunreinigungen zu, da meist mehrere Stressoren (z. B. Temperatur, verändertes Habitat) auf die Gewässerorganismen einwirken.

Um zu einer qualitativ besseren Erfassung von nachteiligen Effekten von Umweltchemikalien auf die Fitness und den Gesundheitszustand von Fischpopulationen zu gelangen, braucht es „offene“ Ansätze, die ein breites Effekt-Screening in freilebenden Fischen ermöglichen, die Chance bieten unerwartete Wirkungen zu entdecken und zudem auf unterschiedliche Arten übertragbar sind. Die in den letzten Jahren etablierten Omics-Technologien, darunter insbesondere Genexpressionsanalysen (Transcriptomics), ermöglichen einen solchen „offenen“ Screening-Ansatz. Diese Methoden fanden in den letzten Jahren zunehmend Eingang in die Ökotoxikologie (Schirmer et al., 2010) und haben den grossen Vorteil, dass sie relativ einfach auf Nicht-Modellorganismen übertragbar sind. Dabei wurden sie bisher überwiegend in Laborversuchen eingesetzt. Neuere Studien haben jedoch das Potenzial dieser Techniken für das Freiland-Monitoring aufgezeigt (Connon et al., 2012, Hasenbein et al., 2014, Miller et al., 2011).

Der Einsatz von Transkriptomics im Freilandmonitoring ist besonders dort sinnvoll, wo akute Toxizität nicht zu erwarten ist. Häufig sind es subletale Effekte von Umweltschadstoffen, die die ökologische Fitness einzelner Populationen und Artengemeinschaften gefährden. Diese reichen von Veränderungen im Hormonhaushalt bis zur Beeinträchtigung des Immunsystems und zu Verhaltensänderungen (Clifford et al., 2005, Floyd et al., 2008, Sandahl et al., 2005, Scholz et al., 2000). Im Feld sind solche physiologischen Veränderungen mit den gängigen Methoden kaum zu erfassen. Auch Standard-Biotests mit Modellorganismen können die Wirkung von Schadstoffen in der Umwelt nur bedingt erfassen, insbesondere dann, wenn die relevanten Arten nicht nahe mit den Testorganismen verwandt sind (Denslow et al., 2006, EPA, 2002, Little & Calfee, 2008a, Little & Calfee, 2008b, Rand, 1995).

Die Expressionsanalyse eines Sets sorgfältig ausgewählter Biomarkergene, welche verschiedene zelluläre Funktionen gegenüber Umweltstress widerspiegeln, ist ein sehr vielversprechender Ansatz, insbesondere für das Monitoring von subletalen Effekten. Solch ein Ansatz ist für das Freilandmonitoring in Nichtmodellorganismen geeignet (Ankley et al., 2008, Connon et al., 2009) und kann artenübergreifend interpretiert werden.

In der Humanmedizin werden Genexpressionsprofile schon als Indikatoren für bestimmte Krankheiten verwendet (Auman & McLeod, 2008, Cosler & Lyman, 2009, Holmes et al., 2006, Yeoh et al., 2002). In ökotoxikologischen Laboruntersuchungen konnten solche Profile mit Effekten auf Individuen- und Populationsebene verknüpft werden (Connon et al., 2008, Connon et



al., 2009, Fedorenkova et al., 2010, Heckmann et al., 2008). Bisher gibt es allerdings wenige Freilanduntersuchungen, obwohl dieser Ansatz dort besonders sinnvoll zum Einsatz gebracht werden kann. Vor kurzem konnten Miller *et al.* (2011) aufgrund von Expressionsprofilen in Wildlachsen mit grosser Wahrscheinlichkeit voraussagen, welcher Prozentsatz der Fische die Laichwanderung im Frazier River erfolgreich abschliessen konnte. Connon *et al.* (2012) zeigten signifikante Unterschiede im Expressionsmuster ausgewählter Gen-Sets in Salmoniden aus dem Columbia River, die mit dem Gesundheitsstatus der Fische übereinstimmten. Solche Untersuchungen können auch dazu verwendet werden, mögliche Schadstoffe zu identifizieren (Beggel et al., 2011, Poynton et al., 2008), allerdings bedarf es dazu noch einer besseren Datenlage.

Daher war das Ziel dieses Projektes mittels Genexpressionsanalyse komplexe Wirkungen von Mikroverunreinigungen in Forellen zu erfassen, welche in direktem Umfeld von Abwasserreinigungsanlagen beprobt wurden. Das Projekt war in folgende Arbeitspakete unterteilt.

Arbeitspaket 1:

Effektmonitoring erweiterter Abwasserreinigungsverfahren mittels standardisierter Toxizitätspunkte (OECD, 1992) und molekularer Biomarker in exponierten Regenbogenforellen

Arbeitspaket 2:

Effektmonitoring in Oberflächengewässern vor und nach ARA-Abwassereintrag in freilebenden Bachforellen und *in-vitro* Fischzellen

Arbeitspaket 3:

Pilotversuche zum Effektmonitoring mit Fischen von Mikroverunreinigungen aus gereinigten ARA-Abwässern in experimentellen Versuchsrinnen (EcolImpact, Mainandros)

Anmerkungen zum Arbeitspaket 3:

Dieser Teil des Projekts konnte nicht wie geplant durchgeführt werden. Gründe dafür waren vor allem die geringe Eignung des Standortes. Die Maiandros-Versuchsanlagen waren an der ARA Fällanden aufgebaut. Es zeigte sich dass der Fluss Glatt bereits oberhalb der ARA höhere Konzentrationen von Mikroverunreinigungen aufwies, wodurch keine Kontrollsituation für die Messung der Genexpression vorhanden war. Ein Umzug der Versuchsanlagen an einen besser geeigneten Standort (Dürnten oder Herisau) konnte im Zeitrahmen dieses Projektes nicht realisiert werden. Dies wurde dem BAFU bereits am 19.01.2016 mitgeteilt (siehe Meeting-Protokoll 19.01.2016).

In Abstimmung mit dem BAFU wurde dafür kostendeckend das Arbeitspaket 2 erweitert. Alternativ wurden zwei zusätzliche Feldbeprobungen durchgeführt. An der ARA Herisau wurde ein Jahr nach der Aufschaltung der Aktivkohle-Filtereinheit eine Beprobung als biologische Effektkontrolle des Upgrades durchgeführt. Des Weiteren wurde die zweite Beprobung der Steinach (St. Gallen) ein Jahr nach dem Einleitungsstopp des gereinigten Abwassers durchgeführt.

Dadurch ergab sich die einzigartige Chance, die Sensitivität der Methode vor und nach dem Upgrade einer ARA bzw. nach einer vollständigen Schliessung eines Abwassereinlasses zu Testen. Dies stellt einen erheblichen Mehrwert bzw. Kenntniserwerb für diese Studie dar.

Im Nachstehenden wird jedes Arbeitspaket einzeln betrachtet mit Material und Methoden, Ergebnissen und Schlussfolgerungen. Allen Arbeitspaketen voransteht die Selektion der Biomarkergene.



2 SELEKTION DER BIOMARKER-GENE

Zu Beginn des Projektes wurde eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt, um relevante Biomarker-Gene für die geplanten Genexpressionsanalysen zu identifizieren. Diese Gene mussten verschiedene zelluläre Funktionen gegenüber Umweltstress im Fisch reflektieren, weshalb nur nach Studien mit Fischen gesucht wurde. Ausserdem konnte zum Teil auf Vorerfahrungen aus der Pilotstudie des Oekotoxenzentrums an der Steinach (Fischer et al., 2014) und aus dem Projekt „Rain-Men Multiplex“ (Schirmer & Fischer, unveröffentlicht) zurückgegriffen werden. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht von relevanten Biomarker-Genen aus dieser Recherche, welche für die einzelnen Arbeitspakete individuell zu einem Set von ca. 20 Genen zusammengestellt wurden. Die vorausgewählten Markergene sind nach ihrer zellulären Funktion gruppiert.



Tabelle 1: Vorauswahl von relevanten Biomarker-Genen

Zelluläre Funktionen	Markergen	Spezifische Funktion
Allgemeine Stressantwort	HSP70 (Hitzeschockprotein 70)	Bewahrung der Proteinintegrität , Hitzestress
	HSP30 (Hitzeschockprotein 70)	Bewahrung der Proteinintegrität , Hitzestress
	ABCB1 (ABC-Transporter B1, P-glycoprotein, MDR1,)	Transport von nicht metabolisierten Xenobiotika
	PXR (Pregnan-X-Rezeptor)	Kernrezeptor, Aktivierung von Entgiftungsenzymen
Zellzyklus / Karzinogenese	p53 (Tumorsuppressor p53)	Apoptose-Regulierung, DNA-Reparatur, Zellzyklusregulierung
	C-myc (Protoonkogen)	Krebsmarker, Apoptose-Marker
	C-fos (Protoonkogen)	Krebsmarker, Apoptose-Marker
	pdr1 (DNA damage-regulated protein 1)	Krebsmarker, sensitiv gegenüber UV-Strahlung
Biotransformation	CYP1A (Cytochrom P450 1A)	Schadstoffmetabolismus Phase1; Monooxygenase: vorrangige Metabolisierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen
	CYP3A (Cytochrom P450 3A)	Schadstoffmetabolismus Phase1; Monooxygenase: Metabolisierung von Xenobiotika und Arzneimitteln
	GST (Glutathion-S-Transferase)	Schadstoffmetabolismus Phase2; Bindung von Glutathion an Xenobiotika
	UGT (UDP-glucuronosyl transferases)	Schadstoffmetabolismus Phase2; Bindung von Glucuronsäure an Xenobiotika
	SULT (Sulfotransferase)	Schadstoffmetabolismus Phase2; Bindung von Sulfogruppen an Xenobiotika
	Abcc1-3 (Multidrug resistance-associated protein)	Zellulärer Transport von metabolisierten Xenobiotika
Immunregulation/ Pathogenabwehr	TNF α (Tumornekrosefaktor-alpha)	Regulierung von Immunzellen (Zytokin), Apoptose, Zellproliferation
	Socs3 (<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>)	Zytokin-Rezeptor: induziert verschiedene Zytokinen
	IL-1beta (Interleukin-1beta) IL-8 IL- 10	Zytokine: Entzündungsmediatoren
	FKBP5	Entzündungsmediator
	Nfkb2	Entzündungsmediator
Endokrine Wirkung	VTG (Vitellogenin)	<i>Eidotter- Vorläuferprotein</i> : Östrogen bzw. Xenoöstrogen reguliert
	ER α (Estrogenrezeptoren alpha)	Steroidrezeptor: durch Östrogen bzw. Xenoöstrogen aktiviert
	Choriogenin	Östrogen bzw. Xenoöstrogen sensitiv reguliertes Gen
Metall und oxidativer Stress	MTa (Metallothionein A)	Schwermetall reguliert: Bindung von Schwermetallen, sensitiv gegenüber Glucocorticoid-Hormon Exposition durch <i>Glucocorticoide Responsive-Element (GRE)</i> im Promotor
	MTb (Metallothionein B)	Schwermetall reguliert: Bindung von Schwermetallen
	Hmox (Hämoxxygenase)	sensitive gegenüber oxidativen Stress, Hypoxie und Schwermetalle
	Abcc2 (ABC-Transporter C2, MRP2)	Transport von Metall-Glutathion (GSH)-Komplexen
	NrF2 (<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>)	Transkriptionsfaktor: Regulation von antioxidativen Signalwegen
	GPx (glutathione peroxidase)	Glutathion-abhängige Reduktion von organischen Peroxiden und Wasserstoffperoxid.
	GR (glutathione reductase)	Katalysiert die Reaktion von Glutathiondisulfid zu Glutathion (GSH)



Zelluläre Funktionen	Markergen	Spezifische Funktion
	Hmox (<i>Heme oxygenase</i>)	Sensitive Regulation durch oxidativen Stress, Hypoxie oder Schwermetalle
	PGC-1alpha (Peroxisome proliferator-activated receptor)	Sensitive Regulierung durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS),
	CAT (catalase)	Katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) zu Sauerstoff (O ₂) und Wasser (H ₂ O)
	SOD (superoxide dismutase)	Wandelt Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid um
Metabolismus	PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase)	Wichtigste Enzym der Gluconeogenese, sensitive gegenüber Glucocorticoid-Hormone-Exposition
	G6PD (glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase)	Wichtiges Enzym des Pentosephosphatwegs: katalysiert die Reaktion von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphogluconolacton
Wachstum	IGF (Insulin-Like Growth Factor)	Sensitiv reguliert durch Wachstumshormone
	FGF2 (Fibroblast growth factor 2)	Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung von Zellen
Fett-Metabolismus	FAS (Fatty acid synthase)	Regulation der Synthese von Fettsäuren,
	FAT (Fatty acid translocase)	Transport von Fettsäuren
Housekeeping-Gen, Referenzgen	18s EF1alpha	Nicht-regulierte und konstitutiv exprimierte Gene

3 ARBEITSPAKET 1:

Effektmonitoring erweiterter Abwasserreinigungsverfahren mittels standardisierter Toxizitätspunkte (OECD, 1992) und molekularer Biomarker in exponierten Regenbogenforellen

Dieses Arbeitspaket ist ein Teilprojekt der BAFU Studie „*Biologische Nachbehandlung von kommunalem Abwasser nach Ozonung – ReTREAT: Teilprojekt Biotests*“ (Kienle et al., 2017) welches vom Oekotoxzentrum durchgeführt wurde. Auszüge dieser Teilstudie sind bereits in dem 2016 eingereichten Abschlussbericht enthalten.

3.1 Hintergrund

Mikroverunreinigungen im Abwasser können durch zusätzliche Behandlungsschritte, Ozonung oder Pulveraktivkohle reduziert werden, wodurch der Eintrag dieser Substanzen in Gewässerökosysteme verringert und Trinkwasserressourcen geschützt werden. Da vor allem bei der Ozonbehandlung reaktive oder toxische Umwandlungsprodukte entstehen können, ist eine geeignete Nachbehandlung wie z.B. die Sandfiltration notwendig um diese zu entfernen.

3.2 Ausgangslage

Die ARA Neugut in Dübendorf hat als erste grosstechnische Anlage der Schweiz eine Ozonung als erweiterte Abwasserbehandlungsmethode im Frühjahr 2014 in Betrieb genommen. Bei der Durchführung des Projekt ReTREAT auf der ARA Neugut, wurden verschiedene Nachbehandlungen im Anschluss an die Ozonung auf deren Leistungsfähigkeit untersucht, um eine Empfehlung für zukünftige Nachbehandlungen zu geben. Für die Erfassung und Bewertung von möglichen Effekten, hervorgerufen durch Transformations- oder Oxidationsnebenprodukte in der



Ozonung und möglicher Veränderungen im Gewässer. wurden zahlreiche Biotests durchgeführt (siehe Biologische Nachbehandlung von kommunalem Abwasser nach Ozonung – ReTREAT: Teilprojekt Biotests, Kienle et al., 2017), darunter auch ein *Fish Early Life Stage-Test* (FELST) mit Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*). Mittels dieses Tests sollten mögliche Auswirkungen des Abwassers auf frühe Lebensstadien der Regenbogenforelle untersucht und erfasst werden, da diese als besonders empfindlich gegenüber Schadstoffen gelten. Der FELST wurde direkt auf der ARA-Neugut in einem Durchflusssystem durchgeführt, wobei die befruchteten Forelleneier bis zum Aufschwimmen der Brütlinge dem Abwasser der folgenden verschiedenen Reinigungsstufen ausgesetzt wurden:

- Abwasser nach der biologischen Reinigung (Nachklärbecken, **NKB**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon (Ozon, **O3** oder **OZ**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon und im Sandfilter (**SF**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon und frischer granulierter Aktivkohle (**GAK2**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon und vorbeladener granulierter Aktivkohle (**GAK3**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon und im Festbett (**FB**)
- Abwasser nach der Behandlung mit Ozon und im Wirbelbett (**WB**)

3.3 Zielsetzung

Ergänzend zu den Endpunkten des FELST wie Überleben, Schlupfrate, Aufschwimmen, Länge, Gewicht und Veränderungen von Geweben bzw. Organen der Fische, sollten mittels Genexpressionsanalyse von Biomarker-Genen subletale Effekte erfasst werden. Der Vergleich der Genexpressionsdaten mit Fisch-Entwicklungsparametern ermöglicht eine verbesserte Interpretation der Biomarker als Indikatoren im ökologischen Kontext.

3.4 Material und Methoden

3.4.1 Fish early life stage toxicity-Test mit Regenbogenforellen

Eine ausführliche Beschreibung der Testdurchführung ist im Abschlussbericht „Biologische Nachbehandlung von kommunalem Abwasser nach Ozonung – ReTREAT: Teilprojekt Biotests (Kienle et al., 2017) zu finden

Kurzbeschreibung:

Frisch befruchtete Regenbogenforelleneier wurden am 22. Januar 2015 in eine Expositionsanlage überführt und im Durchfluss für 96 Tage exponiert (Ende der Exposition 28. April 2015 siehe Tabelle 2.). Die normale Testdauer für den FELST beträgt 67 Tage. Diese wurde um 29 Tage verlängert damit die juvenilen Fische eine ausreichende Grösse erreicht hatten um ausreichend Gewebe für Genexpressionsanalysen zu gewinnen.



Tabelle 2: Fish early life stage toxicity-Test mit Regenbogenforellen: Expositionsbedingungen

Testdauer:	96 Tage (22. Januar – 28. April 2015)
Testorganismen je Replikat:	30
Testansätze	28 Testansätze 8 Abwässer mit je 3 Replikaten Kontrolle mit 4 Replikaten (rekonstruiertes Wasser)
Exposition:	Durchfluss, 0 – 31 d nach Expositionsbeginn: 2 Gefässvolumen je Tag 32 – 48 d nach Expositionsbeginn: 3 Gefässvolumen je Tag 48 d – Testende: 4 Gefässvolumen je Tag
Testgefässe:	Edelstahlgefässe, 8 L
Belüftung:	Ja, ca. 4 Luftblasen/Sekunde
Fütterung:	Nach Schlupf: 3 mal täglich <i>ad libitum</i> mit Forellenaufzuchtfutter
Photoperiode:	Vor Schlupf: 24 h Dunkelheit Nach Schlupf: 16 h / 8 h hell/dunkel
Temperatur:	Solltemperatur vor Schlupf: 10 ± 2°C Solltemperatur nach Schlupf: 12 ± 2°C

Nach Testende wurden alle Fische mittels MS-222 (3-Aminobenzoesäure-Ethylester-Methanesulfonat) euthanasiert und Gewicht und Länge bestimmt. Für die Genexpressionsanalyse wurden jeweils 15 Fische pro Behandlung (5 pro Replikat, Kontrolle 20 Fische da 4 Replikate) seziiert und Gewebe von Leber und Niere entnommen. Die Gewebeproben wurden direkt auf der ARA-Neugut in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert um eine Degradierung von Nukleinsäuren zu vermeiden. Die weitere Lagerung erfolgte in einen -80 °C Gefrierschrank.

3.4.2 Auswahl der Biomarker-Gensets für das ARA-Neugut Projekt

Davon ausgehend, dass bei der Ozonbehandlung vor allem reaktive oder toxische Umwandlungsprodukte entstehen können, lag der Fokus bei der Auswahl der Biomarker-Gene auf oxidativen Stress und Biotransformation von Xenobiotika (Fremdstoffe in einem Ökosystem). Entsprechend der Vorauswahl von relevanten Biomarker-Genen (siehe Tabelle 1) wurde folgendes Biomarker-Genset für dieses Teilprojekt verwendet (siehe Tabelle 3).



Tabelle 3: Biomarker-Genset ARA-Neugut Projekt

Zelluläre Funktion	Biomarker-Gen
Allgemeine Stressantwort	HSP70 (<i>Heat shock protein 70</i>)
	ABCB1 (<i>ABC-transporter B1, P-glycoprotein, MDR1</i>)
	PXR (<i>Pregnan-X-Rezeptor</i>)
Zellzyklus	p53 (<i>tumor suppressor (p53) gene</i>)
Biotransformation	CYP1A (<i>Cytochrome P450 1A</i>)
	CYP3A (<i>Cytochrome P450 3A</i>)
	GST (<i>Glutathione-S- Transferase</i>)
	UGT (<i>UDP-glucuronosyltransferase</i>)
Immunregulation/ Pathogenabwehr	TNF α (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
	IL-1 β (<i>Interleukin-1beta</i>)
Endokrine Disruption	VTG (<i>Vitellogenin</i>)
Metallstress	MTa (<i>Metallothionein A</i>)
	MTb (<i>Metallothionein B</i>)
	Abcc2 (<i>Multidrug resistance-associated protein 2</i>)
Oxidativer Stress	Hmox (<i>Heme oxygenase</i>)
	NrF2 (<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>)
	GPx (<i>Glutathione peroxidase</i>)
	GR (<i>Glutathione reductase</i>)
	PGC-1 α (<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
	CAT (<i>Catalase</i>)
	SOD (<i>Superoxide dismutase</i>)
	PEPCK (<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>)
Wachstum	FGF2 (<i>Fibroblast growth factor</i>)
Housekeeping-Gen, Referenzgen	18s RNA

Entsprechend des Projektvertrags sollte ein Biomarker-Genset mit 20 Genen (inkl. Referenzgen) analysiert werden. Um die Aussagekraft zu erhöhen, wurde das Set auf 24 Gene erweitert (Zusatzkosten wurden von Eawag / Oekotoxzentrum übernommen)

3.4.3 Primer-Design und Testung

Die Regenbogenforellen-Primer für die Biomarker-Gene wurden anhand der verfügbaren mRNA-Sequenzen (Quelle: GenBank, Regenbogenforellen-Genom) unter Verwendung des Programms IDTdna (<https://eu.idtdna.com>) entwickelt. Die Synthese der Primer wurde von Invitrogen durchgeführt. Die Funktionalität der Primer-Sets auf Amplifikation von spezifischen PCR-Produkten wurde mittels Standard-RT-PCR und Gelelektrophorese getestet.

3.4.4 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Gesamt-RNA von allen Leber- und Vordernierenproben wurde auf der Grundlage einer phenolischen Extraktionsmethode mittels TRIzol (Invitrogen), gemäß den Anweisungen des Herstellers, isoliert. RNA Qualitäten und Abundanzen wurden mit Hilfe eines Spektralphotometer (NanoDrop) bestimmt. Die RNA-Integrität wurde mittels Gel-Elektrophorese auf einem nicht-denaturierenden Agarosegel untersucht. Potentielle genomische DNA Kontaminationen wurden mittels DNase I-(Roche)-Behandlung entfernt. Die cDNA wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transkription-Kit (Applied Biosystems) synthetisiert. Für die cDNA-Synthese wurden die RNA-Isolate von 5 Fischen eines Beckens zu einem Replikat zusammengefasst.



3.4.5 Genexpressionsanalyse

Die quantitative Bestimmung der Biomarker mRNA-Expression in Leber- und Nierengewebe der Fische erfolgte mittels qPCR, unter der Verwendung des LightCycler 480 (Roche) und dem SYBR Green qPCR Master Mix (Promega). Pro Behandlung wurden drei unabhängige biologische Replikate gemessen. Die Ergebnisse wurden an der Expression des Referenzgens 18sRNA normalisiert und die „Mean normalized Expression“ mittels dem Q-Gen-Core-Modul (<http://www.qgene.org/>) (Muller et al., 2002; Simon, 2003) berechnet.

3.4.6 Statistik

Signifikanztest:

Die Signifikanzanalyse wurde mittels One-Way ANOVA mit darauffolgenden Dunnett's-Test (Graphpad) durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde zusätzlich eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels unpaired t-Test durchgeführt.

Principal Component Analyse (Hauptkomponentenanalyse):

Eine Principal Component Analyse wurde mittels dem Programm MayDay (it.inf.uni-tuebingen.de) durchgeführt.



3.5 Ergebnisse und Interpretation

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen der entnommenen Gewebe aus den unterschiedlich exponierten Fischen präsentiert. Die Ergebnisse sind entsprechend der zellulären Funktionen der Gene angeordnet. Dargestellt ist der direkte Vergleich zwischen der Genexpression im Lebergewebe und Nierengewebe.

3.5.1 Beeinflussung der Genexpression durch niedrigeren Sauerstoffgehalt

Vorab muss erwähnt werden, dass die Expression von einzelnen Marker-Genen in diesem Teilprojekt möglicherweise durch einen zusätzlichen Stressor beeinflusst wurde. Dies könnte zu einer Beeinträchtigung der Resultate geführt haben. Gegen Ende des FELST-Test kam es durch den Ausfall der Sauerstoffpumpen in einigen Fischbecken zu einem signifikanten Abfall des Sauerstoffgehalts unter 60% Sauerstoffsättigung (siehe Abbildung 1), dadurch könnten Hypoxie-Effekte in den juvenilen Regenbogenforellen induziert worden sein. Gerade Regenbogenforellen reagieren sensitiv gegenüber Sauerstoffmangel.

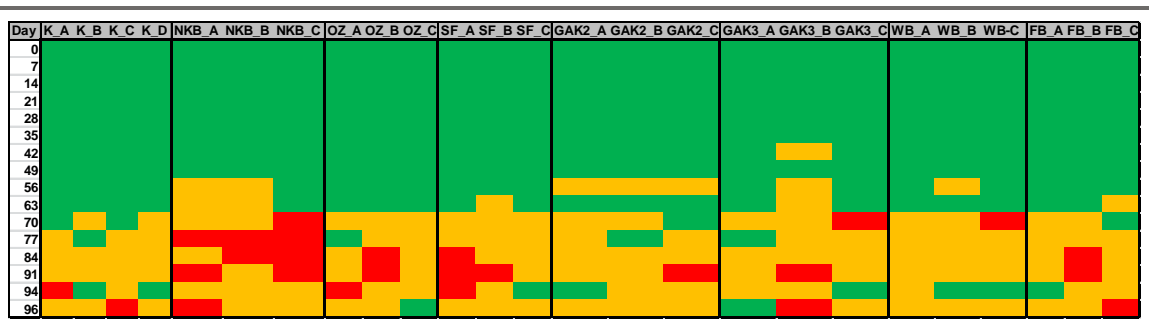


Abbildung1: übernommen vom ReTREAT Abschlussbericht 2017 (Kienle et al., 2017)

Farbliche Darstellung der gemessenen Sauerstoffsättigung (%) in den Testmedien während der Exposition der Fische. Grüne Felder zeigen Werte $\geq 80\%$, gelbe Felder $< 80\%$ und $\geq 60\%$ und rote Felder $< 60\%$. K = künstlich aus deionisiertem Wasser hergestelltes Kontrollmedium, NKB: Nachklärbecken, OZ: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: Granulierte Aktivkohle (frisch), GAK3: vorbeladene GAK, WB: Wirbelbett, FB: Festbett,

Die Expressionsdaten aus dem Fischpool der einzelnen Becken (3 Becken pro Behandlung) wurden direkt miteinander verglichen. Eine Abweichung der Genexpressionsresultate in einem der biologischen Replikate in Korrelation zum Sauerstoffgehalt von mehr als 25% deutet auf eine direkte Beeinflussung durch den geringeren Sauerstoffgehalt hin. Die beeinträchtigten Gene sind in den Resultaten aufgeführt.



3.5.2 Biomarker für oxidativen Stress

Für die Detektion von oxidativem Stress wurde die Genexpression von 8 spezifischen Biomarker-Genen im Leber- und Nierengewebe untersucht (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Biomarker-Gene oxidativer Stress

Biomarker-Gene	Expression in der Leber	Expression in der Niere
<p>CAT (<i>catalase</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Höhere Expressionslevel in der Leber - Vergleichbare Ergebnisse zwischen Leber und Niere - Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		
<p>GR (<i>Glutathione reductase</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vergleichbare Expressionslevel Leber und Niere - Vergleichbare Ergebnisse zwischen Leber und Niere - Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		
<p>GPx (<i>Glutathione peroxidase</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> Vergleichbare Expressionslevel Leber und Niere - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine spezifische Regulierung Niere - Sauerstoffeffekt detektiert! 		
<p>Hmox (<i>Heme oxygenase</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Vergleichbare Expressionslevel Leber und Niere - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine spezifische Regulierung Niere –vergleichbarer Trend - Sauerstoffeffekt detektiert! 		



Biomarker-Gene	Expression in der Leber	Expression in der Niere
<p>NrF2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vergleichbare Expressionslevel Leber und Niere - Vergleichbare Ergebnisse zwischen Leber und Niere - Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		
<p>PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Vergleichbare Expressionslevel Leber und Niere - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine spezifische Regulierung Niere -Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		
<p>SOD (Superoxide dismutase)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Vergleichbare Expressionslevel Leber und Niere - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine spezifische Regulierung Niere -Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		

Legende: NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: Granulierte Aktivkohle (frisch), GAK3: vorbeladene GAK, WB: Wirbelbett, FB: Festbett. n Kontrolle = 4, n Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c signifikanter Unterschied zur Ozonung. Die Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit * markiert.

Vergleich Leber- und Nierengewebe:

Alle Gene, mit der Ausnahme von CAT, zeigten vergleichbare Expressionslevel zwischen beiden Geweben. CAT zeigte eine höhere Expression im Lebergewebe. Signifikantere Regulierungsmuster der Genexpression zwischen den einzelnen Behandlungen wurden vermehrt im Lebergewebe detektiert. Dies spricht für eine besser Eignung des Lebergewebes für diesen Test. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass die Präparation der Kopfniere durch die geringe Grösse der Fische sehr schwierig war, was ebenfalls gegen deren Eignung spricht.

**Vergleich der Behandlungen:**

Alle Biomarker, gemessen im Lebergewebe, zeigten eine signifikante Erhöhung der Genexpression im Nachklärbecken gegenüber der Kontrolle. Im Nierengewebe konnte ein ähnlicher Trend festgestellt werden, jedoch wurden signifikante Unterschiede nur für drei Gene detektiert (CAT, GR, NrF2). Die Exposition der Fische mit Ozon behandeltem Abwasser zeigte generell eine induzierte Expression aller Marker im Vergleich zur Kontrolle. Signifikante Unterschiede konnten im Lebergewebe für vier Gene gemessen werden (Hmox, NrF2, SOD, PGC-1 α) und im Nierengewebe für drei Gene (GR, CAT, NrF2). Mit Ausnahme von GR gemessen im Lebergewebe, konnten keine signifikanten Unterschiede der Genexpression zwischen Ozonung und Nachklärbecken gemessen werden. Die geringere Expression von GR im Lebergewebe im Vergleich zum Nachklärbecken könnte aber auch durch die hohe Variabilität der Replikate hervorgerufen worden sein.

Beim Vergleich der Nachbehandlungen können in den meisten Fällen für beide Gewebe keine Unterschiede zur Ozonung festgestellt werden. Im Lebergewebe zeigte NrF2 eine signifikant verringerte Geninduktion für GAK2 und FB im Vergleich zur Ozonung. Bei SOD konnte eine signifikante Reduktion zwischen GAK 2 im Vergleich zur Ozonung im Leber und Nierengewebe gemessen werden. Zum Teil variierte die Genexpression innerhalb einer Behandlung zwischen den Replikaten stark, was einen starken Einfluss auf die Signifikanzanalyse hat.

Beeinflussung der Genexpression durch niedrigen Sauerstoffgehalt:

Ein eindeutiger Einfluss des Sauerstoffmangels auf die Regulierung der Genexpression zeigte sich bei den Genen GPx, Hmox sowie bei HSP70 und MTa (siehe unten). Daher sind Ergebnisse für diese Biomarker-Gene mit Vorsicht zu bewerten und werden für weitere Publikationen nicht berücksichtigt. Dies zeigt aber auch die Sensitivität dieser Gene gegenüber diesen Stressor auf.

Dateninterpretation:

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Fische von NKB und O3 einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt waren. Entgegen der Erwartungen scheint eine Exposition mit Ozon behandeltem Wasser keine weitere Erhöhung des Stresses zu verursachen. Bis auf GAK2 (NrF2 und SOD) und FB (NrF2) zeigten die einzelnen Nachbehandlungen keine Verbesserung des Effekts. Basierend auf den Daten scheint GAK2 die effektivste Nachbehandlungsmethode zu sein um oxidativen Stress zu verringern.

NrF2 und SOD scheinen geeignete Marker zu sein, um oxidativen Stress im Fischgewebe zu bestimmen. Diese Beurteilung steht aber unter dem Vorbehalt der möglichen Beeinflussung der Genexpression durch den Sauerstoffsättigungseffekt.



3.5.3 Biomarker für Metallbelastung

Für die Detektion von subletalen Effekten hervorgerufen durch erhöhte Schwermetallbelastung wurde die Genexpression von drei Biomarker-Genen im Leber- und Nierengewebe untersucht (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Biomarker-Gene Metallstress

Biomarker-Gene	Expression in der Leber	Expression in der Niere
<p>MTa (Metallothionein A)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Höhere Expressionslevel in der Leber - Vergleichbare Ergebnisse zwischen Leber und Niere - Sauerstoffeffekt detektiert! 		
<p>MTb (Metallothionein B)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Höhere Expressionslevel in der Leber - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine spezifische Regulierung Niere -Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		
<p>Abcc2 (ABC-transporter C2)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Höhere Expressionslevel in der Leber - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine spezifische Regulierung Niere -Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		

Legende: NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: Granulierte Aktivkohle (frisch), GAK3: vorbeladene GAK, WB: Wirbelbett, FB: Festbett. n Kontrolle = 4, n Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c signifikanter Unterschied zur Ozonung. Die Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit * markiert.

Vergleich Leber- und Nierengewebe:

Alle Gene zeigten ein höheres Expressionslevel im Lebergewebe.

**Vergleich der Behandlungen:**

Alle Biomarker gemessen im Lebergewebe zeigten eine signifikante Erhöhung der Genexpression im Nachklärbecken gegenüber der Kontrolle. Im Nierengewebe konnte ein ähnlicher Trend festgestellt werden, jedoch wurden signifikante Unterschiede nur für MTa detektiert. Die Ozonbehandlung zeigte keine Unterschiede zu NKB für MTa (signifikant zur Kontrolle für Niere) und MTb (signifikant zur Kontrolle für Leber). Eine signifikante Abnahme der Expression von O3 gegenüber NKB wurde für Abcc2 im Lebergewebe gemessen. Bei den Nachbehandlungen konnten keine signifikanten Unterschiede zu NKB und O3 für MTa gemessen werden. Für MTb zeigten GAK2 und FB eine signifikante Reduktion der Expression im Lebergewebe. Für Abcc2 konnte bereits eine niedrigere Expression im Lebergewebe nach O3 Behandlung im Vergleich zu NKB detektiert werden, ebenso für die Nachbehandlungen GAK2, GAK3 und FB. Allerdings wurden keine signifikanten Änderungen im Vergleich O3 und den Nachbehandlungen erfasst, mit Ausnahme von WB wo eine Induktion der der Expression gegenüber O3 gemessen wurde.

Beeinflussung der Genexpression durch niedrigeren Sauerstoffgehalt:

Für die Expression von MTa konnte ein Effekt durch den verminderten Sauerstoffgehalt erfasst werden. Daher sind Ergebnisse von MTa mit Vorsicht zu bewerten und werden für weitere Publikationen nicht berücksichtigt.

Dateninterpretation:

Vor allem die MTb Daten gemessen im Lebergewebe zeigen deutlich, dass die Fische in den NKB und O3 Behandlungen erhöhter Schwermetallbelastung ausgesetzt waren. Dies war zu erwarten da durch die Ozonung keine Metalle entfernt werden. Als Nachbehandlung reduzierte besonders die frische partikuläre Aktivkohle (GAK2) die MTb Expression. Das kann damit erklärt werden, dass bei der frischen Aktivkohle Schwermetall gut bindet und somit aus der Wasserphase entfernt wird. Bei MTa, welches ebenfalls durch Glukokortikoide reguliert werden kann (Glukokortikoide Bindungsstelle auf Promotorsequenz) waren die Unterschiede weniger ausgeprägt und deshalb nicht statistisch nachweisbar. Trotz fehlender Signifikanz zeigten die Nachbehandlungen mit GAK2 und FB die besten Effekte.

Die Regulationsmuster der Abcc2 Expression sprechen eher für einen Effekt, welcher durch die Exposition mit organische Verbindungen ausgelöst wurde als durch Schwermetalexposition. Dafür spricht die signifikante Abnahme der Expression von O3 im Vergleich zu NKB. Abcc2 transportiert nicht nur komplexierte Metalle, sondern auch konjugierte organische Schadstoffe und diese werden effektiv durch die Ozonbehandlung eliminiert. Bei den Nachbehandlungen zeigten GAK2 und FB die besten Ergebnisse (nicht statisch signifikant).

Entsprechend der Ergebnisse scheint GAK2 die effektivste Nachbehandlungsmethode zu sein um Schwermetalle zu entfernen. MTb konnte als geeigneter Marker für Metallstress identifiziert werden.

3.5.4 Biomarker für Biotransformation

Für die Detektion der Aktivierung des zellulären Schadstoffmetabolismus von organischen Mikroverunreinigungen wurde die Genexpression von vier Biomarker-Genen im Leber- und Nierengewebe untersucht (siehe Tabelle 6).



Tabelle 6: Biomarker-Gene für Biotransformation

Biomarker-Gene	Expression in der Leber	Expression in der Niere
<p>Cyp1a (Cytochrome P450 1A)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Höhere Expressionslevel in der Leber - Spezifische Regulierungsmuster Leber und Niere -Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		
<p>Cyp3a (Cytochrome P450 3A)</p> <ul style="list-style-type: none"> Höhere Expressionslevel in der Leber - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine spezifische Regulierung Niere -Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		
<p>GST (Glutathione-S- Transferase)</p> <ul style="list-style-type: none"> Höhere Expressionslevel in der Leber - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine spezifische Regulierung Niere -Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		
<p>UGT (UDP-glucuronosyltransferase)</p> <ul style="list-style-type: none"> Höhere Expressionslevel in der Leber - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine spezifische Regulierung Niere -Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		

Legende. NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: Granulierte Aktivkohle (frisch), GAK3: vorbeladene GAK, WB: Wirbelbett, FB: Festbett. n Kontrolle = 4, n Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c signifikanter Unterschied zur Ozonung. Die Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit * markiert.



Vergleich Leber- und Nierengewebe:

Alle Gene zeigten ein höheres Expressionslevel im Lebergewebe. Es ist bekannt, dass die ausgewählten Gene vorrangig in der Leber exprimiert werden.

Signifikante Regulierungsmuster der Genexpression zwischen den einzelnen Behandlungen wurden vermehrt im Lebergewebe detektiert. Dies spricht für eine bessere Eignung des Lebergewebes für diesen Test.

Vergleich der Behandlungen:

Alle Biomarker, gemessen im Lebergewebe, zeigten eine signifikante Erhöhung der Genexpression im Nachklärbecken gegenüber der Kontrolle. Im Nierengewebe konnte dies nur für Cyp1a detektiert werden. Bei allen anderen untersuchten Genen konnte durch die hohen Standardabweichungen der Replikate keine signifikanten Unterschiede erfasst werden. Für alle Gene konnte eine signifikante Reduktion der Expression in der O₃ Behandlung im Vergleich zum Nachklärbecken im Lebergewebe gemessen werden. Generell zeigten alle Nachbehandlungen ebenfalls eine signifikant geringere Expression (Lebergewebe) gegenüber NKB (ausser SF und WB für Cyp1a und Cyp3a). Unterschiede zwischen O₃ und den Nachbehandlungen konnten nur für Cyp3 Expression in WB (erhöhte Expression) gemessen werden.

Beeinflussung der Genexpression durch niedrigen Sauerstoffgehalt:

Es konnte keine direkte Beeinträchtigung der Expression durch den niedrigen Sauerstoffgehalt erfasst werden.

Dateninterpretation:

Die Resultate der Biomarker-Genexpression zeigen sehr deutlich, dass die Ozonbehandlungen effektiv organische Mikroverunreinigungen (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, aliphatische Kohlenwasserstoffe, Xenohormone oder Pharmaka) eliminiert. Die Aktivierung des zellulären Schadstoffmetabolismus war nach der Ozonung deutlich reduziert im Vergleich zur biologischen Behandlung und wieder auf ein vergleichbares Level mit der Kontrolle gesunken. Ein zusätzlich positiver Effekt durch die einzelnen Nachbehandlungen konnte nicht erfasst werden. Die Ausnahme war die WB Behandlung, welche teilweise eine erneute Induktion der Genexpression hervorrief und damit als ungeeignet eingestuft werden kann.

Bis auf WB kann in diesem Fall keine Empfehlung für die bessere Eignung einer spezifischen Ozon-Nachbehandlungsmethode gegeben werden. Basierend auf einem Trendvergleich für alle Gene scheinen FB und GAK2 ebenfalls am besten abzuschneiden.

Alle der untersuchten Biomarker-Gene zeigten eine sehr sensitive Regulierung und können damit als geeignet eingestuft werden.



3.5.5 Allgemeine Stressantwort

Für die Detektion von subletalen Effekten, hervorgerufen durch allgemeinen Stress, wurde die Genexpression von drei Biomarker-Genen im Leber- und Nierengewebe untersucht (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Biomarker-Gene für allgemeine Stressantwort

Biomarker-Gene	Expression in der Leber	Expression in der Niere
<p>HSP70 (Heat shock protein 70)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Höhere Expressionslevel in der Leber - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine spezifische Regulierung Niere -Sauerstoffeffekt detektiert! 		
<p>Abcb1 (ABC-transporter B1, P-glycoprotein, MDR1)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Höhere Expressionslevel in der Leber - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine spezifische Regulierung Niere -Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		
<p>PXR (Pregnan-X-Rezeptor)</p> <ul style="list-style-type: none"> -Höhere Expressionslevel in der Leber - Spezifische Regulierungsmuster Leber - Keine Expression im Nierengewebe detektiert -Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		

Legende: NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: Granulierte Aktivkohle (frisch), GAK3: vorbeladene GAK, WB: Wirbelbett, FB: Festbett. n Kontrolle = 4, n Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c signifikanter Unterschied zur Ozonung. Die Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit * markiert.

Vergleich Leber- und Nierengewebe:

Alle Gene zeigten ein erhöhtes Expressionslevel im Lebergewebe. Die Expression von PXR im Nierengewebe war so gering, dass eine Auswertung der Daten nicht möglich war. Signifikante Regulierungsmuster der Genexpression zwischen den einzelnen Behandlungen wurden nur im Lebergewebe detektiert. Dies spricht für eine bessere Eignung des Lebergewebes für diesen Test.

Vergleich der Behandlungen:

Abcb1 und PXR, gemessen im Lebergewebe, zeigten eine signifikante Erhöhung der Genexpression im Nachklärbecken gegenüber der Kontrolle. Für Abcb1 wurde eine signifikante Reduzierung der Expression gegenüber NKB für die O3 und FB Behandlung gemessen. Bei PXR zeigte SF eine signifikante Reduzierung der Expression gegenüber NKB. Für alle drei untersuchten Gene der allgemeinen Stressantwort konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen O3 und den Nachbehandlungen erfasst werden, ausser für WB bei HSP70, bei dem die



Expression allerdings signifikant hoch- und nicht herunter reguliert wurde gegenüber der Ozonierung. Interessanterweise zeigten die Behandlungen mit GAK3 und WB für HSP70, WB bei Abcb1 und SF, GAK2, GAK3 und WB für PXR eine Erhöhung der Expression im Vergleich zur Kontrolle. Einzig FB ist bei allen drei Genen auf Kontrolllevel exprimiert.

Im Nierengewebe konnten durch die hohe Variabilität der Messwerte keine signifikanten Unterschiede für Abcb1 und HSP70 erfasst werden.

Beeinflussung der Genexpression durch niedrigen Sauerstoffgehalt:

Für die Expression von HSP70 konnte ein Effekt durch die verminderte Sauerstoffsättigung erfasst werden. Daher sind Ergebnisse von HSP70 mit Vorsicht zu bewerten und werden für weitere Publikationen nicht berücksichtigt.

Dateninterpretation:

Abcb1 zeigte ähnlich wie die Biotransformationsmarker eine Reduktion nach der Ozonung im Vergleich zum Nachklärbecken. Abcb1 transportiert konjugierte und unkonjugierte organische Verbindungen, wird aber auch unspezifisch durch andere Stressoren (wie Hitze, UV, usw.) reguliert. Daher kann man unter diesen Bedingungen von einem reinen Chemikalieneffekt ausgehen. Ein zusätzlich positiver Effekt durch die einzelnen Nachbehandlungen konnte nicht erfasst werden. Die Induktion von PXR in der NKB Behandlung kann auch mit einer erhöhten Chemikalienbelastung in Verbindung gebracht werden, da PXR als Kernrezeptor die Aktivierung von Entgiftungsenzymen steuert aber auch unspezifisch reguliert werden kann. Die Erhöhung der Expression im Vergleich zur Kontrolle in den SF, GAK2, GAK3 und WB Nachbehandlungen kann nicht begründet werden. Effekte für HSP70 konnten nicht erfasst werden. Verwunderlich ist die erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrolle und Ozonierung nach WB Behandlung, da keine erhöhte Temperatur in den WB gemessen wurde und diese eine verhältnismässig gute Sauerstoffsättigung zeigten.

Abcb1 konnte als geeigneter Marker identifiziert werden, jedoch sollte dieser besser unter Schadstoffmetabolisierung eingeordnet werden.

3.5.6 Endokrine Effekte

Für die Detektion von endokrinen Effekten wurde die Genexpression von einem Biomarker-Gen im Lebergewebe untersucht (siehe Tabelle 8).



Tabelle 8: Biomarker-Gene endokrine Effekte

Biomarker-Gene	Expression in der Leber	Expression in der Niere
<p>VTG (Vitellogenin)</p> <p>- Spezifische Regulierungsmuster Leber</p> <p>-Kein Sauerstoffeffekt detektiert</p>		
<p>Legende: NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: Granulierte Aktivkohle (frisch), GAK3: vorbeladene GAK, WB: Wirbelbett, FB: Festbett. n Kontrolle = 4, n Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c signifikanter Unterschied zur Ozonung. Die Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit * markiert.</p>		

Vergleich Leber- und Nierengewebe:

VTG wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, daher wurde die Expression nicht im Nierengewebe gemessen.

Vergleich der Behandlungen:

VTG zeigte eine signifikante Erhöhung der Genexpression im Nachklärbecken gegenüber der Kontrolle. O3 und alle Nachbehandlungen zeigten eine signifikante Reduktion der Expression gegenüber NKB. Unterschiede zwischen O3 und den Nachbehandlungen wurden nicht gemessen.

Beeinflussung der Genexpression durch niedrigen Sauerstoffgehalt:

Es wurde keine Beeinflussung festgestellt.

Dateninterpretation:

Die signifikante Abnahme der Expression nach O3 Behandlung bestätigt, dass durch die Ozonung die hormonelle Aktivität effizient abgebaut wurde. Die O3 Behandlung ist in diesem Fall so effizient, dass die einzelnen Nachbehandlungen keine weitere Verbesserung hervorrufen. VTG kann als sehr geeigneter Marker eingestuft werden.

3.5.7 Immunregulation und pathogene Abwehr

Für die Detektion der zellulären Immunregulation und Pathogenabwehr wurde die Genexpression von 2 Biomarker-Genen im Leber- und Nierengewebe untersucht (siehe Tabelle 9)



Tabelle 9: Biomarker-Gene für Immunregulation und pathogene Abwehr

Biomarker-Gene	Expression in der Leber	Expression in der Niere
<p>TNFα (Tumor necrosis factor alpha)</p> <p>-Vergleichbare Expressionslevel Leber und Niere</p> <p>- Vergleichbare Ergebnisse zwischen Leber und Niere</p> <p>- Kein Sauerstoffeffekt detektiert</p>		
<p>IL1β (Interleukin-1beta)</p> <p>-Vergleichbare Expressionslevel Leber und Niere</p> <p>- Vergleichbare Ergebnisse zwischen Leber und Niere</p> <p>- Kein Sauerstoffeffekt detektiert</p>		

Legende: NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: Granulierte Aktivkohle (frisch), GAK3: vorbeladene GAK, WB: Wirbelbett, FB: Festbett. n Kontrolle = 4, n Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c signifikanter Unterschied zur Ozonung. Die Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit * markiert.

Vergleich Leber- und Nierengewebe:

Beide untersuchten Gene zeigten vergleichbare Expressionslevel und Regulierungsmuster in beiden Geweben.

Vergleich der Behandlungen:

Beide Gene zeigten eine signifikante Erhöhung der Genexpression (Leber und Niere) im Nachklärbecken gegenüber der Kontrolle. O3 und alle Nachbehandlungen zeigten eine signifikante Reduktion der Expression gegenüber NKB. Unterschiede zwischen O3 und den Nachbehandlungen wurden nicht gemessen.

Beeinflussung der Genexpression durch niedrigen Sauerstoffgehalt:

Es wurde keine Beeinflussung festgestellt.

Dateninterpretation:

Die signifikante Abnahme der Expression nach O3 Behandlung zeigt deutlich auf, dass durch die Ozonung die Belastung des Immunsystems reduziert wird. Die O3 Behandlung ist in diesem Fall so effizient, dass die einzelnen Nachbehandlungen keine weitere Verbesserung hervorrufen.

Beide Gene können als sehr gut geeignete Marker eingestuft werden.

3.5.8 Zellzyklus / Apoptose

Für die Detektion von Effekten auf den Zellzyklus / Apoptose wurde die Genexpression von einem Biomarker-Gen im Leber- und Nierengewebe untersucht (siehe Tabelle 10).



Tabelle 10: Biomarker-Gene für Zellzyklus / Apoptose

Biomarker-Gene	Expression in der Leber	Expression in der Niere
<p>p53 (tumor suppressor (p53) gene)</p> <p>Vergleichbare Expressionslevel Leber und Niere</p> <p>- Vergleichbare Ergebnisse zwischen Leber und Niere</p> <p>- Kein Sauerstoffeffekt detektiert</p>		
<p>Legende: NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: Granulierte Aktivkohle (frisch), GAK3: vorbeladene GAK, WB: Wirbelbett, FB: Festbett. n Kontrolle = 4, n Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c signifikanter Unterschied zur Ozonung. Die Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit * markiert.</p>		

Vergleich Leber- und Nierengewebe:

P53 zeigte vergleichbare Expressionslevel und Regulierungsmuster in beiden Geweben.

Vergleich der Behandlungen:

p53 zeigte eine signifikante Erhöhung der Genexpression (Leber und Niere) im Nachklärbecken gegenüber der Kontrolle. Die O3 Behandlung zeigte im Lebergewebe eine signifikante Reduktion der Expression gegenüber NKB. Unterschiede zwischen O3 und den Nachbehandlungen wurden nicht gemessen. Dafür zeigten GAK2 und FB (Leber und Niere) eine signifikante Reduzierung der Expression gegenüber der NKB Behandlung.

Beeinflussung der Genexpression durch niedrigen Sauerstoffgehalt:

Es wurde keine Beeinflussung festgestellt.

Dateninterpretation:

Da p53 ein sensibler Apoptose-Marker (programmierter Zelltod) ist, wurde basierend auf den Genexpressionsdaten angenommen, dass die Fische aus der NKB Behandlungen die stärksten Zellschädigungen aufweisen sollten. Dieses Ergebnis konnte nicht von den histologischen Untersuchungen bestätigt werden. Dort wurde die grösste Schädigung des Lebergewebes nach der O3 Behandlung festgestellt. Im Widerspruch mit den histologischen Daten steht ebenfalls die Reduzierung der Expression durch FB Behandlung. Die histologischen Untersuchungen zeigten keine klare Verbesserung des Gewebezustandes nach FB Behandlung. In Übereinstimmung mit den histologischen Untersuchungen ist allerdings eine signifikante Verbesserung durch GAK2 Behandlung festgestellt worden.

Eine Wertung über die Eignung des Markers kann anhand der unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zu den histologischen Untersuchungen nicht gegeben werden.

In Übereinstimmung zu den histologischen Untersuchungen ist GAK2 die effektivste Nachbehandlungsmethode, um Apoptose zu reduzieren.

3.5.9 Metabolismus

Für die Detektion von Effekten auf den Metabolismus wurde die Genexpression von einem Biomarker-Gen im Leber- und Nierengewebe untersucht (siehe Tabelle 11).



Tabelle 11: Biomarker-Gene für Metabolismus

Biomarker-Gene	Expression in der Leber	Expression in der Niere
<p>PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase)</p> <p>-Höhere Expressionslevel in der Leber</p> <p>- Keine spezifischen Regulierungsmuster Leber und Niere</p> <p>-Kein Sauerstoffeffekt detektiert</p>		
<p>Legende: NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: Granulierte Aktivkohle (frisch), GAK3: vorbeladene GAK, WB: Wirbelbett, FB: Festbett. n Kontrolle = 4, n Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c signifikanter Unterschied zur Ozonung. Die Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit * markiert.</p>		

Vergleich Leber- und Nierengewebe:

PEPCK zeigte ein erhöhtes Expressionslevel im Lebergewebe.

Vergleich der Behandlungen:

Für beide Gewebe konnten keine signifikanten Regulierungsmuster der Genexpression zwischen den einzelnen Behandlungen detektiert werden.

Beeinflussung der Genexpression durch niedrigen Sauerstoffgehalt:

Es wurde keine Beeinflussung festgestellt.

Dateninterpretation:

PEPCK wird in Hungerperioden induziert um den Glukosespiegel im Körper konstant zu halten. Da die Fische von allen Behandlungen gleich gefüttert wurden, könnte dies eine Erklärung für die geringen Unterschiede zwischen den Behandlungen sein.

Daher scheint PEPCK kein geeigneter Marker für den FELST, da durch Fütterung keine spezifische Regulierung hervorgerufen wird.

3.5.10 Wachstum

Für die Detektion von Effekten auf das Wachstum wurde die Genexpression von einem Biomarker-Gen im Leber- und Nierengewebe untersucht (siehe Tabelle 12).



Tabelle 12: Biomarker-Gene für Wachstum

Biomarker-Gene	Expression in der Leber	Expression in der Niere
<p>FGF2 (Fibroblast growth factor)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Höhere Expressionslevel in der Leber - Keine spezifischen Regulierungsmuster Leber - Keine Expression im Nierengewebe detektiert -Kein Sauerstoffeffekt detektiert 		

Legende. NKB: Nachklärbecken, O3: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: Granulierte Aktivkohle (frisch), GAK3: vorbeladene GAK, WB: Wirbelbett, FB: Festbett. n Kontrolle = 4, n Behandlung = 3. Jeweils gepoolte RNA Probe von 5 Fischen pro Testbecken. a: signifikanter Unterschied zur Kontrolle, b signifikanter Unterschied zum Nachklärbecken, c signifikanter Unterschied zur Ozonung. Die Signifikanzanalyse wurde mittels ANOVA mit Dunnett's-Test durchgeführt. Unabhängig von der ANOVA wurde eine Einzelgruppenanalyse der Daten mittels t-Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede welche sich nur mittels t-Test ergaben sind mit * markiert.

Vergleich Leber- und Nierengewebe:

Für FGF2 konnte nur ein schwaches Expressionslevel im Lebergewebe gemessen werden. Im Nierengewebe konnte keine Expression erfasst werden.

Vergleich der Behandlungen:

Es konnten keine signifikanten Regulierungsmuster der Genexpression zwischen den einzelnen Behandlungen gemessen werden.

Beeinflussung der Genexpression durch niedrigen Sauerstoffgehalt:

Es wurde keine Beeinflussung festgestellt.

Dateninterpretation:

Eine Interpretation der Daten ist anhand der fehlenden spezifischen Regulation der Genexpression nicht möglich. Es ist lediglich ein leichter Trend zu erkennen, dass bei der NKB Behandlung die Expression geringer ist im Vergleich zu den anderen Behandlungen. Dieser Trend wurde auch bei der Bestimmung der Körperlänge und Gewicht der Fische erfasst.

In anderen Studien wird FGF2 im Muskelgewebe gemessen (Chauvigné et al., 2013), dies konnte in dieser Studie nicht durchgeführt werden. Es wurde zwar Muskelgewebe bei der Fischbeprobung entnommen aber durch einen Ausfall des -80 °C Gefrierschranks war die RNA in diesen Proben degradiert und konnte nicht mehr für Genexpressionsanalysen verwendet werden.

3.6 Principal Component Analyse (PCA)

Um die Ergebnisse der Genexpression aus den einzelnen Behandlungen direkt miteinander zu vergleichen und um die Eignung der Nachbehandlungen zu bestimmen, wurde eine PCA durchgeführt (siehe Abbildung 2). In der Analyse wird das Verhalten aller getesteten Biomarker der verschiedenen Reinigungsstufen integriert und durch die Lage und Distanz zueinander ausgewertet.

Die PCA wurde nur mit den Daten aus dem Lebergewebe durchgeführt, da die Ergebnisse aus den Nierengeweben kaum spezifische Regulationsmuster aufwiesen. Ausserdem wurden die Ergebnisse der Biomarker-Genexpression von HSP70, GRx, Hmox und MTa nicht mit in die



Analyse eingeschlossen, da diese offensichtlich durch die geringe Sauerstoffsättigung beeinflusst waren.

Zusätzlich muss erwähnt werden, dass die Ergebnisse dieser PCA etwas abweichen im Vergleich zum Abschlussbericht ReTreat 2016 (Kienle et al., 2017). Dort wurden nur 13 Gene in der Analyse berücksichtigt, in der aktuellen Analyse sind es 18 Gene. Zum damaligen Zeitpunkt war die Messung von 5 Biomarker-Genen noch nicht abgeschlossen. Die Ergebnisse wurden dadurch aber nicht beeinflusst.

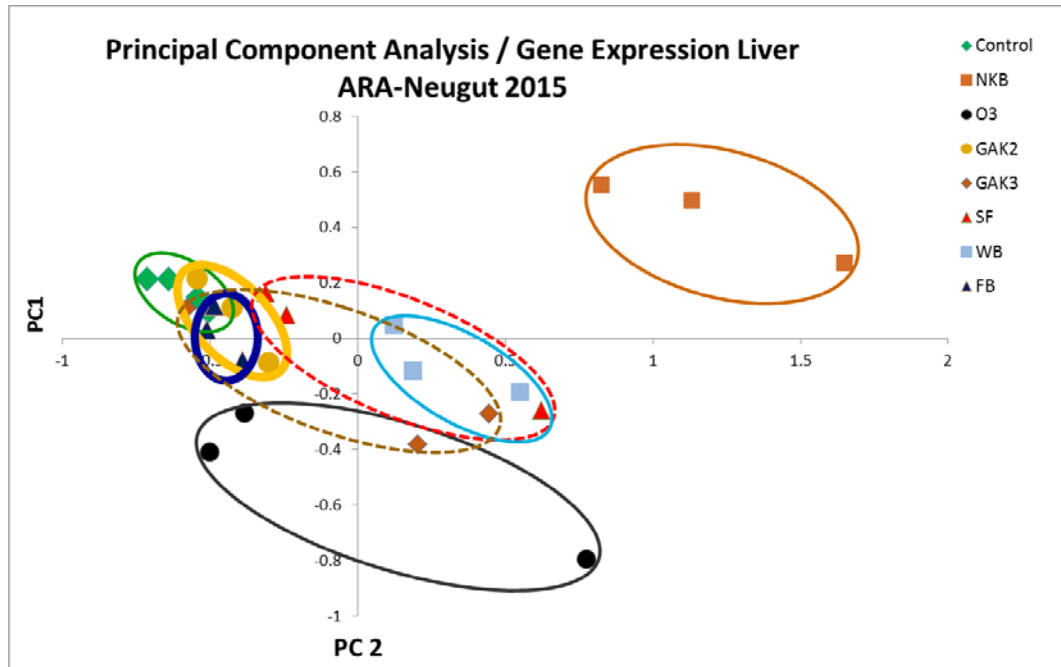


Abbildung 2: Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker-Gene in Regenbogenforellen auf der ARA Neugut. NKB: Nachklärbecken, O₃: Ozonung, SF: Sandfilter, GAK2: Granulierte Aktivkohle (frisch), GAK3: vorbeladene GAK, WB: Wirbelbett, FB: Festbett. n Kontrolle = 4, n Behandlung = 3. Umso näher die Datenpunkte zueinander liegen, umso ähnlicher verhalten sich die Biomarkergene in den Behandlungen.

Dateninterpretation:

Die Datenpunkte des Nachklärbeckens sind am weitesten von der Kontrolle und allen anderen Behandlungen entfernt, was darauf hinweist, dass das Wasser des Nachklärbeckens den grössten Effekt auf die Fische hatte. Die Ozonung zeigt ebenfalls einen klaren Unterschied zur Kontrolle auf, was auch darauf hindeutet, dass diese Behandlung verstärkt Effekte auf die Fische ausübt. Bei den unterschiedlichen Nachbehandlungen liegt die frische partikuläre Aktivkohle (GAK2) und das Festbett am nächsten zur Kontrolle, was eine sehr gute Eignung dieser Nachbehandlungen anzeigt. Am schlechtesten schied die Wirbelbett-Nachbehandlung ab, welche den grössten Abstand aller Nachbehandlungen zur Kontrolle aufzeigte.

Gesamt betrachtet kann man folgendes Ranking der Nachbehandlungen entsprechend ihrer Eignung erstellen:

1 GAK2 und FB → 2. SF → 3. GAK3 → 4. WB

3.7 Schlussfolgerung

Mittels der Genexpressionsanalyse von ausgewählten Biomarkern konnte die Leistungsfähigkeit der Behandlung des Abwassers mit Ozon an der ARA Neugut (Dübendorf) gut bestätigt werden. Die erhöhten subletalen Effekte, welche in den Fischen nach der biologischen Behandlung gemessen wurden, wie Aktivierung des zellulären Schadstoffmetabolismus, Immun- und Pathogenabwehr, endokrine Wirkung oder Effekte auf den Zellzyklus, waren nach der Ozonung deutlich reduziert. Dies bestätigt die Ergebnisse aller weiteren Biotests, welche in diesem Projekt



durchgeführt wurden (siehe Abschlussbericht ReTREAT: Teilprojekt Biotests 2016, Kienle et al., 2017) - die Ozonung verringerte die Toxizität des biologisch gereinigten Abwassers effizient.

Des Weiteren konnte mittels dieser Methode getestet werden, wie effizient die verschiedenen Nachbehandlungen (Sandfilter, granuliert Aktivkohlefilter, Wirbel- und Festbett-Behandlungen) subletale Effekte in den Fischen, hervorgerufen durch reaktive oder toxische Produkte welche bei der Ozonbehandlung entstehen, verringern. Vor allem die zellulären Effekte in den Fischen gegenüber oxidativem Stress und Schwermetallbelastung wurden mittels GAK2 und FB-Behandlung signifikant reduziert, was für eine gute Eignung dieser Nachbehandlungen spricht. Am Schlechtesten schnitten die GAK3 und WB Behandlungen ab.

Aus den Gesamtergebnissen der Genexpressionsstudie ergab sich folgende Klassifizierung der Nachbehandlungen um die induzierten subletalen Effekte in den Fischen durch die Abwasserexposition zu reduzieren: **1. GAK2 und FB → 2. SF → 3. GAK3 → 4. WB**

In der Gesamtbetrachtung aller durchgeführten in vitro- und in vivo-Biotests und aller Endpunkte des „Fish early life stage toxicity-Test“ einschliesslich der Histopathologie, zeigt sich der Trend, dass die frische granuliert Aktivkohle (GAK2) die verbleibende Toxizität nach Ozonung am besten eliminiert (siehe Abschlussbericht ReTREAT: Teilprojekt Biotests 2016, Kienle et al., 2017).

Die hier festgestellte gute Eignung des Festbettfilters (FB) konnte durch die Ergebnisse der anderen Tests nicht bestätigt werden. Dort zeigte die Behandlung mit der beladenen granulierten Aktivkohle (GAK3) einen besseren Effekt. Generell ist eine eindeutige Klassifizierung der Nachbehandlungen schwer möglich, da zwischen den verschiedenen Tests die Resultate teilweise stark variierten (siehe Abschlussbericht ReTREAT: Teilprojekt Biotests 2016, Kienle et al., 2017).

Die Analyse der Genexpression von spezifischen Biomarker-Genen, als ergänzenden Endpunkt zum standardisierten „Fish early life stage toxicity-Test“, kann als erfolgreich eingestuft werden. Das Effektspektrum wird enorm erhöht und im Vergleich zu den klassischen makroskopischen bzw. histopathologischen Endpunkten können diese zellulären Antworten, wie oxidativer Stress, Biotransformation, endokrine Wirkung oder Effekte auf das Immunsystem noch ergänzend erfasst werden, was die Aussagekraft des Tests erhöht.

4 ARBEITSPAKET 2:

Effektmonitoring in Oberflächengewässern vor und nach ARA-Abwassereintrag in freilebenden Bachforellen und *in-vitro* Fischzellen

Dieses Teilprojekt wurde im Rahmen des Ecolmpact-Projektes (Stamm et al., 2017) durchgeführt, um die potentiellen Effekte von ARA-Abwässern, insbesondere die Wirkung auf Bachforellen, zu untersuchen.

4.1 Hintergrund:

Zahlreiche Mikroverunreinigungen gelangen über Abwasserreinigungsanlagen (ARAs) in die Gewässer. ARAs sind vor allem auf die Entfernung von Nährstoffen aus dem Klärwasser ausgerichtet, biologisch schwer abbaubare Mikroverunreinigungen passieren diese meist ungehindert. Das Projekt „Ecolmpact: Impact of Micropollutants on Aquatic Ecosystems“ untersucht die Auswirkungen von ARA-Abwässern auf das Ökosystem von Oberflächengewässern. Phase I (2013-15) fokussiert auf den gegenwärtigen Ist-Zustand, Phase II soll die Veränderungen, die durch die künftige Aufrüstung der ARAs erfolgen können, dokumentieren. Bisher beschränkten sich die Untersuchungen auf Wirbellose, Mikroorganismen und Pflanzen. Dieses Projekt sollte dazu dienen, die Auswirkungen von ARA-Abwässern auf Fischpopulationen mit Fokus auf die Bachforelle zu untersuchen.



4.2 Zielsetzung:

In Arbeitspaket 2 ging es darum ein sensitives Biomarker-Genset für die Bachforelle (*Salmo trutta*), eine lokale Salmonidenart in der Schweiz, und für die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) zu etablieren, um die potentiellen Effekte von ARA-Abwässern hinsichtlich der Wirkung von Mikroverunreinigungen, wie Pharmaka und Pestizide, auf Forellen untersuchen zu können. In einem Pilotprojekt des Oekotoxenzentrums wurde ein Biomarkerset bestehend aus ca. 20 spezifischen Genen, welche verschiedene zelluläre Stressantworten, wie allgemeiner Stress, Metall- und oxidativer Stress, Biotransformation, Immunregulation usw. reflektieren, zusammengestellt. Die Regulation solcher Gene wurde im Leber- und Nierengewebe in Bachforellen analysiert, welche ober- und unterströmig von ARAs gefangen wurden. Neben der Analyse der Biomarker-Gene wurden zusätzlich verschiedene Fischgesundheitsindikatoren (Histopathologie, Krankheits- und Parasitenbefall) und Wasserqualitätsparameter bestimmt. Diese Ergebnisse wurden im Kontext interpretiert und dienten als Verifizierung der Genexpressionsresultate.

Des Weiteren sollten dieselben Biomarker vergleichend in einer *in vitro*-Methode mit permanenten Zelllinien der Regenbogenforelle (Kieme, Leber) untersucht werden, um eine tierfreie Alternative für diese Art der Gewässerüberwachung zu etablieren. Die Zelllinien wurden direkt im Labor mit Wasserproben, die an den Feldstandorten gewonnen wurden, exponiert. Die anschliessend in diesen Zellen gemessene Expression der Gene wurde mit der Expression der ober- und unterströmig gefangenen Bachforellen und der chemischen Analytik verglichen.

Entsprechend des Antrages sollten drei verschiedene Flüsse, oberhalb und unterhalb eines ARA-Einlasses, untersucht werden. Die Auswahl der Gewässer erfolgte anhand der bereits erhobenen Daten aus dem EcolImpact-Projekt.

4.3 Änderungen zum Antrag:

Arbeitspaket 3 konnte entsprechend der Planung nicht durchgeführt werden (siehe Einleitung). Dieser Teil des Projektes wurde durch eine Erweiterung von Arbeitspaket 2 ersetzt. Es wurden zusätzlich zwei Gewässeruntersuchungen durchgeführt an Standorten wo eine Aufrüstung der ARA erfolgte. Dadurch war die einmalige Möglichkeit gegeben, eine direkte Erfolgsmessung bzw. einen Vergleich zwischen vor und nach der Aufrüstung anzustellen.

4.4 Material und Methoden

4.4.1 Auswahl der Biomarker-Gensets für die Feldbeprobungen

Da das Belastungsprofil bei Freilandversuchen viel diverser ist als bei standardisierten Versuchen wie z.B. im ARA-Neugut Projekt von Arbeitspaket 1, war die Gewichtung der zu erfassenden zellulären Endpunkte gleich verteilt. Die ausgewählten 20 Biomarker-Gene sind in Tabelle 13 aufgeführt.



Tabelle 13: Biomarker-Genset für Freilandversuche

Zelluläre Funktionen	Markergen	Spezifische Funktion
Allgemeine Stressantwort	HSP70 (Hitzeschockprotein 70)	Bewahrung der Proteinintegrität, Hitze-stress
	ABCB1 (ABC-Transporter B1, P-glycoprotein, MDR1)	Xenobiotika-Transport
	PXR (Pregnan-X-Rezeptor)	Kernrezeptor, Aktivierung von Entgiftungs-enzymen
Zellzyklus /Apoptose/ Karzinogenese	p53 (Tumorsuppressor p53)	Apoptose-Regulierung, DNA-Reparatur, Zellzyklusregulierung
	C-myc (Protoonkogen)	Krebsmarker, Apoptose-Marker
	C-fos (Protoonkogen)	Krebsmarker, Apoptose-Marker
Biotransformation	CYP1A (Cytochrom P450 1A)	Schadstoffmetabolismus Phase1: vorrangige Metabolisierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen
	CYP3A (Cytochrom P450 3A)	Schadstoffmetabolismus Phase1: Metabolisierung von Xenobiotika und Arzneimitteln
	GST (Glutathion-S-Transferase)	Schadstoffmetabolismus Phase2; Bindung von Glutathion an Xenobiotika
Immunregulation/ Pathogenabwehr	TNF α (Tumornekrosefaktor-alpha)	Regulierung von Immunzellen (Zytokin), Apoptose, Zellproliferation
	Socs3 (Suppressor of cytokine signaling 3)	Zytokin-Rezeptor: induziert verschiedene Zytokinen
	IL-1beta (Interleukin-1beta)	Zytokin: Entzündungsmediator
Endokrine Wirkung	VTG (Vitellogenin)	Eidotter-Vorläuferprotein: Östrogen bzw. Xenoöstrogen reguliert
	ER α (Estrogenrezeptoren alpha)	Steroidrezeptor: durch Östrogen bzw. Xenoöstrogen aktiviert
Metall und oxidativer Stress	MTa (Metallothionein A)	Bindung von Schwermetallen,
	MTb (Metallothionein B)	Bindung von Schwermetallen
	Hmox (Hämoxigenase)	Sensitive gegenüber oxidativen Stress, Hypoxie und Schwermetallen
	Abcc2 (ABC-Transporter C2, MRP2)	Transport von Metall-Glutathion-Komplexen (GSH)
	NrF2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)	Transkriptionsfaktor: Regulation von antioxidativen Signalwegen
Metabolismus	PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase)	wichtigstes Enzym der Gluconeogenese, sensitiv gegenüber Glucocorticoid-Hormonen
Housekeeping-Gen, Referenzgen	18s EF1alpha	Nicht-regulierte und konstitutiv exprimierte Gene

4.4.2 Identifizierung der genetischen Sequenzen für die Bachforelle

Dieser Teil wurde bereits in der Pilotstudie von 2012 durchgeführt (Fischer et al., 2014) und ist in diesem Bericht zum besseren Verständnis miteingefügt worden.

Die Bachforelle ist im Vergleich zur Regenbogenforelle kein Standardtestorganismus. Das Genom ist bisher nicht sequenziert und es sind nur wenige Sequenzdaten auf den entsprechenden Datenbanken hinterlegt. Organismus-spezifische Sequenzen sind essentiell um geeignete Primer für die quantitative PCR-Analyse (qPCR) zu generieren. In den Datenbanken waren nur spezifische Bachforellensequenzen für die Gene IL-1beta, p53, ERalpha, VTG (nur genomische Sequenz) und für die Referenzgene 18s RNA und EF1alpha vorhanden. Dementsprechend mussten die Sequenzen der restlichen Gene experimentell ermittelt werden. Dafür wurden die Datenbanken erneut durchsucht um homologe Sequenzen von eng verwandten Fischarten, welche der Familie der Lachsfische (Salmonidae) angehören, z.B. Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) oder Atlantischer Lachs (*Salmo salar*), zu erhalten. Für jedes Gen waren mindestens zwei homologe Sequenzen vorhanden. Mit Hilfe dieser Sequenzen wurde ein Alignment (Sequenzabgleich) durchgeführt um hoch konservierte Sequenzbereiche zu ermitteln. Gegen diese Bereiche wurden dann Primer generiert um spezifische Bachforellen-DNA-Fragmente mittels PCR zu amplifizieren. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einen Plasmidvektor kloniert und sequenziert. Die erhaltenen Bachforellen-Sequenzen (Tabelle 14)



zeigen eine hohe Übereinstimmung (95-100%) mit entsprechenden Orthologen von verwandten Arten. Dies bestätigt die Identität dieser Gene in der Bachforelle. Demnach konnten spezifische Primer für die qPCR-Analyse generiert werden. Des Weiteren können diese Sequenzen als eine wichtige Basis für weitere Studien dienen, da die Bachforelle nicht zu den klassischen Modell-Organismen gehört und spezifische Nukleotidsequenzen für viele Gene nicht bekannt sind.

Tabelle 14: Übersicht der experimentell ermittelten Bachforellensequenzen

Markergene der Bachforelle	DNA-Fragmentlänge (bp =Basenpaare)	Höchste Sequenzhomologie nach NCBI-Blast Analyse
Socs3	639 bp (volle Länge)	98 % Socs3 Regenbogenforelle
TNFa	740 bp (volle Länge)	95 % TNFa Regenbogenforelle
Abcb1a	584 bp (partiell)	98 % Abcb1 Regenbogenforelle
Abcc2	573 bp (partiell)	98 % Abcc2 Regenbogenforelle
Hsp70	784bp (partiell)	97 % Hsp70 Atlantischer Lachs
Cyp1A	101 bp (partiell)	100 % Cyp1A Regenbogenforelle
Cyp3A	746 bp (partiell)	98 % Cyp3A Atlantischer Lachs
GST	469 bp (partiell)	99% GST Atlantischer Lachs
NrF2	575 bp(partiell)	99% NrF2 Atlantischer Lachs
PXR	584 bp (partiell)	97 % PXR Regenbogenforelle
PEPCK	375 bp (partiell)	99% PEPCK Atlantischer Lachs
C-myc	570 bp (partiell)	97 % C-myc Regenbogenforelle
C-fos	581 bp (partiell)	95 % C-fos Masu-Lachs (<i>Oncorhynchus masou</i>)
MTa	327 bp (volle Länge mit 3' und 5' UTR)	99% MTa Atlantischer Lachs
MTb	303 bp (volle Länge mit 3' und 5' UTR)	99% MTb Atlantischer Lachs
Hmox	545 bp (partiell)	99 % Hmox Atlantischer Lachs

4.4.3 Fischbeprobung

Pro Gewässer wurden mittels Elektrofischen jeweils 12-14 juvenile Bachforellen oberhalb und unterhalb des ARA-Abwassereinlasses gefangen. Die Fische wurden mittels MS-222 (3-Aminobenzoesäure-Ethylester-Methanesulfonat) euthanasiert und Gewicht und Länge bestimmt. Für die Genexpressionsanalyse wurden Gewebe von Leber und Niere entnommen, zusätzlich wurden Proben vom Gehirn-, Kiemen-, Fett und Muskelgewebe entnommen. Die Gewebeproben wurden direkt am Standort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert um eine Degradierung von Nukleinsäuren zu vermeiden. Die weitere Lagerung erfolgte in einem -80 °C Gefrierschrank.

4.4.4 Fischgesundheitsparameter

Jeder gefangene Fisch wurde auf folgende Gesundheitsparameter hin untersucht. Diese Untersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe von Helmut Segner (Universität Bern) durchgeführt. Die Auswerteparameter folgen der Studie von Hostetter et al. (2011).

Externe Kriterien:

- Gewicht, Länge, Konditionsindex
- Lebersomatischer Index, Milz-somatischer Index
- Verletzungen, Abschürfungen
- Verlust von Schuppen
- Veränderte Färbung
- Flossenschäden
- Ektoparasiten an Haut und Kiemen



Interne Kriterien:

- Histopathologie von Leber und Niere
- Nachweis von Krankheitserregern mittels PCR/Kultur
- Parasitär: *Tetracapsuloides bryosalmonae* (PKD)
- Viral: VHS-(*viral hemorrhagic septicemia*) virus
- Bakteriell: *Aeromonas salmonicida* (Furunkulose)

4.4.5 Chemisch-analytische Bestimmung der Wasserqualität

An allen Standorten wurden wöchentlich über einen Zeitraum von vier Wochen Wasserparameter (pH, Leitfähigkeit, Sauerstoffgehalt, Temperatur und Fließgeschwindigkeit) gemessen und Wasserproben für Metallanalytik, Nährstoffanalyse, Östrogenaktivität und Zellkulturtests entnommen.

Zusätzlich wurden Wassersammelproben mittels ISCO-Samplern kontinuierlich über 7 Tage von allen Standorten entnommen. Die Proben wurden für die Analyse der organischen Mikroverunreinigungen verwendet (Uchem, Eawag). In Anlehnung an das EcoImpact-Projekt wurden die Konzentrationen von 57 organischen Mikroverunreinigungen untersucht, welche am häufigsten in Gewässern der Schweiz detektiert werden.

4.4.6 ER-CALUX

Für die Quantifizierung der östrogenen Belastung im Gewässer wurde begleitend der ER-CALUX® Test durchgeführt (Oekotoxzentrum). Der ER-CALUX®-Test wird mit einer menschlichen Zelllinie (U2OS-Era) durchgeführt. Es ist ein Rezeptorbindungs-Test zum Nachweis verschiedener Östrogen-wirkenden Substanzen. Bindet eine östrogen aktive Substanz an den Rezeptor in der Zelle, wird daraufhin das entsprechende Gen abgelesen und im Anschluss auch das Reportergen. Dieses Gen kodiert für ein Enzym (Luciferase), das Luciferin unter Erzeugung von Licht umsetzt. Die Leuchtintensität korreliert direkt mit der Menge der an den Rezeptor gebundenen Substanz. Eine detaillierte Beschreibung kann in der Publikation Van Der Linden et al., (2008) nachgelesen werden.

4.4.7 Primer-Design und Testung

Siehe 3.4.3

4.4.8 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Siehe 3.4.4

4.4.9 Genexpressionsanalyse

Siehe 3.4.5

4.4.10 Bestimmung des Vitellogenin-Protein-Gehalts im Lebergewebe

Diese Tests wurden in Kooperation mit der Firma TecoMedical (Sissach, Schweiz) durchgeführt. Dafür wurde ein „Ultra Sensitive Salmonid Vitellogenin ELISA-Kit“ etabliert (<http://www.tecomedical.com/de/oekotoxikologie/Ultra-Sensitive-Salmonid-Vitellogenin-ELISA-TECO>). Für die Standorte Steinach, Herisau, Ellikon und Elgg wurden Leberproben an TecoMedical geschickt, welche von der Firma selbst analysiert wurden. Zusätzlich wurde von den



Fischen aus Ellikon und Elgg noch zusätzlich Mucus (Hautschleimproben) genommen, welche ebenfalls von der Firma TecoMedical analysiert wurden.

4.4.11 Statistik

Siehe 3.4.6

4.5 Standortauswahl

Anhand von Vorergebnissen aus dem EcolImpact-Projekt wurden drei Standorte mit unterschiedlichen Kriterien (Pestizidbelastung, Endokrine Effekte oder Ergebnisse des SPEAR Index) ausgesucht. Dabei war das wichtigste Auswahlkriterium, dass kein zusätzlicher Abwasserzulauf oberhalb der zu beprobenden Abwasserreinigungsanlage vorhanden war, der die Ergebnisse beeinträchtigen könnte.

Es wurden folgende Standorte ausgewählt:

1. Fluss Glatt, Herisau, Appenzell-Ausserrhoden

Ergebnisse aus dem EcolImpact-Projekt zeigten erhöhte Pestizidbelastungen (Grünalgentest) und erhöhte Östrogenaktivität (ER-Calux-Test) in der Glatt unterhalb der ARA-Bachwis im Vergleich zu oberhalb. Des Weiteren wurde die ARA-Bachwis im Sommer 2015 mit einer PAK (Pulveraktivkohle)-Stufe aufgerüstet um effizienter Mikroverunreinigungen zu entfernen. Innerhalb des Projektes ergab sich die einzigartige Möglichkeit, direkt vor der Aufschaltung der PAK-Stufe und etwa ein Jahr danach die Fischbeprobungen durchzuführen. Somit konnte der Test auch als Erfolgskontrolle eingesetzt werden.

Durchführung der Fischbeprobung Herisau:

- 05.2015 Vor der Aufrüstung mit der PAK-stufe
- 06.2016 ein Jahr nach der Aufschaltung der PAK-Stufe (Ersatz für Arbeitspaket 3)

Probestelle	Koordinaten
Herisau, Oberhalb	737841 / 250776
Herisau, Unterhalb	737387 / 250988

2. Fluss Älikerbach, Ellikon an der Thur, Zürich

Ergebnisse aus dem EcolImpact-Projekt zeigten grössere Unterschiede bei den durchgeführten Biotests zwischen Oberhalb und Unterhalb der ARA Ellikon. Ausserdem wurden bei durchgeführten Zebraärlings-Embryo-Tests leichte toxische Effekte, mit Wasserproben von Unterhalb der ARA, erfasst. Ein weiterer Grund für Ellikon war der geplante Umbau der ARA, das gereinigte Abwasser sollte nicht mehr in den Älikerbach eingeleitet werden, sondern direkt in die Thur. Die Fertigstellung des Umbaus war für Mitte 2016 geplant. Daher sollte eine Fischbeprobung vor und ein Jahr nach dem Umbau durchgeführt werden (die zweite Beprobung war als Ersatz für Arbeitspaket 3 geplant). Durch bauliche Verzögerungen war der Umbau bis Ende 2016 noch nicht fertiggestellt und die geplante Zweitbeprobung konnte nicht realisiert werden.

Durchführung der Fischbeprobung Ellikon:

- 10.2015

Probestelle	Koordinaten
Ellikon, Oberhalb	47°34'12.47"N / 8°49'30.54"E
Ellikon, Unterhalb	47°34'6.79"N / 8°49'44.39"E



3. Fluss Eulach, Elgg, Zürich

Vorversuche mit Wasserproben von Oberhalb und Unterhalb der ARA-Elgg zeigten verstärkte toxische Effekte Unterhalb in durchgeführten Zebrabärlings-Embryo-Tests und Fischzelllinien-Tests.

Durchführung der Fischbeprobung Elgg:

- 10.2015

Probestelle	Koordinaten
Elgg Oberhalb	47°30'1.73"N / 8°51'12.96"E
Elgg, Unterhalb	47°30'4.43"N / 8°51'5.65"E

4. Fluss Steinach, St. Gallen

Dieser Standort gehört nicht zu den EcolImpact-Standorten wurde aber in dieses Projekt mit aufgenommen, da die Zweitbeprobung am Standort Ellikon durch bauliche Verzögerungen nicht möglich war. An diesem Standort wurde 2012 eine Pilotstudie durchgeführt, um den Einsatz von molekularen Biomarkern in wildgefangen Bachforellen zu testen. Der Standort war sehr geeignet da die Grenzwerte für Mikroverunreinigungen, Unterhalb der ARA- St. Gallen-Hoffen regelmäßig überschritten wurden. 2014 wurde die Beprobung wiederholt, um die Daten von 2012 zu bestätigen. Mitte 2014 war der Umbau an der ARA fertiggestellt und seitdem wird das gereinigte Abwasser direkt in den Bodensee eingeleitet, um den Fluss Steinach zu entlasten. Um die Entlastung der Steinach zu überprüfen wurde eine weitere Beprobung, ein Jahr nach dem Umbau, durchgeführt. Diese Zweitbeprobung wird als Ersatz für die Zweitbeprobung von Ellikon mit in dieses Projekt integriert.

Durchführung der Fischbeprobung Steinach:

- 03.2014

- 05.2015

Probestelle	Koordinaten
Steinach, Oberhalb	748'299 / 258'641
Steinach, Unterhalb	751'174 / 262'956

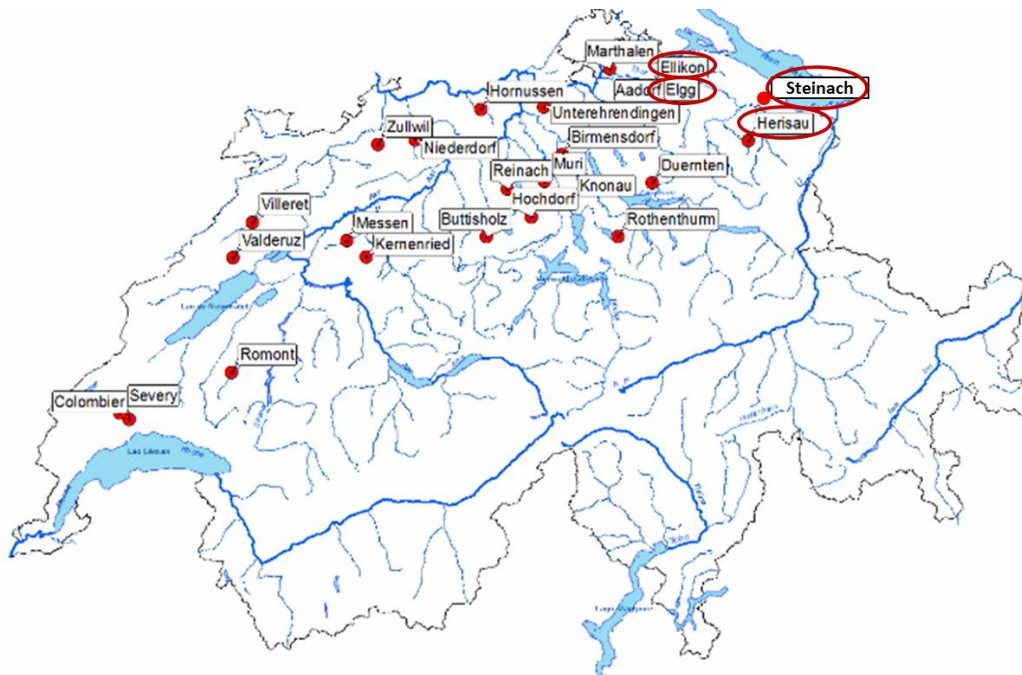


Abbildung 3: Lage der ausgewählten Standorte (mit roter Ellipse markiert) in der Schweiz



Im Folgenden werden die Ergebnisse für jeden Standort einzeln aufgeführt.

4.6 Ergebnisse Steinach (St. Gallen)

An diesem Standort war es möglich die Auswirkungen auf die Bachforellen vor und ein Jahr nach der Beendigung der Abwassereinleitung in den Fluss Steinach zu testen.

Für Steinach werden die einzelnen Resultate von vor (2014) und nach (2015) der Abschaltung des Abwassereinleiters direkt miteinander verglichen.

4.6.1 Feldparameter:

Tabelle 15: Gemessene Feldparameter in der Steinach von Oberhalb und Unterhalb der ARA

Parameter	Steinach 2014		Steinach 2015	
	Oberhalb	Unterhalb	Oberhalb	Unterhalb
Leitfähigkeit ($\mu\text{S/cm}$)	453.50 \pm 30.70	682.50 \pm 147.50*	411.25 \pm 43.79	446.00 \pm 65.39 ^a
pH-Wert	8.29 \pm 0.67	8.20 \pm 0.59	8.30 \pm 0.14	8.29 \pm 0.09 *
Wassertemperatur ($^{\circ}\text{C}$)	7.68 \pm 1.53	10.60 \pm 1.58 *	10.98 \pm 2.29	11.35 \pm 2.65
Sauerstoffgehalt (mg/L)	11.58 \pm 1.09	10.59 \pm 1.21	10.50 \pm 1.16	10.75 \pm 1.46 *

Legende: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Feldmessungen im Fluss Steinach Ober- und Unterhalb der ARA-St. Gallen-Hofen. Die Messung wurde viermal durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt. Signifikante Unterschiede zwischen Unterhalb 2015 und 2016 sind mit ^a markiert und rot hinterlegt.

Leitfähigkeit:

2014 wurde eine signifikant höhere Leitfähigkeit im Wasser Unterhalb der ARA gemessen. Dies deutet auf eine höhere Belastung an diesem Standort im Vergleich zu Oberhalb hin. 2015 waren die Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb nicht mehr gegeben. Ausserdem konnte eine signifikant geringere Leitfähigkeit 2015 Unterhalb im Vergleich zu 2014 Unterhalb gemessen werden. Dies deutet daraufhin, dass durch die Abschaltung des Abwassereinleiters die Belastung Unterhalb deutlich geringer geworden ist.

pH-Wert:

Es konnten in beiden Jahren keine signifikanten Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb gemessen werden.

Wassertemperatur:

2014 konnte eine signifikant erhöhte Wassertemperatur Unterhalb im Vergleich zu Oberhalb der ARA gemessen werden. 2015 war dieser Unterschied nicht mehr gegeben. Dies bestätigt, dass durch den Abwassereinleitungsstopp kein Temperaturgradient zwischen Oberhalb und Unterhalb mehr besteht.

Sauerstoffgehalt:

Es konnten in beiden Jahren keine signifikanten Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb gemessen werden.



4.6.2 Wasserparameter im Labor gemessen

Tabelle 16: Wasserparameter der Steinach von Oberhalb und Unterhalb der ARA im Labor gemessen

Parameter	Herisau 2015		Herisau 2016	
	Oberhalb	Unterhalb	Oberhalb	Unterhalb
Alkalinität (mmol/L)	4.53 ± 0.22	3.17 ± 0.50 *	4.03 ± 0.55	4.28 ± 0.42 ^a
Gesamthärte (mmol/L)	2.37 ± 0.12	2.21 ± 0.10	2.07 ± 0.33	2.24 ± 0.23
Nitrat (mg N/L)	0.89 ± 0.21	14.14 ± 6.45 *	0.79 ± 0.11	1.28 ± 0.48 ^a
o-Phosphat (µg/L)	15.75 ± 10.08	82.83 ± 11.22 *	17.20 ± 5.77	17.70 ± 412 ^a
Chlorid (mg/L)	27.95 ± 1.39	53.99 ± 14.45 *	15.40 ± 6.48	16.55 ± 5.48 ^a
Sulfat (mg/L)	11.77 ± 0.57	46.05 ± 19.32 *	7.00 ± 1.83	8.75 ± 2.22 ^a
DOC (mg/L)	2.26 ± 0.49	4.28 ± 0.25 *	2.60 ± 0.75	2.70 ± 0.26 ^a

Legende: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Wasserprobenanalysen aus dem Fluss Steinach, entnommen von ober- und Unterhalb der ARA-St. Gallen-Hofen. Die Messungen wurden mit vier unabhängigen Wasserproben durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt. Signifikante Unterschiede zwischen Unterhalb 2014 und 2015 sind mit ^a markiert und rot hinterlegt.

Alkalinität und Gesamthärte:

Für die Messung der Gesamthärte konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb der ARA für 2014 und 2015 ermittelt werden. Die Messung der Alkalinität zeigte für 2014 einen signifikant niedrigeren Wert Unterhalb im Vergleich zu Oberhalb. Dies könnte durch das eingeleitete Abwasser hervorgerufen worden sein. 2015 war dieser Unterschied nicht mehr messbar; die Werte zwischen Oberhalb und Unterhalb befanden sich etwa auf dem gleichen Niveau.

Nitrat, o-Phosphat, Chlorid, Sulfat und gelöster organischer Kohlenstoff (DOC):

2014 wurde für alle Substanzen eine signifikant erhöhte Konzentration Unterhalb der ARA gemessen. 2015, nach der Abschaltung des Abwassereinleiters, war dies nicht mehr gegeben. Die Konzentrationen zwischen Oberhalb und Unterhalb waren auf einem sehr vergleichbaren Niveau. Im Vergleich Unterhalb 2014 und 2015 konnte für alle Substanzen eine signifikante Abnahme gemessen werden. Dies zeigt deutlich auf, dass die Nährstoffbelastung durch die Abschaltung Unterhalb reduziert wurde, was zu erwarten war.



4.6.3 Schwermetallanalyse

Tabelle 17: Schwermetallanalyse in der Steinach von Oberhalb und Unterhalb der ARA

Metalle	Steinach 2014		Steinach 2015	
	Oberhalb	Unterhalb	Oberhalb	Unterhalb
Blei (µg/L)	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.05 ± 0.04	0.06 ± 0.05
Cadmium (µg/L)	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01*	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01 ^a
Chrom (µg/L)	0.37 ± 0.11	0.29 ± 0.13	0.60 ± 0.27	0.58 ± 0.31
Mangan (µg/L)	3.82 ± 1.31	3.44 ± 2.47	16.23 ± 8.99	20.13 ± 13.76 ^a
Eisen (µg/L)	120.80 ± 56.92	107.42 ± 46.17	156.49 ± 110.90	178.78 ± 116.27 ^a
Nickel (µg/L)	0.35 ± 0.07	1.29 ± 0.24*	0.63 ± 0.31	0.74 ± 0.25 ^a
Kupfer (µg/L)	2.48 ± 0.88	5.62 ± 0.48 *	2.93 ± 1.87	3.41 ± 1.34 ^a
Zink (µg/L)	0.88 ± 0.46	5.23 ± 1.82 *	0.95 ± 0.50	1.69 ± 0.43 ^a
Kobalt (µg/L)	0.20 ± 0.02	0.33 ± 0.06 *	0.15 ± 0.07	0.17 ± 0.07 ^a

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Schermetallanalysen (ICP-MS) gemessen in filtrierten Wasserproben aus dem Fluss Steinach, entnommen von ober- und Unterhalb der ARA-St. Gallen-Hofen. Die Messungen wurden mit vier unabhängigen Wasserproben durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt. Signifikante Unterschiede zwischen Unterhalb 2014 und 2015 sind mit ^a markiert und rot hinterlegt.

In den Proben von 2014 wurden signifikant erhöhte Konzentrationen für Cadmium, Nickel, Kupfer Zink und Kobalt Unterhalb der ARA im Vergleich zu Oberhalb gemessen. 2015, nach dem Einleitungsstopp, waren diese signifikanten Unterschiede nicht mehr detektierbar. Der Vergleich zwischen Unterhalb 2014 und 2015 zeigte eine signifikante Abnahme der Cadmium-, Nickel-, Kupfer-, Zink- und Kobaltkonzentration. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhten Metallkonzentrationen Unterhalb 2014 durch den Abwassereintrag hervorgerufen wurden. Die erhöhte Konzentration von Mangan Unterhalb 2015 im Vergleich zu 2015 ist höchst wahrscheinlich durch eine unbekannte Eintragsquelle verursacht worden, welche sich Oberhalb der ARA befand. Die Konzentration von Mangan Oberhalb war 2015 signifikant höher als 2014. Zusammenfassend bleibt zu erwähnen, dass sich die Abschaltung des Abwassereinleiters positiv auf die Metallkonzentrationen in der Steinach Unterhalb der ARA ausgewirkt hat.

4.6.4 Analyse von organischen Mikroverunreinigungen

In Zusammenarbeit mit dem Eawag Department Umweltchemie (Uchem) wurden 2014 und 2015 Wassersammelproben über sieben Tage, von Oberhalb und Unterhalb der ARA, generiert. Die Wasserentnahme endete genau an dem Tag der jeweiligen Fischbeprobung (25.03.2014 und 12.05.2015). Diese Sammelproben wurden mit Hilfe eines ISCO-Sampler gewonnen. Die erhalten Wassersammelproben wurden im Labor auf 57 organische Mikroverunreinigungen hin untersucht.



Tabelle 18: Analyse von 57 Mikroverunreinigungen in Wochensammelproben. **Gelb:** Deutliche Abnahme der Konzentration Unterhalb 2014 im Vergleich zu 2015. **Rot:** Zunahme der Konzentration Unterhalb 2015 im Vergleich zu 2014. **Leere Zellen:** Werte <LOQ (Unterhalb der Bestimmungsgrenze) **Fett:** Substanz wurde mit einem strukturidentischen isotoptenmarkierten internen Standard gemessen. Werte ohne eigenen internen Standard haben grössere Unsicherheiten.

Substanzinformation					Concentrations in ng/L					
Wirkstoff	CAS-No	ID	Wirkstoffgruppe	Untergruppe Wirkstoffklasse	LOQ	Steinach Oberhalb 2014	Steinach Unterhalb 2014	Steinach Oberhalb 2015	Steinach Unterhalb 2015	
4-/5-Methyl-Benzotriazol	136-85-6	167	Korrosionsschutzmittel			1	48	>1000	18	100
Amisulprid	71675-85-9	2852	Pharmazeutika	Neuroleptikum		2	4	160		3.8
Atenolol	29122-68-7	169	Pharmazeutika	Beta-blocker		2	4.1	78		1
Atrazin	1912-24-9	288	Pestizid	Herbizid		1	1.7	1.9	2.5	2.7
Azoxystrobin	131860-33-8	89	Pestizid	Fungicide		1				
Benzotriazol	95-14-7	166	Korrosionsschutzmittel			3	69	>1000	29	130
Boscalid	188425-85-6	2938	Pestizid	Fungicide		5				
Candesartan	139481-59-7	2804	Pharmazeutika	Sartan		1	2.8	210	1.9	6.6
Carbamazepin	298-46-4	194	Pharmazeutika	Antiepileptic		4	2.8	240		4.7
Carbendazim	10605-21-7	278	Biozid	Fungicide		0.5	2.9	19	2	10
Chlorpyrifos	2921-88-2	2950	Pestizid	Insecticide		7				
Chlorpyrifos-methyl	5598-13-0	2951	Pestizid	Insecticide		35				
Chlortalon	15545-48-9	273	Pestizid	Herbizid		1				
Citalopram	59729-33-8	2901	Pharmazeutika	Antidepressivum		2.5		55	2.3	3
Clarithromycin	81103-11-9	191	Pharmazeutika	Antibiotic		4.5	4.2	150		4.8
Climbazol	38083-17-9	2739	Personal Care Product			1	1.3	23	0.5	1.2
Clothianidin	210880-92-5	2933	Pestizid	Insecticide		2				
Coffein	58-08-2	303	Tracer			8	860	140	230	150
Cyproconazol	94361-06-5	86	Pestizid	Fungicide		2				
Cyprodinil	121552-61-2	148	Pestizid	Fungicide		0.5				
Diazinon	333-41-5	293	Pestizid	Insecticide		0.5		7		
Diclofenac	15307-86-5	201	Pharmazeutika	Anti-inflammatory		5	13	580		12
Dimethoat	60-51-5	2761	Pestizid	Insecticide		1				
Diuron	330-54-1	292	Biozid	Herbizid		2	11	44	3.6	11
Epoxyconazol	133855-98-8	95	Pestizid	Fungicide		0.5				
Fexofenadin	83799-24-0	3019	Pharmazeutika	Antihistaminikum		4	6	210		4.6
Fipronil	120068-37-3	2666	Pestizid	Insecticide		1				
Gabapentin	60142-96-3	2561	Pharmazeutika	Antiepileptic	200			710		
Hydrochlorothiazid	58-93-5	2610	Pharmazeutika	Diuretic		1	12	720	3.9	16
Imidacloprid	138261-41-3	2709	Pestizid	Insecticide		2		3.3		
Iopromid	73334-07-3	242	Pharmazeutika	Contrast medium	35					
Iprovalicarb	140923-17-7	2936	Pestizid	Fungicide		2				
Irbesartan	138402-11-6	2774	Pharmazeutika	Sartan		2	4.4	290	2.9	9.9
Isoproturon	34123-59-6	286	Pestizid	Herbizid		1.5	0.4	3.4		
Lamotrigin	84057-84-1	2676	Pharmazeutika	antiepileptics		1	1.2	300	1.2	11
Mecoprop	93-65-2	308	Pestizid	Herbizid		5	48	(88)	14	14
Methoxyfenozid	161050-58-4	2935	Pestizid	Insecticide		1				0.7
Metoprolol	37350-58-6	172	Pharmazeutika	Beta-blocker		1		30	1.2	1.7
Metribuzin	21087-64-9	90	Pestizid	Herbizid		0.5				
Oxazepam	604-75-1	2743	Pharmazeutika	Sedativ		4	1.6	94		3.5
Penconazol	66246-88-6	3107	Pestizid	Insecticide		0.7				
Pirimicarb	23103-98-2	2711	Pestizid	Insecticide		7				
Propamocarb	24579-73-5	2945	Pestizid	Fungicide		0.9	0.6	2.3		
Propiconazol	60207-90-1	212	Pestizid	Fungicide		1			1	
Simazin	122-34-9	262	Pestizid	Herbizid		1	1.9	2	1.6	1.5
Sitagliptin	486460-32-6	2903	Pharmazeutika	Antidiabetikum		45		330		
Sucralose	56038-13-2	703	Lebensmittelzusatzstoff	Suessungsmittel		10	51	>1000	26	88
Sulfamethoxazol	723-46-6	298	Pharmazeutika	Antibiotic		2	1.6	100	1.7	5.5
Tebuconazol	107534-96-3	327	Pestizid	Fungicide		2				
Terbutryn	886-50-0	306	Biozid	Herbizid		1.5	1.2	13	3	3.6
Terbutylazin	5915-41-3	284	Pestizid	Herbizid		0.5	1.3	11	1.4	1.5
Thiacloprid	111988-49-9	2954	Pestizid	Insecticide		2				
Thiamethoxam	153719-23-4	2941	Pestizid	Insecticide		6		4		
Torasedid	56211-40-6	3145	Pharmazeutika	Schleifendiuretika		4		42		
Valsartan	137862-53-4	2583	Pharmazeutika	Angiotensin II antagonist		7	33	110	11	12
Venlafaxin	93413-69-5	645	Pharmazeutika	Antidepressant		1	2.3	140	1.2	8.8
Vildagliptin	274901-16-5	3146	Pharmazeutika	Antidiabetikum		2	1.1	50		2.3



Die Analyse der organischen Mikroverunreinigungen zeigt deutlich, dass 2014 ein Grossteil der Substanzen stark erhöhte Konzentrationen Unterhalb der ARA aufwiesen. Die Messungen von 2015, ein Jahr nach der Abschaltung des Abwassereinleiter in die Steinach, zeigten für nahezu alle Stoffe (Tabelle 18, gelb markiert) eine drastische Abnahme der Konzentration Unterhalb der ARA. Für Coffein und Simazin (Pestizid) konnten keine Veränderungen zum Vorjahr gemessen werden. Einzig das Pestizid Methoxyfenozid zeigte 2015 eine höhere Konzentration als 2014. Damit ist eindeutig erwiesen, dass durch den Einleitungsstopp die Belastung mit organischen Mikroverunreinigungen sehr stark reduziert wurde.

4.6.5 Untersuchung des Östrogenen Potentials in den Wasserproben

Mittels dem ER-CALUX –Test wurde das Östrogenpotential in entnommenen Wasserproben von Oberhalb und Unterhalb der ARA-St. Gallen-Hofen untersucht.

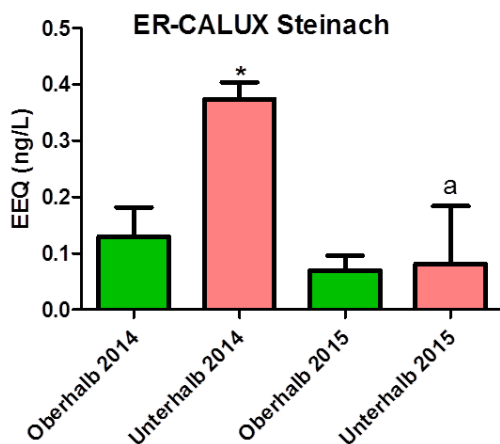


Abbildung 4: ER-CALUX Test durchgeführt mit drei unabhängigen Wasserproben pro Standort ($n=3$). EEQ = Östradiol-Äquivalenz-Konzentration. Signifikanzanalyse wurde mittels *t*-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert. Signifikante Unterschiede zwischen Unterhalb 2014 und 2015 sind mit ^a markiert.

Die Ergebnisse von 2014 zeigen ein signifikant erhöhtes Östrogenpotential in den Wasserproben von Unterhalb der ARA. Nach dem Einleitungsstopp konnten 2015 keine signifikanten Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb mehr gemessen werden. Im Vergleich zwischen Unterhalb 2014 und 2015 konnte 2015 ein signifikanter Rückgang der Östrogenaktivität ermittelt werden. Daher zeigen die Daten deutlich, dass durch die Abschaltung des Einleiters die Belastung mit östrogenaktiven Stoffen signifikant abgenommen hat.

4.6.6 Fischbeprobung

Mittels Elektrofischen wurden 2014 und 2015 zwischen 12 und 14 juvenile Bachforellen pro Standort gefangen und untersucht. In den folgenden Tabellen 19 und 20 sind Geschlecht, Länge, Gewicht und Lebergewicht der gefangenen Fische dargestellt.



Tabelle 19: Übersicht der gefangenen Bachforellen 2014. M = Männchen, F = Weibchen und ? = juveniler Fisch noch keine eindeutigen Geschlechtsmerkmale ausgebildet

Steinach Oberhalb der ARA St. Gallen-Hofen 2014				
Fischnr.	Länge (cm)	Gewicht (g)	Lebergewicht (g)	Sex
1	14.4	32.3	0.70	F?
2	17.2	49.3	0.60	F?
3	18.6	75.5	1.00	M
4	13.5	26.0	0.50	F?
5	17.1	53.7	0.70	F?
6	17.3	49.3	0.50	F
7	16.1	41.5	0.40	F
8	13.9	30.3	0.40	M
9	17.4	51.7	0.50	F
10	16.9	52.5	0.60	M
11	16.1	44.2	0.60	F?
12	15.5	34.8	0.50	F
13	14.0	29.7	0.40	M
Steinach Unterhalb der ARA St. Gallen-Hofen 2014				
1	16.3	41.5	0.60	M
2	18.6	56.5	0.74	F
3	19.2	65.0	0.60	F
4	16.4	43.8	0.50	M?
5	19.2	65.7	0.80	F
6	17.6	57.7	0.65	M
7	16.5	48.0	0.60	M?
8	20.8	90.9	1.00	F
9	16.8	42.3	0.50	M
10	17.7	50.9	0.80	M
11	16.0	39.9	0.60	F?
12	17.4	52.0	0.60	F?
13	18.1	65.9	1.10	M
14	15.0	33.7	0.50	F?



Tabelle 20: Übersicht der gefangenen Bachforellen 2015. M = Männchen, F = Weibchen und j = juveniler Fische noch keine eindeutigen Geschlechtsmerkmale ausgebildet

Steinach Oberhalb der ARA St. Gallen-Hofen 2015				
Fischnr.	Länge (cm)	Gewicht (g)	Lebergewicht (g)	Sex
1	14.0	26.4	0.27	M
2	13.9	24.1	0.23	M
3	14.6	29.0	0.28	F
4	14.9	29.9	0.27	M
5	14.4	28.0	0.35	M
6	12.1	17.4	0.17	M
7	17.0	47.9	0.47	M
8	13.7	25.7	0.27	F
9	14.6	31.1	0.37	F
10	13.4	23.1	0.31	F
11	13.9	25.2	0.25	M
12	11.7	15.0	0.17	F
Steinach Unterhalb der ARA St. Gallen-Hofen 2015				
1	10.7	12.6	0.16	?
2	13.3	23.4	0.42	F
3	13.7	27.1	0.38	F
4	16.0	38.4	0.45	M
5	12.1	17.8	0.15	M
6	15.9	39.0	0.50	M
7	10.9	13.1	0.15	F
8	15.2	36.6	0.38	?
9	12.1	17.3	0.16	M
10	15.6	29.3	0.29	M
11	12.9	22.7	0.27	F
12	15.4	38.8	0.45	M



Quantitative Aussagen über die Geschlechterverteilung sind anhand der geringen Anzahl der Fische nicht möglich. Aussagen über einen möglichen Einfluss der Umweltbedingungen auf Wachstum und Körperlänge (Konditionsindex) werden im Punkt 4.6.8 Fischgesundheit betrachtet.

4.6.7 Vitellogenin (VTG)-Proteingehalt im Lebergewebe

Als weiterer Marker für den Einfluss von östrogenaktiven Substanzen wurde die Vitellogenin-Proteinkonzentration im Lebergewebe von männlichen und juvenilen Fischen bestimmt. VTG wird unter Normalbedingungen nur in geschlechtsreifen Weibchen und nicht in juvenilen oder männlichen Fischen exprimiert. Es wird aber im Beisein von östrogenaktiven Substanzen auch in diesen Tieren induziert und kann daher als Marker verwendet werden. Die Induktion von VTG kann in männlichen und juvenilen Fischen zur Verweiblichung führen (Jobling et al., 2002 und Kidd et al., 2007) und somit einen Einfluss auf die Population haben.

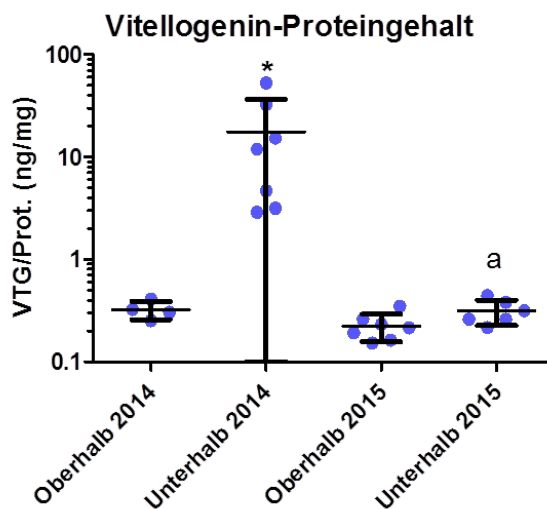


Abbildung 5: Dargestellt ist der Proteingehalt von Vitellogenin pro mg Gesamtprotein gemessen im Lebergewebe von männlichen und juvenilen (nur mit M? markiert, siehe Tabelle 19 und 20) Fischen (2014 Oberhalb n=4, 2014 Unterhalb n=7, 2015 Oberhalb n=7 und 2015 Unterhalb n=6). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert. Signifikante Unterschiede zwischen Unterhalb 2014 und 2015 sind mit a markiert.

Die Ergebnisse von 2014 zeigen einen signifikant erhöhten Vitellogeningehalt in den Lebergeweben der Fische von Unterhalb der ARA. Dies weist eindeutig auf eine erhöhte Belastung mit östrogenaktiven Substanzen an diesem Standort hin. Dieses Ergebnis wird durch die ER-CALUX Daten bekräftigt. 2015 ist kein Unterschied zwischen Oberhalb und Unterhalb mehr vorhanden. Im Vergleich zwischen Unterhalb 2014 und 2015 konnte ein signifikanter Rückgang des VTG-Proteingehalts detektiert werden. Auch dieses Ergebnis wird von den ER-CALUX Daten (Abbildung 5) unterstützt.

4.6.8 Fischgesundheit

Die Untersuchungen zur Fischgesundheit wurden von der Arbeitsgruppe Helmut Segner (Universität Bern) durchgeführt. In diesem Bericht werden die wichtigsten Schlussfolgerungen präsentiert, welche aus den einzelnen Gesundheitsberichten entnommen wurden. Die vollständigen Gesundheitsberichte sind im Anhang enthalten.



Zusammenfassung Fischgesundheit 2014:

Insgesamt waren bezüglich Fischgesundheit zwischen den verschiedenen Standorten zwar deutliche Unterschiede erkennbar, die gefundenen Veränderungen waren jedoch allesamt leicht- bis mittelgradig. Am auffälligsten waren die für die beiden Steinach-Gruppen in der Histologie gefundenen Hinweise auf eine überlebte PKD-Infektion. Dieser Verdacht konnte mittels PCR bestätigt werden. Der Befund deutet darauf hin, dass die besagten Gewässerabschnitte vermutlich eine recht hohe Dichte an mit *Tetracapsuloides bryosalmonae* infizierten Bryozoen aufweisen. Der Grund für die zwischen den beiden Steinach-Standorten unterschiedlich stark ausgeprägten PKD-bedingten Nierenveränderungen könnte in den unterschiedlichen Wassertemperaturen liegen: genau wie bereits 2012 (Pilotstudie Oekotoxzentrum, Fischer et al., 2014), war die Wassertemperatur am Standort „Steinach, Unterhalb ARA“ deutlich höher als am Standort „Steinach, Oberhalb ARA“ (am 25.03.2014 ca. 2 °C). Bei höheren Wassertemperaturen sollte die Regeneration der Nieren schneller ablaufen, was die weiter fortgeschrittene Nierenregeneration in der Gruppe „Steinach, Unterhalb ARA“ erklären könnte. Die in der Gruppe „Steinach, Unterhalb ARA“ bei 7 Tieren nachgewiesenen Bakterieninfektionen könnten darauf hindeuten, dass die Tiere in dieser Gruppe stärker vorbelastet oder gestresst waren; vorbelastete/gestresste Tiere sind in der Regel anfälliger für Infektionen mit fakultativ pathogenen Keimen. Es ist jedoch auch denkbar, dass aufgrund des Kläranlagenabwassers am Standort „Steinach, Unterhalb ARA“ eine höhere Keimdichte herrscht. Die an diesem Standort vorherrschende höhere Wassertemperatur könnte ein vermehrtes Keimwachstum zusätzlich begünstigen. Die in den Nieren der Fische aus der Gruppe „Steinach, Unterhalb ARA“ vermehrt gefundenen degenerierten Tubuli und Glomeruli könnten ebenfalls mit ARA-bedingten Gewässerverunreinigungen in Verbindung stehen. Der Nährzustand der Tiere war in den beiden Steinach-Gruppen überwiegend gut: fast alle Tiere wiesen viel periviszerales Fett auf und hatten einen gut gefüllten Magen/Darm-Trakt. Dies lässt darauf schliessen, dass diese beiden Standorte in Bezug auf Nährtiere etwa gleich gut waren. Konditionsindex (KI) und Lebersomatischer Index (LSI) waren in allen zwei Gruppen vergleichbar. Es ist jedoch zu beachten, dass die Grössen- und Gewichtsunterschiede der Fische zwischen den verschiedenen Standorten teilweise recht gross waren. Dies erschwert die Interpretation von KI und LSI. Es bleibt zu erwähnen, dass es sich bei den beschriebenen Beprobungen um „Momentaufnahmen“ mit relativ geringen Stichprobengrössen handelt. Die Resultate und Schlussfolgerungen sind deshalb mit Vorsicht zu bewerten. Um zuverlässigere Aussagen machen zu können, müssten über einen längeren Zeitraum hinweg Fische beprobt und Wasserparameter überwacht werden.

Zusammenfassung Fischgesundheit 2015 und Vergleich mit 2014:

Wie in den Vorjahren, waren die auffälligsten Befunde für die beiden Steinach-Gruppen die in der Histologie gefundenen Hinweise auf eine überlebte PKD-Infektion. Dieser Verdacht konnte mittels PCR bestätigt werden. Der Befund deutet darauf hin, dass die besagten Gewässerabschnitte höchstwahrscheinlich nach wie vor eine recht hohe Dichte an mit *T. bryosalmonae* infizierten Bryozoen aufweisen.

Der Grund für die zwischen den beiden Steinach-Stellen unterschiedlich stark ausgeprägten PKD-bedingten Nieren- und Leberveränderungen ist vermutlich wie in den Vorjahren die unterschiedliche Wassertemperatur an den beiden Standorten: Wie bereits 2012 und 2014, war die Wassertemperatur am Standort „Steinach Unterhalb ARA“ höher als am Standort „Steinach Oberhalb ARA“ (am 12.05.2015 ca. 0.8 °C). Bei höheren Wassertemperaturen sollte die Regeneration schneller ablaufen, was die weiter fortgeschrittene Nieren- und Leberregeneration in der Gruppe „Steinach, Unterhalb ARA“ erklären könnte. Die in beiden Gruppen bei der Mehrzahl der Tiere nachgewiesenen Bakterieninfektionen mit teilweise fakultativ pathogenen Umweltkeimen könnten darauf hindeuten, dass die Tiere kürzlich vermehrt unbestimmten Stressfaktoren ausgesetzt gewesen sein könnten; vorbelastete/gestresste Tiere sind in der Regel anfälliger auf Infektionen mit fakultativ pathogenen Keimen. Ein möglicher Stressor könnte das Ende April (also gut zwei Wochen vor den Probennahmen) in der Steinach aufgetretene Hochwasser gewesen sein (am 28.04.2015 lag die durchschnittliche Tagesabflussmenge bei 7.23 m³/s (langjähriges Mittel: 0.77 m³/s). Der Maximalwert für diesen Tag lag sogar bei 24.0 m³/s!):



Solche Ereignisse sind insbesondere für junge Fische üblicherweise mit grossem Stress verbunden. Verglichen mit dem Vorjahr war der Nährzustand der Tiere in beiden Steinach-Gruppen weniger gut. Ein Grund dafür könnten die allgemein tieferen Wassertemperaturen sein, die im Winter/Frühling 2015 geherrscht haben: Verglichen mit 2014, war die mittlere monatliche Wassertemperatur in den Monaten Januar bis April zwischen 1.3 und 2.4 °C kälter. Dies könnte dazu geführt haben, dass die Tiere ihre Reserven stärker aufbrauchen mussten, weil aufgrund der kühleren Temperaturen weniger Nährtiere als im Vorjahr vorhanden waren. Der Nährzustand der Fische am Standort „Steinach Unterhalb ARA“ war jedoch grundsätzlich etwas besser als derjenige der Fische, die von Oberhalb der ARA stammten. Grund hierfür könnte wiederum die am Standort „Steinach Unterhalb ARA“ vorherrschende wärmere Wassertemperatur sein: Dadurch könnten die oben beschriebenen negativen Effekte des kalten Winters etwas abgemildert worden sein. KI und LSI waren in beiden Gruppen vergleichbar und lagen mehr oder weniger im Normalbereich. Es muss jedoch auch erwähnt werden, dass die Grössen- und Gewichtsunterschiede der Fische zwischen den verschiedenen Standorten teilweise recht gross waren. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass eventuell nicht alle beprobten Fische derselben Altersklasse entstammten.

4.6.9 Biomarker-Genexpression

Im Folgenden werden die Ergebnisse entsprechend der zellulären Funktionen der Gene präsentiert. Dargestellt ist der direkte Vergleich zwischen der Genexpression im Lebergewebe von 2014 und 2015. Die Expressionsdaten von den Nierengeweben werden wegen zu geringer Aussagekraft nicht im Einzelnen dargestellt, aber in der Principal Component Analyse (PCA)-Analyse zusammengefasst.



4.6.9.1 Allgemeiner Stress

Tabelle 21: Biomarker-Gene für allgemeinen Stress

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2014	Expression in der Leber 2015
<p>HSP70</p> <p>- 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2015 keine Unterschiede</p>		
<p>Abcb1</p> <p>- 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2015 keine Unterschiede</p> <p>-2015 generell höhere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2014</p>		
<p>PXR</p> <p>- 2014 und 2015 keine Unterschiede</p>		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2014 n= 13, 2015 n=12 und Unterhalb der ARA 2014 n=14, 2015 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Für **HSP70** wurde 2014 eine signifikant höhere Expression in der Fischgruppe von Unterhalb der ARA gemessen. 2015 war dieser Unterschied zwischen Oberhalb und Unterhalb nicht mehr messbar. Da HSP70 vor allem sensitiv gegenüber Hitzestress reguliert wird, korreliert dieses Ergebnis gut mit der signifikant erhöhten Wassertemperatur Unterhalb der ARA 2014 (siehe 4.6.1). 2015, ein Jahr nach dem Einleitungsstopp, war der Temperaturunterschied zwischen Oberhalb und Unterhalb viel geringer und dies wird auch von den HSP70 Ergebnissen wieder gespiegelt.

Abcb1 zeigte 2014 eine signifikant erhöhte Expression in der Fischgruppe von Unterhalb der ARA im Vergleich zu den Fischen von Oberhalb. 2015 war diese unterschiedliche Regulierung zwischen den Fischgruppen nicht mehr messbar. Dies spiegelt die generell erhöhten Konzentrationen der verschiedenen organischen Verbindungen (siehe 4.6.4) von Unterhalb 2014 wieder, welche potentielle Substrate dieses „universalen Xenobiotika-Transporters“ darstellen.

2015 konnten viel geringere Konzentrationen dieser Stoffe Unterhalb gemessen werden: Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den entsprechenden Expressionsdaten.

PXR zeigte in beiden Jahren keine signifikante Regulierung der Expression. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, insofern PXR als Kernrezeptor die Regulation von Entgiftungsenzymen steuert und eine höhere Schadstoffbelastung Unterhalb der ARA 2014 gefunden wurde.



4.6.9.2 Zellzyklus /Apoptose/ Karzinogenese

Tabelle 22: Biomarker-Gene Zellzyklus, Apoptose und Karzinogenese

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2014	Expression in der Leber 2015
<p>p53</p> <p>- 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2015 keine Unterschiede</p>		
<p>C-fos</p> <p>- 2014 und 2015 keine Unterschiede</p> <p>- 2015 generell höhere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2014</p>		
<p>C-myc</p> <p>- 2014 signifikant niedrigere Expression Unterhalb</p> <p>- 2015 keine Unterschiede</p>		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysiertem Fisch. Oberhalb der ARA ,2014 n= 13, 2015 n=12 und Unterhalb der ARA 2014 n=14, 2015 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Eine signifikant erhöhte **p53** Expression konnte 2014 in den Lebern der Gruppe Unterhalb der ARA gegenüber Oberhalb gemessen werden. 2015 war dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar. p53 ist ein sensibler Apoptose-Marker - die Ergebnisse von 2014 könnten mit der erhöhten bakteriellen Belastung der Fische von Unterhalb der ARA in Zusammenhang stehen (siehe Fischgesundheit 4.6.8) oder durch einen erhöhten Eintrag von genotoxisch wirkenden Stoffen (siehe 4.6.4) hervorgerufen worden sein. Mit dem Einleitungsstopp nahm auch die Konzentration dieser Stoffe in der Steinach Unterhalb ab. Interessanterweise korrelieren die Ergebnisse nicht mit den stärkeren Leberschäden in der Gruppe Oberhalb welche durch PKD-Infektion hervorgerufen wurden (siehe 4.6.8), da diese ebenfalls eine Induktion der Genexpression von p53 hervorrufen könnten.



Für **C-fos** konnten in beiden Jahren keine standortabhängigen Regulierungen zwischen den Gruppen Unterhalb und Oberhalb der ARA gemessen werden. Die generell erhöhten Expressionswerte in beiden Gruppen 2015 könnten durch den allgemein schlechteren Gesundheitszustand aller Fische hervorgerufen worden sein.

C-myc zeigte eine erhöhte Expression 2014 in der Gruppe Oberhalb der ARA. Dies könnte mit verstärkten Leberschädigungen durch die PKD-Infektion im Zusammenhang stehen.

4.6.9.3 Biotransformation

Tabelle 23: Biomarker-Gene für Biotransformation von Schadstoffen

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2014	Expression in der Leber 2015
<p>Cyp1a</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2014 und 2015 keine Unterschiede - 2015 generell niedrigere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2014 		
<p>Cyp3a</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb - 2015 keine Unterschiede 		
<p>GST</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb - 2015 keine Unterschiede 		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2014 n= 13, 2015 n=12 und Unterhalb der ARA 2014 n=14, 2015 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Cyp1a zeigte keine standortabhängige Regulierung in beiden Jahren. Cyp1a ist hauptsächlich für die Hydroxylierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) verantwortlich. Dementsprechend könnte dies auf eine vergleichbar niedrige oder hohe Belastung mit PAKs an diesen Standorten hinweisen. Eine spezifische Analyse der PAKs wurde während dieser Studie allerdings nicht durchgeführt.

Interessanterweise wurde eine Induktion der Expression in den Fischzellen gemessen (siehe 4.10) welche mit Wasserproben von 2014 Unterhalb exponiert wurden. Dies deutet auf eine höhere Konzentration von PAKs an diesem Standort 2014 hin. Cyp1a ist ein sehr schnell und stark induzierbares Gen, bei längerer Exposition kann es zu einem „*Negative feedback loop*“ in



der Regulierung kommen. Dies ist ein essentieller zellulärer Regulierungsmechanismus und verhindert, dass permanent mRNAs von einzelnen Genen in der Zelle transkribiert werden, welche dann in funktionelle Proteine umgesetzt werden. Die Fischzellen werden nur für 24 h exponiert (akut) wodurch es zu einer signifikanten Induktion kommen kann. Die Fische im Fluss sind einer chronischen Exposition ausgesetzt, damit nicht mehr Protein als nötig exprimiert wird, wird die mRNA Expression herunterreguliert.

Für **Cyp3a** konnte eine signifikant höhere Expression in den Lebergeweben der Gruppe Unterhalb der ARA 2014 im Vergleich zu Oberhalb gemessen werden. 2015 war dieser Unterschied zwischen den Standorten nicht mehr messbar.

Cyp3A stellt eine Art „universal Monooxygenase“ dar. Das Enzym gewährleistet die Oxidation einer großen Bandbreite von verschiedenen organischen Stoffen, z.B. zahlreiche aliphatische Kohlenwasserstoffe, Xenohormone oder verschiedene Pharmaka. Daher korreliert das Ergebnis der Genexpression sehr gut mit der organischen Analytik welche eine starke Belastung mit potentiellen Substraten von Cyp3a 2014 Unterhalb und nach dem Stopp der Abwassereinleitung einen starken Rückgang der Belastung nachgewiesen hatte.

Vergleichbar zu Cyp3a konnte für **GST** eine erhöhte Expression in der Gruppe Unterhalb der ARA 2014 gegenüber Oberhalb der ARA gemessen werden. 2015 war dieser Unterschied zwischen den Standorten nicht mehr messbar. Da GST ein Phase II-Detoxifizierungsenzym ist, spiegelt die Expression 2014 Unterhalb die erhöhte Schadstoffbelastung wieder, welche 2015 nicht mehr vorhanden war.

4.6.9.4 Immunregulation / Pathogenabwehr

Für Interleukin-1beta konnten mittels qPCR keine Genexpressionssignale in den Geweben gemessen werden. Es wurden drei verschiedene Primerpaare getestet welche gegen die bereits veröffentlichte Interleukin-1beta Bachforellensequenz entwickelt wurden. Daher kann angenommen werden, dass diese Sequenz keine spezifische Bachforellensequenz ist.

Für die verbleibenden zwei Biomarker dieser Gruppe sind auch die Resultate vom Nierengewebe abgebildet, da dies der einzige Fall war wo diese signifikante Ergebnisse als das Lebergewebe lieferten.



Tabelle 24: Biomarker-Gene für Immunregulation / Pathogenabwehr

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2014	Expression in der Leber 2015
<p>TNFa</p> <p>- 2014 signifikant niedrigere Expression Unterhalb</p> <p>- 2015 keine Unterschiede</p> <p>-2015 generell höhere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2014</p>		
<p>Socs3</p> <p>- 2014 und 2015 keine Unterschiede</p>		
Biomarker-Gene	Expression in der Niere 2014	Expression in der Niere 2015
<p>TNFa</p> <p>- 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2015 keine Unterschiede</p> <p>-2015 generell höhere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2014</p>		
<p>Socs3</p> <p>- 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2015 keine Unterschiede</p> <p>-2015 generell höhere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2014</p>		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2014 n= 13, 2015 n=12 und Unterhalb der ARA 2014 n=14, 2015 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.



Für **TNFa** konnten keine spezifischen Regulierungsmuster der Expression in den Lebergeweben der Fische gemessen werden. Hingegen zeigte sich eine deutlichere Regulierung in den Nierengeweben, mit einer erhöhten Expression in der Gruppe Unterhalb der ARA 2014. Dies deutet auf eine höhere Belastung des Immunsystems dieser Fische hin. Dieses wird von den Fischgesundheitsdaten bestätigt bei denen höhere bakterielle Infektionsraten in den Fischen Unterhalb der ARA detektiert wurden. Diese könnte durch den zusätzlichen Abwassereintrag hervorgerufen worden sein, wodurch eine höhere Keimdichte an diesem Standort vorherrschte. Zusätzlich begünstigten die höhere Wassertemperatur und Nährstoffgehalt ein verstärktes Keimwachstum. 2015 war kein Unterschied zwischen den Fischgruppen mehr messbar, was für eine Verbesserung der Situation durch den Einlassstopp spricht. Jedoch zeigten beide Gruppen höhere Expressionsraten im Vergleich zum Vorjahr. Auch dieses Ergebnis wird von den Daten der Fischgesundheit bestätigt, welche eine höhere Bakterieninfektionsrate in beiden Gruppen in 2015 nachwies.

Socs3 zeigte 2014 und 2015 keine spezifische Regulierung zwischen beiden Gruppen in den Lebergeweben. Vergleichbar zu TNFa konnte eine deutliche Regulierung in den Nierengeweben 2014 gemessen werden, mit einer signifikant erhöhten Expression in der Gruppe Unterhalb der ARA. Dies könnte ebenfalls durch eine erhöhte Bakterieninfektionsrate hervorgerufen worden sein. 2015 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb erfasst werden. Analog zu TNFa waren die Expressionswerte ebenfalls erhöht im Vergleich zum Vorjahr. Die Begründung ist die Gleiche wie bei TNFa.



4.6.9.5 Metall und Oxidativer Stress

Tabelle 25: Biomarker-Gene für Metall- und Oxidativen Stress

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2014	Expression in der Leber 2015
<p>MTa</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb - 2015 keine Unterschiede 		
<p>MTb</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb - 2015 keine Unterschiede - 2015 generell niedrigere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2014 		
<p>Abcc2</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb - 2015 keine Unterschiede 		
<p>Hmox</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb - 2015 keine Unterschiede 		
<p>NrF2</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb - 2015 keine Unterschiede 		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2014 n= 13, 2015 n=12 und Unterhalb der ARA 2014 n=14, 2015 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.



MTa und **MTb** zeigten eine signifikante Erhöhung in den Lebergeweben der Gruppe Unterhalb der ARA 2014 gegenüber Oberhalb. Dies korreliert sehr gut mit den erhöhten Metallkonzentrationen an diesem Standort 2014. 2015 konnten keine Expressionsunterschiede für beide Gene mehr detektiert werden. Dies stimmt ebenfalls mit der Metallanalytik überein, welche nach dem Einleitungsstopp signifikant geringere Metallkonzentrationen Unterhalb der ARA nachwies.

Abcc2 zeigte ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression in den Lebergeweben der Gruppe Unterhalb der ARA 2014 gegenüber Oberhalb. Dies deutet auf einen erhöhten Transport von Metall-Glutathion-Komplexen, hervorgerufen durch die stärkere Metallbelastung an diesem Standort 2014, hin. 2015, begründet durch die geringere Metall- und Schadstoffbelastung, konnten keine Unterschiede mehr gemessen werden.

Für **Hmox** wurde 2014 ebenfalls eine signifikante standortsspezifische Regulierung in den Lebergeweben ermittelt. Dies deutet darauf hin, dass diese Fische Unterhalb der ARA einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt waren, welcher auch durch die erhöhte Metallbelastung hervorgerufen werden kann. 2015 konnten analog zu den anderen Markern keine Unterschiede zwischen den Standorten mehr erfasst werden.

NrF2 zeigte 2014 eine deutlich erhöhte Expression in der Gruppe Unterhalb der ARA im Vergleich zu Oberhalb. Dies deutet auf eine Induktion antioxidativer Mechanismen in den Zellen hin, welche durch erhöhten oxidativen Stress hervorgerufen werden. Dies konnte ein Jahr nach dem Einleitungsstopp nicht mehr gemessen werden.



4.6.9.6 Endokrine Effekte

Tabelle 26: Biomarker-Gene für Endokrine Effekte

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2014	Expression in der Leber 2015
<p>ERa</p> <p>-- 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2015 generell höhere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2014</p>		
<p>VTG</p> <p>- 2014 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2015 keine Unterschiede</p> <p>-2015 generell niedrigere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2014</p>		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2014 n= 13, 2015 n=12 und Unterhalb der ARA 2014 n=14, 2015 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Für **ERa** wurde 2014 eine erhöhte Expression in den Lebergeweben der Gruppe Unterhalb der ARA im Vergleich zu Oberhalb ermittelt. Dies weist auf einen höheren Gehalt von endokrin wirkenden Substanzen an diesem Standort hin. 2015 konnte keine standortabhängige Regulierung mehr erfasst werden.

Für **VTG** wurden nur die Expressionsdaten der männlichen und juvenilen Fische aufgetragen. VTG wird unter Normalbedingungen nur in geschlechtsreifen Weibchen und nicht in juvenilen oder männlichen Fischen exprimiert. Es wird aber durch östrogenaktive Substanzen im Wasser auch in diesen Tieren induziert. Die Ergebnisse 2014 zeigen eine signifikante Expressionserhöhung in den Lebergeweben der männlichen und juvenilen Fische von Unterhalb der ARA gegenüber Oberhalb. Vergleichbar mit ERa konnten 2015 keine Unterschiede mehr erfasst werden.

Die ERa und VTG Daten von 2014 zeigen ein erhöhtes Vorkommen von sogenanntem Xenööstrogen Unterhalb der ARA und eine starke Abnahme der Konzentration nachdem kein Abwasser mehr eingeleitet wurde. Diese Resultate korrelieren sehr gut mit der Analyse der organischen Verbindungen, den Ergebnissen des ER-Calux-Tests und der Analyse des VTG-Proteingehalts.



4.6.9.7 Metabolismus

Tabelle 27: Biomarker-Gene für Metabolismuseffekte

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2014	Expression in der Leber 2015
<p>PEPCK</p> <p>-2014 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2015 keine Unterschiede</p> <p>-2015 generell höhere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2014</p>		
<p>Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2014 n= 13, 2015 n=12 und Unterhalb der ARA 2014 n=14, 2015 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.</p>		

PEPCK zeigte 2014 eine höhere Expression in der Gruppe Unterhalb der ARA. 2015 konnten keine Unterschiede zwischen den Standorten gemessen werden. Jedoch wurde eine allgemein höhere Expression im Vergleich zum Vorjahr gemessen. PEPCK wird in Hungerperioden induziert um den Glukosespiegel im Körper konstant zu halten. Daher korreliert das Ergebnis gut mit den Daten der Fischgesundheit, welche einen schlechteren Nährzustand der Fische 2015 nachwies. Die erhöhte Expression 2014 in der Gruppe Unterhalb korreliert nicht mit dem Gesundheitsbericht, welcher einen guten Nährzustand in beiden Fischgruppen ermittelte.

4.6.10 Principal Component Analysis (PCA) Steinach

Um die Ergebnisse der Genexpression zwischen Oberhalb und Unterhalb der ARA und zwischen den Beprobungszeitpunkten direkt miteinander zu vergleichen, wurden Principal Component Analysen (PCA's) durchgeführt (siehe Abbildung 6 bis 9). Ausserdem dient diese Analyse dazu, die Sensitivität der molekularen Biomarker-Methode zu überprüfen. Für den Standort Steinach heisst das, ob Einflüsse auf die Fische durch den Abwassereintrag erfasst werden können und ob es durch den Stopp des Abwassereintrags zu Veränderungen kam. In der PCA wird das Verhalten aller getesteten Biomarker der verschiedenen Standorte integriert und durch die Lage und Distanz zueinander bewertet.



Steinach 2014 Lebergewebe

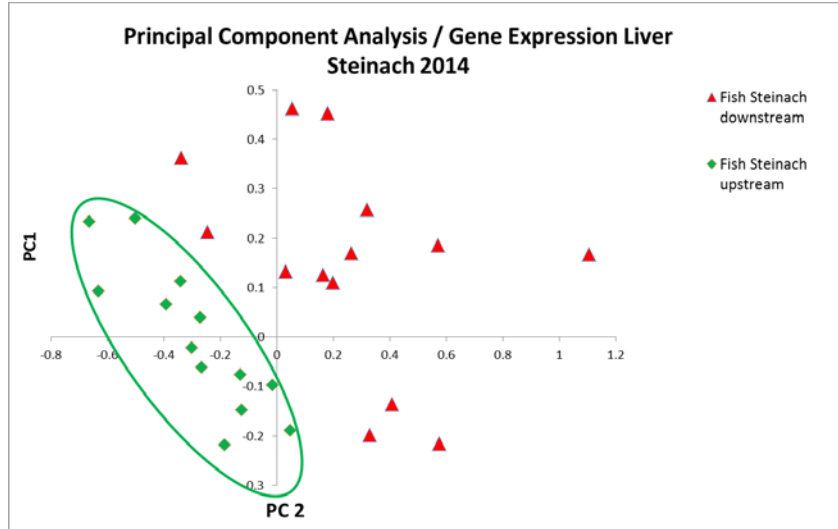


Abbildung 6: Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker im Lebergewebe in allen Bachforellen von Oberhalb und Unterhalb der ARA St. Gallen-Hofen 2014.

Steinach 2014 Nierengewebe

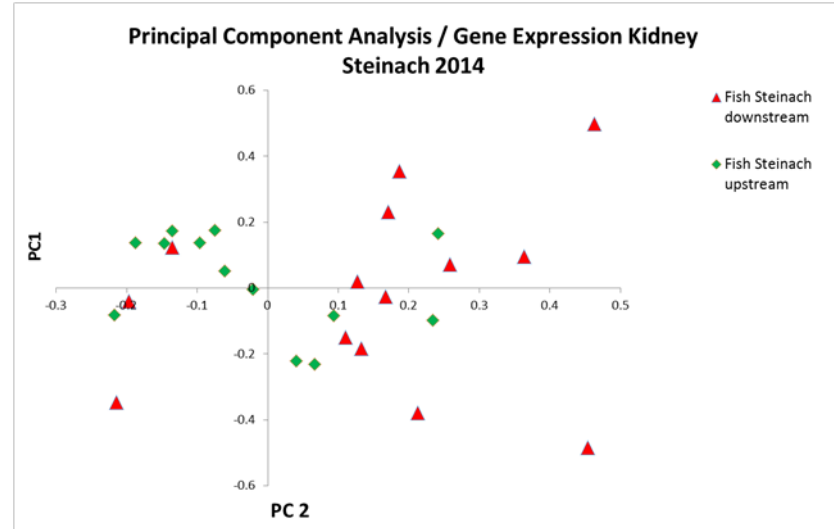


Abbildung 7: Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker im Nierengewebe in allen Bachforellen von Oberhalb und Unterhalb der ARA St. Gallen-Hofen 2014.



Steinach 2015 Lebergewebe

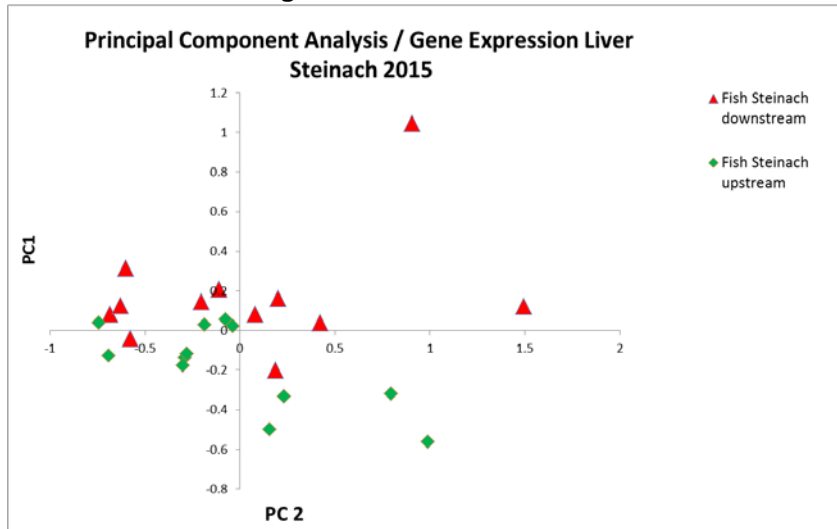


Abbildung 8: Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker im Lebergewebe in allen Bachforellen von Oberhalb und Unterhalb der ARA St. Gallen-Hofen 2015.

Steinach Unterhalb 2014 vs. 2015

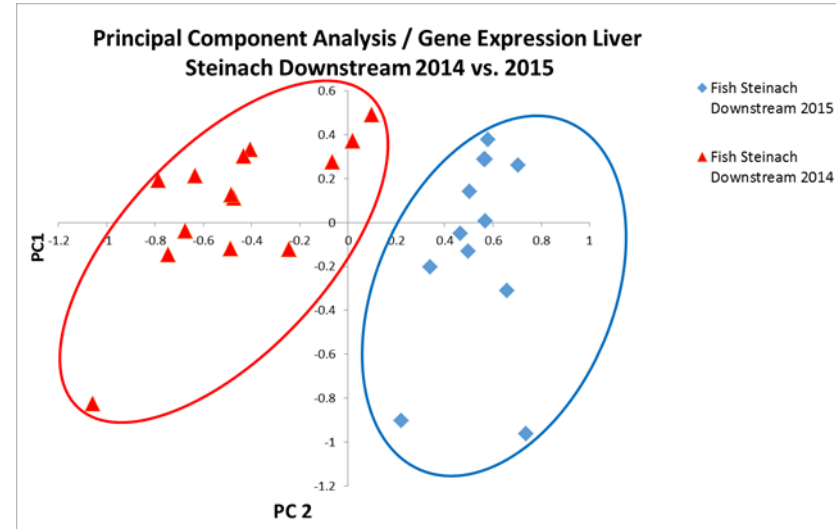


Abbildung 9: Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker im Lebergewebe in allen Bachforellen von Unterhalb der ARA St. Gallen-Hofen 2014 und 2015

Die PCA-Analyse der Genexpression im Lebergewebe (Abbildung 6) zeigt deutlich auf, dass sich 2014 die beiden Fischgruppen stark voneinander unterscheiden, was mit grosser Wahrscheinlichkeit auf den Einfluss des eingeleiteten Abwassers zurückzuführen ist. 2015, ein Jahr nachdem kein Abwasser mehr in die Steinach eingeleitet wurde, war diese klare Abtrennung zwischen den beiden Fischgruppen nicht mehr vorhanden (Abbildung 8). Dies bedeutet, dass sich die Wasserqualität Unterhalb der ARA fast wieder auf dem Niveau wie Oberhalb befindet und somit die detektierten subletalen Effekte auf die Fische deutlich gemindert wurden. Dies erkennt man auch sehr deutlich in Abbildung 9, dem direkten Vergleich zwischen Unterhalb 2014 gegenüber 2015, welche sich klar voneinander abtrennen.



Ausserdem zeigt die PCA eine bessere Eignung des Lebergewebes für dieses Biomarker-Genset, da in Abbildung 7, PCA der Genexpression im Nierengewebe, keine Abtrennung zwischen den Fischgruppen Ober- und Unterhalb der ARA in 2014 zu erkennen ist.

4.6.11 Schlussfolgerung Steinach

Die Resultate der Studie Steinach zeigen deutlich, dass wir ein sensitives molekulares Biomarker-Genset für die Bachforelle, welche nicht zu den klassischen Modell-Organismen gehört, etablieren konnten. Die Genexpressionsanalyse des Biomarker-Sets 2014 in den Lebergeweben der gefangenen Fische per Probestelle reflektiert standortspezifische Unterschiede, welche durch den Eintrag des Abwassers hervorgerufen worden sind. Vor allem die, auch durch die Analytik bestätigten, erhöhten Belastungen mit spezifisch wirkenden Stoffgruppen (z.B. Metalle, Pharmaka, Pestizide oder Xenohormone) an der Probestelle Unterhalb der ARA St. Gallen-Hofen, wurden im Biomarkergenset reflektiert. Ebenfalls konnten gute Übereinstimmungen mit den gemessenen Wasserqualitätsparametern, wie der Wassertemperatur, ermittelt werden. Teilweise konnten auch gute Übereinstimmungen mit den erhobenen Fischgesundheitsdaten erfasst werden. Die Genexpressionsanalyse in den Nierengeweben ergaben kaum signifikante Regulationsmuster und sind daher weniger geeignet für Studien mit diesem Biomarker-Genset.

Eine zweite Untersuchung wurde 2015 an diesem Standort durchgeführt, ein Jahr nachdem die Abwassereinleitung in den Fluss Glatt gestoppt und direkt in den Bodensee verlegt wurde. Dadurch ergab sich eine wissenschaftlich höchst interessante Gelegenheit, die einhergehenden Veränderungen der Wasserqualität und entsprechende Einflüsse auf die Organismen in der Steinach zu untersuchen. Die Resultate der Genexpressionsanalyse von 2015 bestätigen die positiven Auswirkungen auf die Wasserqualität: eine entsprechende subletale Effektminderung (Aktivierung des Schadstoffmetabolismus, allgemeiner Stress, endokrine Effekte oder Metallbelastung) konnte in den Fischen gemessen werden. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch die Wasseranalytik bestätigt.



4.7 Ergebnisse Herisau

Für Herisau werden die einzelnen Resultate von vor (2015) und nach (2016) der Aufschaltung der PAK-Stufe direkt miteinander verglichen. Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits in der Aqua&Gas Publikation PAK-Stufe ARA Herisau (Zöllig et al., 2017) veröffentlicht.

4.7.1 Feldparameter:

Tabelle 28: Gemessene Feldparameter in der Glatt (Herisau) Oberhalb und Unterhalb der ARA

Parameter	Herisau 2015		Herisau 2016	
	Oberhalb	Unterhalb	Oberhalb	Unterhalb
Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	517.50 \pm 145.53	675.50 \pm 194.50	558 \pm 108.47	590.50 \pm 69.42
pH-Wert	8.29 \pm 0.20	8.08 \pm 0.19	8.46 \pm 0.08	8.18 \pm 0.07 *
Wassertemperatur ($^{\circ}\text{C}$)	10.55 \pm 10.5	12.35 \pm 0.97 *	10.45 \pm 0.87	11.78 \pm 1.21
Sauerstoffgehalt (mg/L)	10.15 \pm 1.24	9.40 \pm 1.50	10.47 \pm 0.28	9.90 \pm 0.29 *

Legende: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Feldmessungen im Fluss Glatt Ober- und Unterhalb der ARA-Bachwis. Die Messung wurde viermal durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt. Signifikante Unterschiede zwischen Unterhalb 2015 und 2016 sind mit ^a markiert und rot hinterlegt.

Leitfähigkeit:

2015 wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb gemessen, aber der Trend weist auf eine etwas höhere Leitfähigkeit Unterhalb der ARA hin. Dies spricht für eine höhere Belastung an diesem Standort. 2016 waren die Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb geringer als 2015. Es konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen Unterhalb 2015 und 2016 ermittelt werden. Daher ist keine Aussage möglich, ob die PAK-Stufe einen positiven Einfluss auf diesen Parameter hat.

pH-Wert:

Generell konnte ein etwas geringerer pH Unterhalb der ARA gemessen werden (2016 signifikanter Unterschied). Keine signifikanten Unterschiede konnten zwischen Unterhalb 2015 und 2016 ermittelt werden. Die Aufschaltung der PAK-Stufe scheint keinen Einfluss auf den pH-Wert zu haben.

Wassertemperatur:

Generell konnte eine etwas erhöhte Wassertemperatur (zwischen 1-2 $^{\circ}\text{C}$ höher) Unterhalb der ARA gemessen werden (2015 signifikanter Unterschied). Keine signifikanten Unterschiede konnten zwischen Unterhalb 2015 und 2016 ermittelt werden. Wie zu erwarten hat die Aufschaltung der PAK-Stufe keinen Einfluss auf die Wassertemperatur.

Sauerstoffgehalt:

Generell konnte ein etwas niedrigerer Sauerstoffgehalt Unterhalb der ARA gemessen werden (2016 signifikanter Unterschied). Keine signifikanten Unterschiede konnten zwischen Unterhalb 2015 und 2016 ermittelt werden. Die Aufschaltung der PAK-Stufe scheint keinen Einfluss auf den Sauerstoffgehalt zu haben.



4.7.2 Wasserparameter im Labor gemessen

Tabelle 29: Wasserparameter im Labor gemessen

Parameter	Herisau 2015		Herisau 2016	
	Oberhalb	Unterhalb	Oberhalb	Unterhalb
Alkalinität (mmol/L)	4.67 ± 0.28	4.72 ± 0.60	4.27 ± 0.08	4.30 ± 0.13
Gesamthärte (mmol/L)	2.57 ± 0.46	2.58 ± 0.5	2.5 ± 0.24	2.38 ± 0.21
Nitrat (mg N/L)	0.96 ± 0.14	2.44 ± 0.96 *	0.94 ± 0.18	1.56 ± 0.53
o-Phosphat (µg/L)	22.28 ± 24.72	119.10 ± 27.46 *	9.33 ± 11.68	64.85 ± 10.58 ^a
Chlorid (mg/L)	11.20 ± 0.94	51.24 ± 37.58 *	12.60 ± 0.61	23.45 ± 8.30*
Sulfat (mg/L)	5.59 ± 1.18	12.10 ± 5.52 *	<5 (Messgrenze)	6.38 ± 1.01*
DOC (mg/L)	2.14 ± 0.63	3.90 ± 1.16 *	1.99 ± 0.47	2.23 ± 0.38

Legende: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Wasserprobenanalysen aus dem Fluss Glatt, entnommen von Ober- und Unterhalb der ARA-Bachwis. Die Messungen wurden mit vier unabhängigen Wasserproben durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt. Signifikante Unterschiede zwischen Unterhalb 2015 und 2016 sind mit ^a markiert und rot hinterlegt.

Alkalinität und Gesamthärte:

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb der ARA für 2015 und 2016 gemessen werden. Ausserdem konnten auch keine signifikanten Unterschiede zwischen Unterhalb 2015 und 2016 gemessen werden.

Nitrat, o-Phosphat, Chlorid, Sulfat und gelöster organischer Kohlenstoff (DOC):

2015 wurde für alle Substanzen eine signifikant erhöhte Konzentration Unterhalb der ARA gemessen. 2016 war dies immer noch der Fall für o-Phosphat, Chlorid und Sulfat, für Nitrat und DOC konnte kein Unterschied zwischen Oberhalb und Unterhalb ermittelt werden. Im Vergleich Unterhalb 2015 und 2016 zeigte der generelle Trend eine Abnahme der Konzentration, für o-Phosphat war dies sogar signifikant. Dies deutet darauf hin, dass die PAK-Stufe einen positiven Einfluss hat und die Konzentration dieser Substanzen im Wasser verringert.



4.7.3 Schwermetallanalyse

Tabelle 30: Schwermetallanalyse in der Glatt von Oberhalb und Unterhalb der ARA

Metalle	Herisau 2015		Herisau 2016	
	Oberhalb	Unterhalb	Oberhalb	Unterhalb
Blei (µg/L)	0.29 ± 0.23	0.39 ± 0.49	0.23 ± 0.21	0.31 ± 0.17
Cadmium (µg/L)	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0
Chrom (µg/L)	0.51 ± 0.08	0.52 ± 0.16	0.46 ± 0.15	0.62 ± 0.26
Mangan (µg/L)	9.80 ± 5.48	14.86 ± 3.76^a	6.75 ± 4.82	8.42 ± 3.71^a
Eisen (µg/L)	63.52 ± 46.34	141.94 ± 46.17[*]	77.52 ± 52.43	89.89 ± 41.43^a
Nickel (µg/L)	0.73 ± 0.27	1.84 ± 0.41[*]	1.17 ± 0.25	1.30 ± 0.2^a
Kupfer (µg/L)	1.72 ± 0.70	2.35 ± 0.45	2.65 ± 0.56	3.07 ± 0.49
Zink (µg/L)	1.62 ± 0.68	3.83 ± 0.76[*]	2.34 ± 0.63	2.74 ± 0.37^a
Kobalt (µg/L)	0.09 ± 0.04	0.29 ± 0.08[*]	0.13 ± 0.07	0.14 ± 0.06^a

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Schwermetallanalysen (ICP-MS) gemessen in filtrierten Wasserproben aus dem Fluss Glatt, entnommen von Ober- und Unterhalb der ARA-Bachwis. Die Messungen wurden mit vier unabhängigen Wasserproben durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt. Signifikante Unterschiede zwischen Unterhalb 2015 und 2016 sind mit ^a markiert und rot hinterlegt.

In den Proben von 2015 wurden signifikant erhöhte Konzentrationen für Mangan, Eisen, Nickel, Zink und Kobalt Unterhalb der ARA im Vergleich zu Oberhalb gemessen. 2016, nach der Aufschaltung, waren diese signifikanten Unterschiede nicht mehr messbar. Der Vergleich zwischen Unterhalb 2015 und 2016 zeigte eine signifikante Abnahme der Konzentration für Mangan, Eisen, Nickel, Zink und Kobalt. Dies deutet darauf hin, dass die PAK-Stufe die Konzentration von im Wasser gelösten Metallen reduziert.

4.7.4 Analyse von organischen Mikroverunreinigungen

In Zusammenarbeit mit dem Eawag Department Umweltchemie (Uchem) wurden 2015 und 2016 Wassersammelproben über sieben Tage, von Oberhalb und Unterhalb der ARA, generiert. Diese Sammelproben wurden mit Hilfe eines ISCO-Sampler gewonnen. Die Wasserentnahme endete genau an dem Tag der Fischbeprobung (13.05.2015 und 03.06.2016). Die erhaltenen Wassersammelproben wurden im Labor auf 57 organische Mikroverunreinigungen hin untersucht. Für Herisau 2016 sind die Ergebnisse von einer viertägigen Wassersammelprobe dargestellt. Leider wurde beim Mischen der Proben ein Fehler gemacht, so dass keine Analyse von über sieben Tage gesammeltes Wasser möglich war.



Tabelle 31: Analyse von 57 Mikroverunreinigungen in Wochensammelproben. **Gelb:** Deutliche Abnahme der Konzentration Unterhalb 2016 im Vergleich zu 2015. **Rot:** Zunahme der Konzentration Unterhalb 2016 im Vergleich zu 2015. **Leere Zellen:** Werte <LOQ (Unterhalb der Bestimmungsgrenze) **Fett:** Substanz wurde mit einem struktidentischen isotope-markierten internen Standard gemessen. Werte ohne eigenen internen Standard haben grössere Unsicherheiten.

Substanzinformation					Concentrations in ng/L				
Wirkstoff	CAS-No	ID	Wirkstoffgruppe	Untergruppe Wirkstoffklasse	LOQ	Herisau Oberhalb 2015	Herisau Unterhalb 2015	Herisau Oberhalb 2016	Herisau Unterhalb 2016
4-/5-Methyl-Benzotriazol	136-85-6	167	Korrosionsschutzmittel		1	24	230	24	38
Amisulprid	71675-85-9	2852	Pharmazeutika	Neuroleptikum	2		79		4
Atenolol	29122-68-7	169	Pharmazeutika	Beta-blocker	2		50		8.8
Atrazin	1912-24-9	288	Pestizid	Herbizid	1	2.6	4.5	3.4	3.3
Azoxystrobin	131860-33-8	89	Pestizid	Fungicide	1				1.1
Benzotriazol	95-14-7	166	Korrosionsschutzmittel		3	12	570	13	83
Boscalid	188425-85-6	2938	Pestizid	Fungicide	5				
Candesartan	139481-59-7	2804	Pharmazeutika	Sartan	1		41		25
Carbamazepin	298-46-4	194	Pharmazeutika	Antiepileptic	4		33		5.3
Carbendazim	10605-21-7	278	Biozid	Fungicide	0.5	2	60	4.9	8.9
Chlorpyrifos	2921-88-2	2950	Pestizid	Insecticide	7				
Chlorpyrifos-methyl	5598-13-0	2951	Pestizid	Insecticide	35				
Chlortaluron	15545-48-9	273	Pestizid	Herbizid	1				
Citalopram	59729-33-8	2901	Pharmazeutika	Antidepressivum	2.5		14	0.8	1.9
Clarithromycin	81103-11-9	191	Pharmazeutika	Antibiotic	4.5		30		6.6
Climbazol	38083-17-9	2739	Personal Care Product		1		5.4		0.5
Clothianidin	210880-92-5	2933	Pestizid	Insecticide	2				
Coffein	58-08-2	303	Tracer		8	57	58	59	52
Cyproconazol	94361-06-5	86	Pestizid	Fungicide	2			1.4	1.7
Cyprodinil	121552-61-2	148	Pestizid	Fungicide	0.5				
Diazinon	333-41-5	293	Pestizid	Insecticide	0.5		1.5		2.6
Diclofenac	15307-86-5	201	Pharmazeutika	Anti-inflammatory	5		220	2.3	64
Dimethoat	60-51-5	2761	Pestizid	Insecticide	1				
Diuron	330-54-1	292	Biozid	Herbizid	2	12	23	27	24
Epoxyconazol	133855-98-8	95	Pestizid	Fungicide	0.5				
Fexofenadin	83799-24-0	3019	Pharmazeutika	Antihistaminikum	4		52	1.1	17
Fipronil	120068-37-3	2666	Pestizid	Insecticide	1				
Gabapentin	60142-96-3	2561	Pharmazeutika	Antiepileptic	200				64
Hydrochlorothiazid	58-93-5	2610	Pharmazeutika	Diuretic	1	1.7	120	1.1	19
Imidacloprid	138261-41-3	2709	Pestizid	Insecticide	2				
Iopromid	73334-07-3	242	Pharmazeutika	Contrast medium	35		710		
Iprovalicarb	140923-17-7	2936	Pestizid	Fungicide	2				
Irbesartan	138402-11-6	2774	Pharmazeutika	Sartan	2		46		6.7
Isoproturon	34123-59-6	286	Pestizid	Herbizid	1.5		1.9		
Lamotrigin	84057-84-1	2676	Pharmazeutika	antiepileptics	1		40		9.8
Mecoprop	93-65-2	308	Pestizid	Herbizid	5	18	53	66	170
Methoxyfenozid	161050-58-4	2935	Pestizid	Insecticide	1				
Metoprolol	37350-58-6	172	Pharmazeutika	Beta-blocker	1		12		2.6
Metribuzin	21087-64-9	90	Pestizid	Herbizid	0.5				
Oxazepam	604-75-1	2743	Pharmazeutika	Sedativ	4		18	1.4	3.4
Penconazol	66246-88-6	3107	Pestizid	Insecticide	0.7		0.7		
Pirimicarb	23103-98-2	2711	Pestizid	Insecticide	7				
Propamocarb	24579-73-5	2945	Pestizid	Fungicide	0.9		1.4	1.3	1.5
Propiconazol	60207-90-1	212	Pestizid	Fungicide	1		2.2		1.4
Simazin	122-34-9	262	Pestizid	Herbizid	1	1.3	2.1	1	0.9
Sitagliptin	486460-32-6	2903	Pharmazeutika	Antidiabetikum	45		120		46
Sucralose	56038-13-2	703	Lebensmittelzusatzstoff	Suessungsmittel	10		570		450
Sulfamethoxazol	723-46-6	298	Pharmazeutika	Antibiotic	2		26		20
Tebuconazol	107534-96-3	327	Pestizid	Fungicide	2				
Terbutryn	886-50-0	306	Biozid	Herbizid	1.5	1.8	4.6	1.1	1
Terbutylazin	5915-41-3	284	Pestizid	Herbizid	0.5	2.6	3.1	3.1	3.4
Thiacloprid	111988-49-9	2954	Pestizid	Insecticide	2				
Thiamethoxam	153719-23-4	2941	Pestizid	Insecticide	6				
Torasemid	56211-40-6	3145	Pharmazeutika	Schleifendiuretika	4		8.8		
Valsartan	137862-53-4	2583	Pharmazeutika	Angiotensin II antagonist	7		79		74
Venlafaxin	93413-69-5	645	Pharmazeutika	Antidepressant	1		38		7.9
Vildagliptin	274901-16-5	3146	Pharmazeutika	Antidiabetikum	2		5.6		5

Die Analyse der organischen Mikroverunreinigungen zeigt deutlich, dass 2015 ein Grossteil der Substanzen eine stark erhöhte Konzentration in den Wasserproben von Unterhalb der ARA im Vergleich zu Oberhalb aufwies. Dies bestätigt, dass die Abwasseraufbereitung diese Stoffe zu diesem Zeitpunkt nicht effizient eliminieren bzw. herausfiltern konnte. Die Messungen von 2016, ein Jahr nach der Aufschaltung der PAK-Stufe, zeigten für 23 Stoffe (Gelb markiert) eine deutli-



che Abnahme der Konzentration in den Wasserproben von Unterhalb der ARA. Dieses Ergebnis bestätigt, dass durch die Zuschaltung der PAK-Stufe die meisten organischen Verbindungen verstärkt aus dem Abwasser gebunden werden und somit deutlich geringere Mengen in die Oberflächengewässer eingeleitet werden, was zu einer deutlichen Verbesserung der Wasserqualität Unterhalb der ARA führt. Für fünf Verbindungen wurde eine erhöhte Konzentration Unterhalb 2016 im Vergleich zu 2015 detektiert (Rot markiert). Ein Grund dafür könnten unterschiedliche Abwassereinträge im Vergleich zum Vorjahr sein.

4.7.5 Untersuchung des Östrogenen Potentials in den Wasserproben

Mittels dem ER-CALUX –Test wurde das östrogene Potential in entnommenen Wasserproben von Oberhalb und Unterhalb der ARA-Bachwis untersucht.

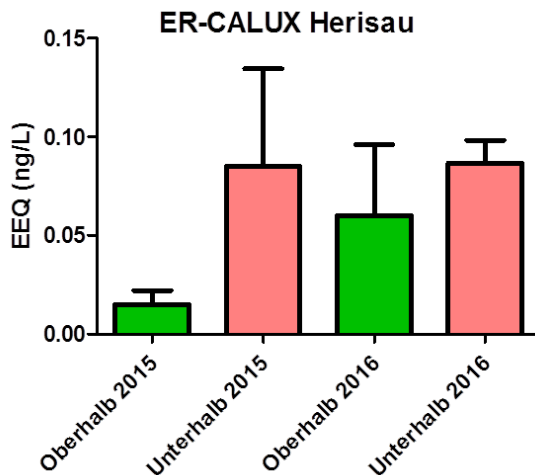


Abbildung 10: ER-CALUX Test durchgeführt mit drei unabhängigen Wasserproben pro Standort ($n=3$). EEQ = Östradiol-Äquivalenz-Konzentration. Signifikanzanalyse wurde mittels *t*-Test durchgeführt.

Insgesamt war die Östrogenität in beiden Jahren an allen Standorten sehr gering, die durchschnittlichen Werte lagen bei 0.06 ng/L EEQ, welche sehr nah der Bestimmungsgrenze von 0.01 ng/L EEQ liegen. Zusätzlich zeigten die gemessenen Replikate eine sehr hohe Variabilität, so dass keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Standorten erfasst werden konnten. Daher ist eine Beurteilung, ob die PAK-Stufe das Östrogenpotential verringert, anhand dieser Testdaten nicht möglich.



4.7.6 Fischbeprobung

Mittels Elektrofischen wurden 2015 und 2016 jeweils 12 juvenile Bachforellen pro Standort gefangen und untersucht. In den folgenden Tabellen sind Geschlecht, Länge, Gewicht und Lebergewicht der gefangenen Fische dargestellt.

Tabelle 32: Übersicht der gefangenen Bachforellen 2015. M = Männchen, F = Weibchen und j = juveniler Fisch noch keine eindeutigen Geschlechtsmerkmale ausgebildet

Glatt Oberhalb der ARA Bachwis 2015

Fischnr.	Länge (cm)	Gewicht (g)	Lebergewicht (g)	Sex
1	14.4	27.4	0.37	M
2	13.9	29.3	0.36	F
3	13.6	27.0	0.33	M
4	11.2	16.1	0.19	F
5	18.1	66.0	0.88	M
6	16.7	50.2	0.48	F
7	18.2	64.3	0.78	F
8	10.6	11.5	0.14	F
9	19.5	79.1	0.86	F
10	16.5	44.7	0.61	F
11	14.4	29.9	0.29	F
12	13.4	27.4	0.32	M

Glatt: Unterhalb der ARA Bachwis 2015

1	14.6	32.9	0.37	F
2	13.7	27.3	0.34	F
3	13.9	29.5	0.42	F
4	14.6	33.3	0.37	M
5	12.0	19.8	0.23	M
6	13.8	26.0	0.26	F
7	15.4	39.0	0.42	M
8	13.7	24.4	0.31	F
9	11.7	16.2	0.19	F
10	14.7	27.3	0.35	F
11	13.0	22.6	0.29	M
12	14.6	30.0	0.44	F



Tabelle 33: Übersicht der gefangenen Bachforellen 2016. M = Männchen, F = Weibchen und j = juveniler Fische noch keine eindeutigen Geschlechtsmerkmale ausgebildet

Glatt Oberhalb der ARA Bachwis 2016

Fischnr.	Länge (cm)	Gewicht (g)	Lebergewicht (g)	Sex
1	14.9	36.44	0.47	M
2	15.1	31.53	0.6	M
3	13.6	25.41	0.31	F
4	16.1	43.8	0.58	F
5	12.9	21.95	0.3	M
6	13.7	28.6	0.30	F
7	16.6	49.1	0.49	M
8	14.2	28.2	0.27	F
9	13.0	25.1	0.24	F
10	14.9	36.3	0.45	M
11	15	39.54	0.44	F
12	15.9	42.85	0.54	F

Glatt: Unterhalb der ARA Bachwis 2016

1	13	24.03	0.38	F
2	14	30.62	0.4	F
3	14.8	36.78	0.42	F
4	14.4	31.88	0.37	F
5	13.9	26.76	0.32	M
6	14.6	34.64	0.51	M
7	13.3	24.59	0.44	F
8	16.5	46.48	0.64	F
9	15.4	41	0.48	M
10	14	27.51	0.41	M
11	17.5	53.92	0.71	M
12	15	34.1	0.36	F



Quantitative Aussagen über die Geschlechterverteilung sind anhand der geringen Anzahl der Fische nicht möglich. Aussagen über einen möglichen Einfluss der Umweltbedingungen auf Wachstum und Körperlänge (Konditionsindex) werden im Punkt 4.7.8 Fischgesundheit betrachtet.

4.7.7 Vitellogenin (VTG)-Proteingehalt im Lebergewebe

Als weiterer Marker für den Einfluss von östrogenaktiven Substanzen wurde die Vitellogenin-Proteinkonzentration im Lebergewebe von männlichen und juvenilen Fischen bestimmt. VTG wird unter Normalbedingungen nur in geschlechtsreifen Weibchen und nicht in juvenilen oder männlichen Fischen exprimiert. Es wird aber im Beisein von östrogenaktiven Substanzen auch in diesen Tieren induziert und kann daher als Marker verwendet werden.

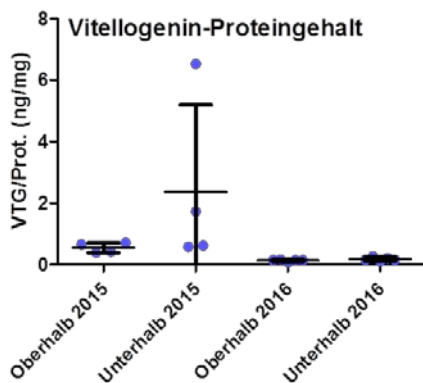


Abbildung 11: Dargestellt ist der Proteingehalt von Vitellogenin pro mg Gesamtprotein gemessen im Lebergewebe von männlichen (Blau markiert) Fischen (Ober- und Unterhalb 2015 n=4, Ober- und Unterhalb 2016 n=5). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt.

Die Ergebnisse von 2015 zeigen einen erhöhten, aber nicht statistisch signifikanten, Vitellogeningehalt in den Lebergeweben der männlichen Fische von Unterhalb der ARA. Dies deutet auf eine erhöhte Belastung mit östrogenaktiven Substanzen hin. Dieses Ergebnis wird durch die ER-CALUX Daten (Abbildung 10) bekräftigt. 2016 ist dieser Trend zwischen Oberhalb und Unterhalb nicht mehr vorhanden, was auf eine geringere Belastung mit östrogenaktiven Substanzen hinweist. Dieses Ergebnis wird nicht von den ER-CALUX Daten unterstützt.

4.7.8 Fischgesundheit

Die Untersuchungen zur Fischgesundheit wurden von der Arbeitsgruppe von Helmut Segner (Uni. Bern) durchgeführt. In diesem Bericht werden die wichtigsten Schlussfolgerungen präsentiert, welche aus den einzelnen Gesundheitsberichten entnommen wurden. Die vollständigen Gesundheitsberichte sind im Anhang enthalten.

Zusammenfassung Fischgesundheit 2015:

Die auffälligsten Befunde für die beiden Herisau-Gruppen waren die in der Histologie gefundenen Hinweise auf eine überlebte PKD-Infektion. Anders als in den Steinach-Gruppen, konnte der Verdacht mittels PCR jedoch bedingt bestätigt werden. Die Tatsache, dass in beiden Gruppen immerhin bei je einem Fisch DNA des PKD-Erregers *T. bryosalmonae* nachgewiesen wurde, zeigt, dass in den besagten Gewässerabschnitten zwar mit *T. bryosalmonae* infizierte Bryozoen vorkommen müssen, über deren Dichte lassen sich aber keine Aussagen machen. Eine mögliche Erklärung dafür, dass trotz vergleichbarer Nierenveränderungen in den beiden Steinach-Gruppen deutlich mehr DNA des PKD-Erregers gefunden wurde als in den beiden Herisau-Gruppen, könnte die zusätzliche Infektion der Steinach-Tiere mit *Sphaerospora* sp. liefern: zwar sind diese Myxosporidien wie bereits erwähnt auch in hohen Dichten für die Fische unproblematisch, sie haben aber in den Nieren der Steinach-Fische dafür gesorgt, dass die Tubuli deut-



lich stärker verstopft waren als bei den Herisau-Tieren, welche nicht mit *Sphärospora* sp. infiziert gewesen waren. Die freieren Tubuli könnten bei den Herisau-Fischen dazu geführt haben, dass die *T. bryosalmonae*-Sporen zum Probennahmezeitpunkt bereits grösstenteils abtransportiert worden waren.

Obwohl auch in Herisau die Wassertemperatur der Glatt Unterhalb der ARA wärmer war als Oberhalb der ARA (zumindest am Probennahmetag), waren die PKD-typischen Organveränderungen in den Fischen vom Standort Unterhalb der ARA tendenziell stärker ausgeprägt, als bei denen die von Oberhalb der ARA stammten. Insbesondere was die Lebern betraf, schien die Regeneration bei den Tieren am Standort „Herisau Unterhalb ARA“ deutlich weniger weit fortgeschritten zu sein, als bei den Fischen des oberen Standortes. Die Gründe hierfür sind unklar. Einerseits ist es möglich, dass sich die Wassertemperaturen an den beiden Probennahmestellen im Mittel gar nicht allzu stark unterscheiden (die am Probennahmetag gemessenen Werte waren ja lediglich eine Momentaufnahme). Andererseits wäre es auch denkbar, dass bei den Fischen vom Standort „Herisau Unterhalb ARA“ die PKD-bedingten Schädigungen ursprünglich grösser waren, als bei den Tieren vom Standort Oberhalb der ARA.

Wie bereits erwähnt, wurden in der Gruppe „Herisau Oberhalb ARA“ bei deutlich mehr Tieren Bakterieninfektionen mit teilweise fakultativ pathogenen Umweltkeimen nachgewiesen, als in der Gruppe „Herisau Unterhalb ARA“. Dieser Befund ging gegen die Erwartungen; die Ursache dafür ist unklar. Es ist möglich, dass die Fische Oberhalb der ARA gewissen zusätzlichen Stressfaktoren ausgesetzt waren, die wir (noch) nicht kennen.

Der Nährzustand der Fische war in den beiden Herisau-Gruppen gut bis sehr gut: die meisten Tiere wiesen viel bis sehr viel periviszerales Fett auf und hatten einen gut gefüllten Magen/Darm-Trakt. Dies lässt darauf schliessen, dass diese beiden Standorte in Bezug auf Nährtiere reichhaltig und in etwa gleich gut waren.

Konditionsindex (KI) und Lebersomatischer Index (LSI) waren in beiden Gruppen vergleichbar und lagen mehr oder weniger im Normalbereich. Auch hier waren jedoch die Grössen- und Gewichtsunterschiede der Fische zwischen den verschiedenen Standorten teilweise sehr gross. Somit liegt auch hier die Vermutung nahe, dass eventuell nicht alle beprobten Fische derselben Altersklasse entstammten.

Abschliessend bleibt zu sagen, dass es sich bei den beiden Probennahmen in Herisau um eine erste „Momentaufnahme“ mit relativ geringer Stichprobengrösse handelt. Der Gesundheitszustand der Fische an den beiden Herisau-Standorten lässt sich somit nur bedingt vergleichen. Um zuverlässigere Aussagen machen zu können, müssten über einen längeren Zeitraum hinweg Fische beprobt und Wasserparameter überwacht werden.

Zusammenfassung Fischgesundheit 2016:

Das Gewicht, die Länge, der KI und der LSI der beprobten Fische waren 2016 Oberhalb und Unterhalb der ARA sehr ähnlich und der Nährzustand der Tiere war an beiden Standorten gut bis sehr gut. Daraus lässt sich schliessen, dass das Angebot an Nährtieren Ober- und Unterhalb der ARA etwa gleich gut war. Die Einleitung der geklärten Abwässer Unterhalb der ARA schien somit keine negativen Einflüsse auf die Nährtiere gehabt zu haben.

Der Befall mit Ektoparasiten (v.a. *Gyrodactylus* sp.) war ebenfalls Ober- und Unterhalb der ARA ähnlich gross. Dies bedeutet, dass die Parasitendichte an beiden Standorten etwa gleich gross war und/oder dass die Fische ober- und Unterhalb der ARA etwa gleich empfänglich für die Parasiten waren. Somit schien das ARA-Abwasser auch auf den Parasitendruck keinen wesentlichen Einfluss gehabt zu haben.

Bezüglich des Bakterienbefalls konnte ein Unterschied zwischen den beiden Probennahmestandorten festgestellt werden: mit Bakterien infizierte Fische wurden nur Unterhalb der ARA gefunden. Somit war Unterhalb der ARA entweder die Keimdichte höher oder die Fische waren Unterhalb der ARA aus irgendeinem Grund vorgeschwächt und dadurch anfälliger auf die fakultativ pathogenen Umweltkeime. Es ist somit möglich, dass die ARA-Abwässer das Keimwachstum gefördert hatten und/oder bei den Fischen zu erhöhtem Umweltstress geführt hatten. Da



das Bakterienwachstum jedoch nur relativ gering war, kann nicht von einem eindeutig negativen Einfluss gesprochen werden.

Obwohl die Tiere äusserlich an beiden Standorten weitestgehend unauffällig aussahen, wurden histologisch sowohl bei Fischen von Oberhalb wie auch von Unterhalb der ARA Organveränderungen gefunden. Diese waren aber an beiden Standorten höchstens leichtgradig. Zudem war in der Regel kein eindeutiges Muster erkennbar, was auf eine bestimmte Ursache der Veränderungen hätte schliessen lassen. Auffällig war einzig, dass bei Fischen vom Standort Unterhalb der ARA etwas stärker ausgeprägte Nierenveränderungen gefunden wurden. Diese könnten allenfalls im Zusammenhang mit dem an diesem Standort festgestellten erhöhten Bakterienbefall stehen. Aber auch diese Nierenveränderungen waren lediglich leichtgradig.

Alles in allem waren keine eindeutig negativen Einflüsse der ARA-Abwassereinleitung feststellbar.

Vergleich Fischgesundheit 2015 mit 2016:

Bezüglich der wachstums- und konditionsrelevanten Faktoren (Fischlänge, Fischgewicht, KI, LSI und Nährzustand), des äusseren Erscheinungsbildes, makroskopisch sichtbaren Organveränderungen sowie des Parasitenbefalls, gab es für beide Probennahmestandorte keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Beprobungsjahren. Der deutlichste Unterschied fand sich bezüglich der Resultate der Bakteriologie; diese waren 2016 genau gegensätzlich zu denjenigen von 2015: während 2015 Oberhalb der ARA mehr Fische mit Bakterieninfektionen gefunden worden waren, wurden 2016 Unterhalb der ARA mehr infizierte Fische gefunden. Der Befund von 2016 entspricht eher den Erwartungen, denn auch in gut geklärtem Abwasser kann mit einer höheren Keimdichte gerechnet werden als in Flusswasser ohne ARA-Einleitungen. Wieso die Bakterienbelastung 2015 allgemein und speziell Oberhalb der ARA höher war, ist unklar. Eine mögliche Ursache könnte beispielsweise ein Jaucheeintrag im Bereich Oberhalb der ARA gewesen sein.

In der Histologie fiel auf, dass auch die in den beiden Jahren gefundenen Nierenveränderungen gegenläufig waren: wurden 2015 Oberhalb der ARA stärkere Nierenveränderungen gefunden, so waren diese 2016 Unterhalb der ARA stärker ausgeprägt. Diese Befunde korrelieren mit den Ergebnissen aus der Bakteriologie; es ist demnach denkbar, dass die stärker ausgeprägten Nierenveränderungen mit der höheren Bakterienbelastung in Zusammenhang stehen (die Proben für die Bakteriologie wurden jeweils aus den Nieren der Fische entnommen). Es muss jedoch betont werden, dass die Nierenveränderungen in beiden Probennahmejahren für beide Standorte jeweils nur leichtgradig waren. Bezüglich Leberveränderungen fanden sich für beide Standorte histologisch keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Probennahmejahren. Auch die Leberveränderungen waren allgemein nur relativ schwach ausgeprägt. Die histologisch erkennbaren Organveränderungen deuten somit allgemein nicht auf eine starke Gewässerbelastung hin.

Was zusätzlich auffiel ist, dass 2016 im Gegensatz zu 2015 die typischen Organveränderungen fehlten, welche auf eine überlebte PKD-Infektion hinweisen. Dies deutet darauf hin, dass entweder im Spätsommer/Herbst 2015 an beiden Standorten kaum PKD-Erreger im Gewässer waren (möglicherweise, weil die Lebensbedingungen für Bryozoen in jenem Jahr suboptimal waren) und/oder dass die Sömmerlinge in 2015 aus unbekanntem Gründen weniger anfällig auf die Parasiten waren.

Die Ergebnisse der PKD-PCR korrelieren für beide Probennahmejahre mit den Befunden aus der Histologie.

Anzeichen für eine virale Erkrankung fanden sich in keinem der beiden Probennahmejahre. Dies bedeutet, dass VHS-, IHN- und IPN-Viren entweder nicht in diesem Gewässer vorkommen und/oder dass die untersuchte Fischpopulation auf die besagten Erreger nicht anfällig war (aus der Literatur ist bekannt, dass Bachforellen allgemein weniger empfänglich für VHS, IHN und IPN sind als beispielsweise Regenbogenforellen).



Zusammengefasst scheint die 2015 erfolgte ARA-Sanierung weder eindeutig positive noch auffällig negative Auswirkungen auf die Fischgesundheit gehabt zu haben.

4.7.9 Biomarker-Genexpression

Im Folgenden werden die Ergebnisse entsprechend der zellulären Funktionen der Gene präsentiert. Dargestellt ist der direkte Vergleich zwischen der Genexpression im Lebergewebe von 2015 und 2016. Die Expressionsdaten von den Nierengeweben werden wegen zu geringer Aussagekraft nicht im Einzelnen dargestellt, aber in der Principal Component Analyse (PCA)-Analyse zusammengefasst.

4.7.9.1 Allgemeiner Stress

Tabelle 34: Biomarker-Gene für allgemeinen Stress

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2015	Expression in der Leber 2016
<p>HSP70</p> <p>- 2015 und 2016 signifikant höhere Expression Unterhalb</p>		
<p>Abcb1</p> <p>- 2015 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2016 keine Unterschiede</p> <p>- 2016 generell höhere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2016</p>		
<p>PXR</p> <p>- 2015 und 2016 keine Unterschiede</p>		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2015 n= 12, 2016 n=12 und Unterhalb der ARA 2015 n=12, 2016 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.



Für **HSP70** wurde 2015 und 2016 eine signifikant höhere Expression in der Fischgruppe von Unterhalb der ARA gemessen. Da HSP70 vor allem sensitiv gegenüber Hitzestress reguliert wird, korreliert dieses Ergebnis gut mit der signifikant erhöhten Wassertemperatur Unterhalb der ARA 2015 und 2016. Nach der Aufschaltung der PAK-Stufe wurden immer noch erhöhte Temperaturen Unterhalb gemessen.

Abcb1 zeigte 2015 eine signifikant erhöhte Expression in der Fischgruppe von Unterhalb der ARA im Vergleich zu den Fischen von Oberhalb. 2016 war diese unterschiedliche Regulierung zwischen den Fischgruppen nicht mehr messbar. Dies spiegelt die generell erhöhten Konzentrationen der verschiedenen organischen Verbindungen von Unterhalb 2015 wieder, welche potentielle Substrate dieses „Xenobiotika-Transporters“ darstellen. 2016 konnten viel geringere Konzentrationen dieser Stoffe Unterhalb gemessen werden. Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den entsprechenden Expressionsdaten.

PXR zeigte in beiden Jahren keine signifikante Regulierung der Expression.



4.7.9.2 Zellzyklus /Apoptose/ Karzinogenese

Tabelle 35: Biomarker-Gene Zellzyklus, Apoptose und Karzinogenese

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2015	Expression in der Leber 2016
<p>p53</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2015 signifikant höhere Expression Unterhalb - 2016 keine Unterschiede <p>2016 generell höhere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2016</p>		
<p>C-fos</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2015 keine Unterschiede -2016 signifikant niedrigere Expression Unterhalb 		
<p>C-myc</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2015 und 2016 keine Unterschiede 		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2015 n= 12, 2016 n=12 und Unterhalb der ARA 2015 n=12, 2016 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Eine signifikant erhöhte **p53** Expression konnte 2015 in den Lebern der Gruppe Unterhalb der ARA gegenüber Oberhalb gemessen werden. 2016 war dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar. Die erhöhte Expression 2015 könnte durch einen erhöhten Eintrag von genotoxisch wirkenden Stoffen hervorgerufen worden sein. Mit der Aufschaltung der PAK-Stufe nahm auch die Konzentration dieser Stoffe in der Glatt Unterhalb ab.

Für **C-fos** konnten 2015 keine standortabhängigen Regulierungen zwischen den Gruppen Unterhalb und Oberhalb der ARA gemessen werden. 2016 wurde eine signifikant niedrigere Expression in der Gruppe Unterhalb gemessen. Eine direkte Korrelation mit den anderen Daten konnte nicht gefunden werden.

Für **C-myc** konnten keine Unterschiede zwischen den Standorten 2015 und 2016 gemessen werden.



4.7.9.3 Biotransformation

Tabelle 36: Biomarker-Gene für Biotransformation von Schadstoffen

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2015	Expression in der Leber 2016
<p>Cyp1a</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2015 signifikant höhere Expression Unterhalb - 2016 keine Unterschiede <p>2016 generell höhere Expressionswerte Oberhalb und Unterhalb im Vergleich zu 2016</p>		
<p>Cyp3a</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2015 signifikant höhere Expression Unterhalb - 2016 keine Unterschiede 		
<p>GST</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2015 signifikant höhere Expression Unterhalb - 2016 keine Unterschiede 		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2015 n= 12, 2016 n=12 und Unterhalb der ARA 2015 n=12, 2016 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert

Alle drei Marker-Gene zeigten 2015 eine signifikant höhere Expression in der Fischgruppe Unterhalb der ARA. Dies weist auf eine stark erhöhte Schadstoffbelastung durch den Eintrag des Abwassers hin, welches von der Analytik bestätigt wurde. 2016 nach der Aufschaltung der PAK-Stufe konnten signifikant geringere Konzentrationen dieser Mikroverunreinigungen Unterhalb der ARA gemessen werden, dieser Effekt konnte auch in den beiden Fischgruppen gemessen werden. Interessanterweise zeigte **Cyp1a** 2015 eine erhöhte Expression Unterhalb der ARA; dies wurde für die Steinach nicht gefunden. Dies zeigt sehr schön auf, dass beide Standorte ein unterschiedliches Belastungsprofil aufwiesen.



4.7.9.4 Immunregulation / Pathogenabwehr

Für diese Biomarker-Gene sind auch die Resultate vom Nierengewebe abgebildet, da diese eine verstärkte Expression in diesem Gewebe im Vergleich zur Leberprobe aufzeigten.

Tabelle 37: Biomarker-Gene für Immunregulation / Pathogenabwehr

Biomarker-Gene	Expression in der Niere 2015	Expression in der Niere 2016
<p>TNFa</p> <p>- 2015 und 2016 keine Unterschiede</p>		
<p>Socs3</p> <p>-- 2015 und 2016 keine Unterschiede</p>		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2015 n= 12, 2016 n=12 und Unterhalb der ARA 2015 n=12, 2016 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert

2015 und 2016 konnten für beide Marker-Gene keine Unterschiede zwischen Fischgruppen von Unterhalb und Oberhalb der ARA detektiert werden. Dies weist auf eine vergleichbare Belastung des Immunsystems hin und korreliert recht gut mit dem Gesundheitsstatus der Gruppen für 2015 und 2016.



4.7.9.5 Metall und Oxidativer Stress

Tabelle 38: Biomarker-Gene für Metall- und Oxidativen Stress

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2015	Expression in der Leber 2016
<p>MTa</p> <p>- 2015 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2016 keine Unterschiede</p>		
<p>MTb</p> <p>-2015 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2016 keine Unterschiede</p>		
<p>Abcc2</p> <p>- 2015 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2016 keine Unterschiede</p>		
<p>Hmox</p> <p>2015 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2016 keine Unterschiede</p>		
<p>NrF2</p> <p>- 2015 und 2016 keine Unterschiede</p>		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2015 n= 12, 2016 n=12 und Unterhalb der ARA 2015 n=12, 2016 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert



MTa, MTb und **Abcc2** zeigten eine signifikante Erhöhung in den Lebergeweben der Gruppe Unterhalb der ARA 2015 gegenüber Oberhalb. Dies korreliert sehr gut mit den erhöhten Metallkonzentrationen an diesem Standort 2015. 2016 konnten keine Expressionsunterschiede für beide Gene mehr detektiert werden. Dies stimmt ebenfalls mit der Metallanalytik überein, welche nach der Aufschaltung der PAK-Stufe signifikant geringere Metallkonzentrationen Unterhalb der ARA nachwies. Aktivkohlefiltrierung ist besonders gut geeignet um Metalle aus dem Wasser zu binden, vergleichbar gute Ergebnisse wurden an der ARA-Neugut beobachtet.

Für **Hmox** wurde 2015 ebenfalls eine signifikante standortsspezifische Regulierung in den Lebergeweben ermittelt. Dies deutet darauf hin, dass diese Fische Unterhalb der ARA einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt waren, welcher auch durch die erhöhte Metallbelastung hervorgerufen werden kann. 2016 konnten analog zu den anderen Markern keine Unterschiede zwischen den Standorten mehr erfasst werden.

NrF2 zeigte in beiden Jahren keine signifikanten Regulierungsmuster.



4.7.9.6 Endokrine Effekte

Tabelle 39: Biomarker-Gene für Endokrine Effekte

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2015	Expression in der Leber 2016
<p>ERa</p> <p>-- 2015 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2016 keine Unterschiede</p>		
<p>VTG</p> <p>- 2015 signifikant höhere Expression Unterhalb</p> <p>- 2016 keine Unterschiede</p>		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2015 n= 12, 2016 n=12 und Unterhalb der ARA 2015 n=12, 2016 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert

Für beide Marker wurde 2015 eine signifikant erhöhte Expression in den Lebergeweben der Gruppe Unterhalb der ARA im Vergleich zu Oberhalb ermittelt. Dies weist auf einen höheren Gehalt von endokrin wirkenden Substanzen an diesem Standort hin. 2016 konnte keine standortabhängige Regulierung mehr erfasst werden. Die Daten von 2015 zeigen ein erhöhtes Vorkommen von sogenannten Xenoöstrogen Unterhalb der ARA und 2016 eine starke Abnahme der Konzentration nach der Aufschaltung der PAK-Stufe. Diese Resultate korrelieren sehr gut mit der Analyse der organischen Verbindungen und der Analyse des VTG-Proteingehalts.



4.7.9.7 Metabolismus

Tabelle 40: Biomarker-Gene für Metabolismuseffekte

Biomarker-Gene	Expression in der Leber 2015	Expression in der Leber 2016
PEPCK - 2015 und 2016 keine Unterschiede		

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA ,2015 n= 12, 2016 n=12 und Unterhalb der ARA 2015 n=12, 2016 n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert

PEPCK zeigte 2015 und 2016 keine Unterschiede zwischen den Fischgruppen an. Dies korreliert mit den Daten zum Ernährungszustand der Fische, welcher in den jeweiligen Gruppen von Oberhalb und Unterhalb vergleichbar war.

4.7.10 Principal Component Analysis (PCA) Herisau

Um die Ergebnisse der Genexpression zwischen Oberhalb und Unterhalb der ARA und zwischen den Beprobungszeitpunkten direkt miteinander zu vergleichen, wurden Principal Component Analysen (PCA's) durchgeführt. Ausserdem dient diese Analyse dazu, die Sensitivität der molekularen Biomarker-Methode zu überprüfen. Für den Standort Herisau heisst das, ob Einflüsse auf die Fische durch die Aufschaltung der PAK-Stufe erfasst werden können und ob es dadurch zu Veränderungen kam. In der PCA wird das Verhalten aller getesteten Biomarker der verschiedenen Standorte integriert und durch die Lage und Distanz zueinander bewertet.



Herisau 2015 Lebergewebe

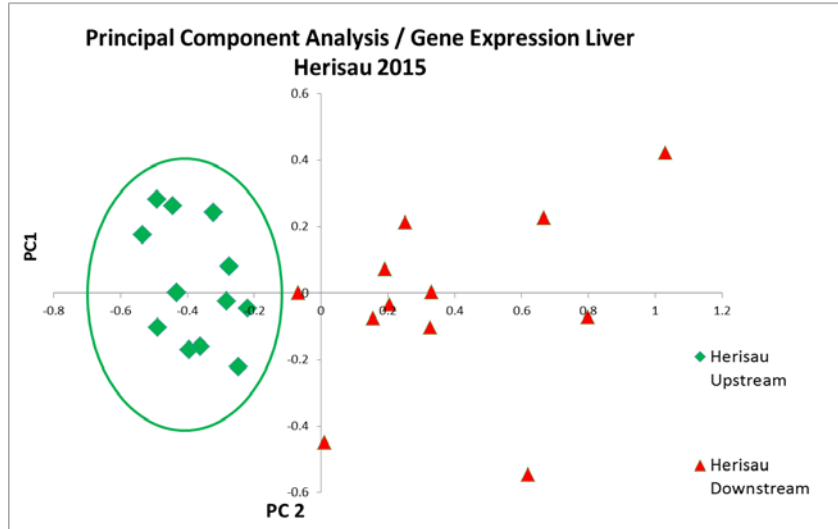


Abbildung 12: Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker im Lebergewebe in allen Bachforellen von Oberhalb und Unterhalb der ARA Bachwis 2015.

Herisau 2015 Nierengewebe

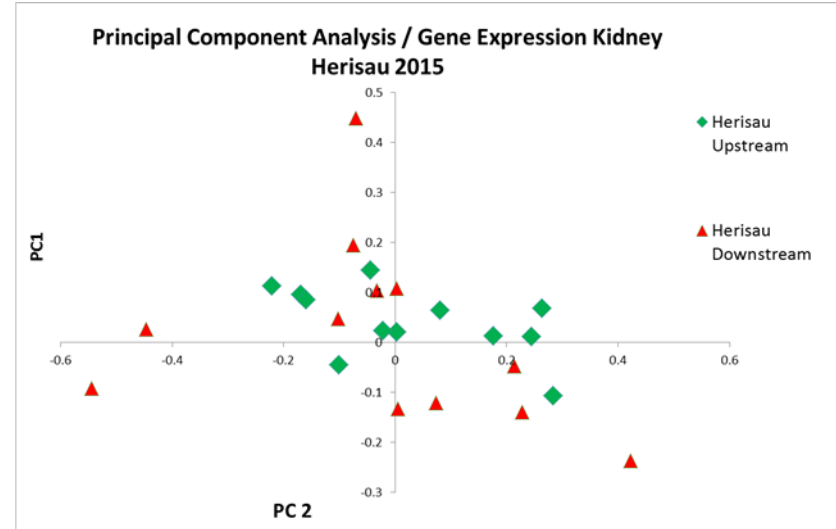


Abbildung 13: Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker im Nierengewebe in allen Bachforellen von Oberhalb und Unterhalb der ARA St. Gallen-Hofen 2014.



Herisau 2016 Lebergewebe

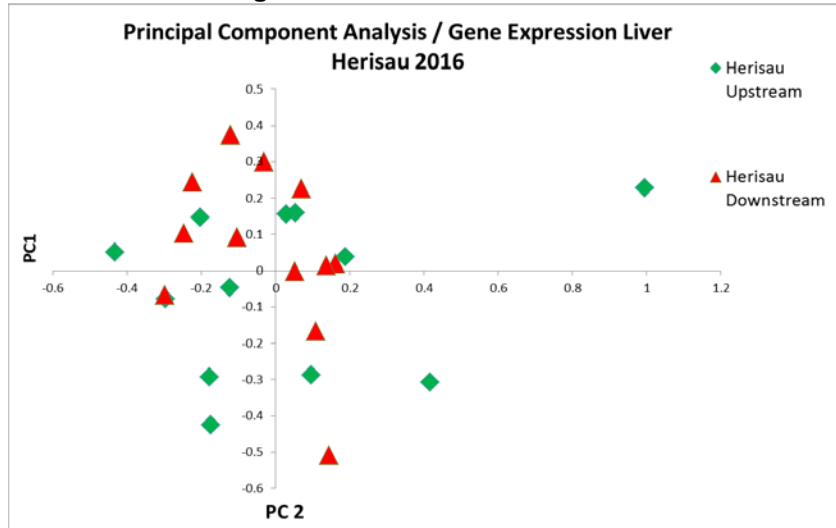


Abbildung 14: Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker im Lebergewebe in allen Bachforellen von Oberhalb und Unterhalb der ARA Bachwis 2016.

Herisau Unterhalb 2015 vs. 2016

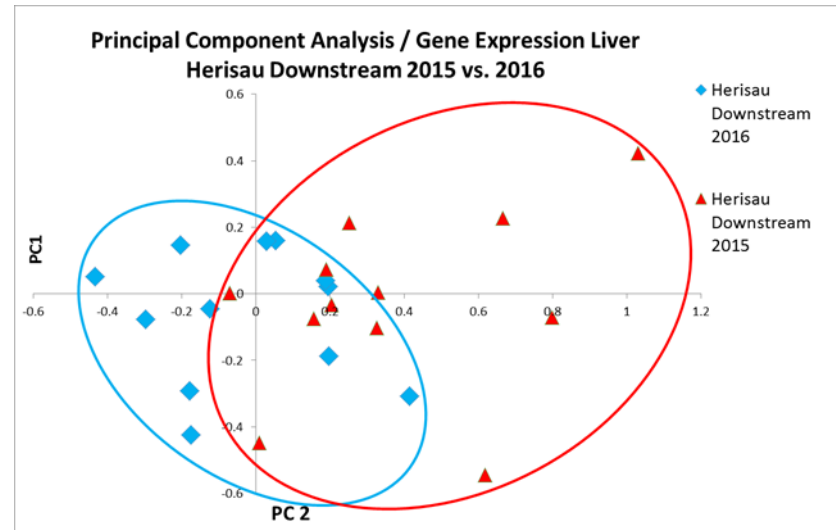


Abbildung 15: Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker im Lebergewebe in allen Bachforellen von Unterhalb der ARA Bachwis 2015 und 2016.

Die PCA-Analyse der Genexpression im Lebergewebe zeigt deutlich auf, dass sich 2015 die beiden Fischgruppen stark voneinander abtrennen, was auf den Einfluss des eingeleiteten Abwassers zurückzuführen ist. 2016, ein Jahr nach der Aufschaltung der PAK-Stufe, war diese klare Abtrennung zwischen den beiden Fischgruppen nicht mehr vorhanden. Dies bedeutet, dass sich die Wasserqualität Unterhalb der ARA zum Positiven verändert hat und somit die detektierten subletalen Effekte auf die Fische deutlich gemindert wurden. Betrachtet man die Gruppen von Unterhalb 2015 und 2016 so ist zwar eine Separierung zu erkennen, jedoch ist diese im Vergleich zur Steinach-Studie viel geringer. Dies kann daran liegen, dass in Herisau immer noch Abwasser eingeleitet wird, in der Steinach dagegen nicht.

Vergleichbar zur Steinach-Studie zeigt die PCA eine besser Eignung des Lebergewebes für dieses ausgewählte Biomarker-Geneset.



4.7.11 Schlussfolgerung Herisau

Vergleichbar zu den Ergebnissen der Steinach-Studie konnten mittels der Genexpressionsanalyse des Biomarker-Gensets die subletalen Effekte, welche durch den Abwassereintrag hervorgerufen werden, in wildgefangenen Bachforellen erfasst werden. Ebenfalls konnten spezifische Belastungen des Flusswasser mit Xenohormonen, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, Pharmaka oder Metallen in den Fischen detektiert werden. Diese Ergebnisse konnten mittels der ebenfalls durchgeführten Wasseranalytik bestätigt werden. Auch während dieser Studie wurde das Lebergewebe als geeigneter für die Genexpressionsanalyse eingestuft als das Nierengewebe.

Auch in Herisau wurde eine zweite Untersuchung 2016 durchgeführt, ein Jahr nach der Aufschaltung der PAK-Stufe an der ARA-Bachwis. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, den Effekt einer ARA-Aufrüstung direkt im Freiland zu untersuchen. Die Resultate der Genexpressionsanalyse von 2016 bestätigen die positiven Auswirkungen auf die Wasserqualität und eine entsprechende Minderung sublethaler Effekte in den Fischen.

4.8 Ergebnisse Ellikon

Für Ellikon waren zwei Beprobungen angedacht: 2015 vor dem Umbau der ARA-Ellikon und für 2016 nach dem Umbau. Vergleichbar zu der Situation Steinach war an diesem Standort geplant, die Abwassereinleitung zu verlegen um den Älikerbach zu entlasten. Durch bauliche Verzögerungen konnte die geplante Zweitbeprobung jedoch nicht durchgeführt werden.

4.8.1 Feldparameter:

Tabelle 41: Gemessene Feldparameter im Älikerbach (Ellikon) Oberhalb und Unterhalb der ARA

Parameter	Ellikon 2015	
	Oberhalb	Unterhalb
Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	540 \pm 40.29	741.25 \pm 81.22 *
pH-Wert	8.28 \pm 0.16	7.82 \pm 0.17 *
Wassertemperatur ($^{\circ}\text{C}$)	9.58 \pm 1.48	11.60 \pm 0.74 *
Sauerstoffgehalt (mg/L)	10.56 \pm 0.17	8.81 \pm 0.24 *

Legende: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Feldmessungen im Fluss Älikerbach Ober- und Unterhalb der ARA-Ellikon. Die Messung wurde viermal durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt.

Für alle gemessenen Parameter konnten signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb gemessen werden. Dies zeigt deutlich, dass das eingeleitete Abwasser einen signifikanten Einfluss auf die Wasserqualität Unterhalb der ARA hatte.



4.8.2 Wasserparameter im Labor gemessen

Tabelle 42: Wasserparameter im Labor gemessen

Parameter	Ellikon 2015	
	Oberhalb	Unterhalb
Alkalinität (mmol/L)	5.40 ± 0.37	5.32 ± 0.61
Gesamthärte (mmol/L)	3.10 ± 0.25	3.08 ± 0.35
Nitrat (mg N/L)	2.86 ± 0.43	3.67 ± 0.39 *
o-Phosphat (µg/L)	6.03 ± 1.41.72	94.80 ± 31.32 *
Chlorid (mg/L)	20.04 ± 2.11	78.27 ± 27.74 *
Sulfat (mg/L)	23.99 ± 1.18	31.57 ± 1.99 *
DOC (mg/L)	1.82 ± 0.44	2.69 ± 0.39 *

Legende: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Wasserprobenanalysen aus dem im Fluss Älikerbach Ober- und Unterhalb der ARA-Ellikon. Die Messung wurde viermal durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt.

Alkalinität und Gesamthärte:

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb der ARA gemessen werden.

Nitrat, o-Phosphat, Chlorid, Sulfat und gelöster organischer Kohlenstoff (DOC):

Es wurde für alle Substanzen eine signifikant erhöhte Konzentration Unterhalb der ARA gemessen. Dies ist eindeutig auf das eingeleitete Abwasser zurückzuführen.



4.8.3 Schwermetallanalyse

Tabelle 43: Schwermetallanalyse im Älikerbach Oberhalb und Unterhalb der ARA

Metalle	Ellikon 2015	
	Oberhalb	Unterhalb
Blei (µg/L)	0.18 ± 0.06	0.54 ± 0.21 *
Cadmium (µg/L)	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Chrom (µg/L)	0.22 ± 0.07	0.19 ± 0.08
Mangan (µg/L)	3.19 ± 0.63	8.33 ± 3.32*
Eisen (µg/L)	21.35 ± 7.53	48.03 ± 17.58 *
Nickel (µg/L)	0.31 ± 0.03	0.79 ± 0.19*
Kupfer (µg/L)	0.97 ± 0.11	2.74 ± 0.67. *
Zink (µg/L)	0.93 ± 0.47	4.82 ± 1.87 *
Kobalt (µg/L)	0.04 ± 0.01	0.21 ± 0.04 *

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Schwermetallanalysen (ICP-MS) gemessen in filtrierten Wasserproben aus dem Fluss Älikerbach, entnommen von Ober- und Unterhalb der ARA-Ellikon. Die Messungen wurden mit vier unabhängigen Wasserproben durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt.

In den Wasserproben wurden signifikant erhöhte Konzentrationen für Blei, Mangan, Eisen, Nickel, Kupfer, Zink und Kobalt Unterhalb der ARA im Vergleich zu Oberhalb gemessen. Dies zeigt auf, dass durch den Abwassereintrag die Konzentration dieser Metalle erhöht wird.

4.8.4 Analyse von organischen Mikroverunreinigungen

In Zusammenarbeit mit dem Eawag Department Umweltchemie (Uchem) wurden 2015 Wassersammelproben über sieben Tage von Oberhalb und Unterhalb der ARA generiert. Die Wasserentnahme endete genau an dem Tag der Fischbeprobung (15.10.2015). Diese Sammelpollen wurden mit Hilfe eines ISCO-Sampler gewonnen. Die erhaltenen Wassersammelproben wurden in Labor auf 57 organische Mikroverunreinigungen hin untersucht.



Tabelle 44: Analyse von 57 Mikroverunreinigungen in Wochensammelproben. **Rot:** Zunahme der Konzentration Unterhalb im Vergleich zu Oberhalb. **Leere Zellen:** Werte <LOQ (Unterhalb der Bestimmungsgrenze). **Fett:** Substanz wurde mit einem strukturidentischen isotopenmarkierten internen Standard gemessen. Werte ohne eigenen internen Standard haben grössere Unsicherheiten.

Substanzinformation					Concentrations in ng/L		
Wirkstoff	CAS-No	ID	Wirkstoffgruppe	Untergruppe Wirkstoffklasse	LOQ	Elikon Oberhalb 2015	Elikon Unterhalb 2015
4-/5-Methyl-Benzotriazol	136-85-6	167	Korrosionsschutzmittel		1	33	510
Amisulprid	71675-85-9	2852	Pharmazeutika	Neuroleptikum	2	1.1	11
Atenolol	29122-68-7	169	Pharmazeutika	Beta-blocker	2		97
Atrazin	1912-24-9	288	Pestizid	Herbizid	1	16	12
Azoxystrobin	131860-33-8	89	Pestizid	Fungicide	1		2.4
Benzotriazol	95-14-7	166	Korrosionsschutzmittel		3	14	1300
Boscalid	188425-85-6	2938	Pestizid	Fungicide	5		31
Candesartan	139481-59-7	2804	Pharmazeutika	Sartan	1	1.1	190
Carbamazepin	298-46-4	194	Pharmazeutika	Antiepileptic	4		64
Carbendazim	10605-21-7	278	Biozid	Fungicide	0.5	2.7	20
Chlorpyrifos	2921-88-2	2950	Pestizid	Insecticide	7		
Chlorpyrifos-methyl	5598-13-0	2951	Pestizid	Insecticide	35		
Chlortoluron	15545-48-9	273	Pestizid	Herbizid	1		2.3
Citalopram	59729-33-8	2901	Pharmazeutika	Antidepressivum	2.5	2.9	37
Clarithromycin	81103-11-9	191	Pharmazeutika	Antibiotic	4.5		47
Climbazol	38083-17-9	2739	Personal Care Product		1		20
Clothianidin	210880-92-5	2933	Pestizid	Insecticide	2		
Coffein	58-08-2	303	Tracer		8	15	34
Cyproconazol	94361-06-5	86	Pestizid	Fungicide	2	2.8	4
Cyprodinil	121552-61-2	148	Pestizid	Fungicide	0.5	0.8	1.9
Diazinon	333-41-5	293	Pestizid	Insecticide	0.5		2.4
Diclofenac	15307-86-5	201	Pharmazeutika	Anti-inflammatory	5	1.6	700
Dimethoat	60-51-5	2761	Pestizid	Insecticide	1		
Diuron	330-54-1	292	Biozid	Herbizid	2	3.3	45
Epoxyconazol	133855-98-8	95	Pestizid	Fungicide	0.5	1.9	2.8
Fexofenadin	83799-24-0	3019	Pharmazeutika	Antihistaminikum	4		110
Fipronil	120068-37-3	2666	Pestizid	Insecticide	1		3.2
Gabapentin	60142-96-3	2561	Pharmazeutika	Antiepileptic	200		190
Hydrochlorothiazid	58-93-5	2610	Pharmazeutika	Diuretic	1		390
Imidacloprid	138261-41-3	2709	Pestizid	Insecticide	2		9.7
Iopromid	73334-07-3	242	Pharmazeutika	Contrast medium	35		21
Iprovalicarb	140923-17-7	2936	Pestizid	Fungicide	2		
Irbesartan	138402-11-6	2774	Pharmazeutika	Sartan	2		170
Isoproturon	34123-59-6	286	Pestizid	Herbizid	1.5	2.7	2.2
Lamotrigin	84057-84-1	2676	Pharmazeutika	antiepileptics	1		140
Mecoprop	93-65-2	308	Pestizid	Herbizid	5	6.7	45
Methoxyfenozid	161050-58-4	2935	Pestizid	Insecticide	1		
Metoprolol	37350-58-6	172	Pharmazeutika	Beta-blocker	1	0.6	120
Metribuzin	21087-64-9	90	Pestizid	Herbizid	0.5		
Oxazepam	604-75-1	2743	Pharmazeutika	Seditativ	4	2.2	41
Penconazol	66246-88-6	3107	Pestizid	Insecticide	0.7		1
Pirimicarb	23103-98-2	2711	Pestizid	Insecticide	7		5
Propamocarb	24579-73-5	2945	Pestizid	Fungicide	0.9	1.2	1.3
Propiconazol	60207-90-1	212	Pestizid	Fungicide	1	1.6	4.2
Simazin	122-34-9	262	Pestizid	Herbizid	1	5.5	6.6
Sitagliptin	486460-32-6	2903	Pharmazeutika	Antidiabetikum	45	2.9	280
Sucralose	56038-13-2	703	Lebensmittelzusatzstoff	Suessungsmittel	10		1700
Sulfamethoxazol	723-46-6	298	Pharmazeutika	Antibiotic	2	0.6	94
Tebuconazol	107534-96-3	327	Pestizid	Fungicide	2	1	3.1
Terbutryn	886-50-0	306	Biozid	Herbizid	1.5	1.3	5.5
Terbutylazin	5915-41-3	284	Pestizid	Herbizid	0.5	10	9.6
Thiacloprid	111988-49-9	2954	Pestizid	Insecticide	2		
Thiamethoxam	153719-23-4	2941	Pestizid	Insecticide	6		2.1
Torasemid	56211-40-6	3145	Pharmazeutika	Schleifendiuretika	4		17
Valsartan	137862-53-4	2583	Pharmazeutika	Angiotensin II antagonist	7		96
Venlafaxin	93413-69-5	645	Pharmazeutika	Antidepressant	1	0.6	100
Vildagliptin	274901-16-5	3146	Pharmazeutika	Antidiabetikum	2		23

Die Analyse der organischen Mikroverunreinigungen zeigt deutlich, dass 2015 fast alle analysierten Substanzen eine deutlich erhöhte Konzentration in den Wasserproben von Unterhalb im Vergleich zu Oberhalb der ARA aufwiesen. Dies bestätigt, dass die Abwasseraufbereitung diese Stoffe nicht effizient eliminieren bzw. herausfiltern konnte und durch den Abwassereintrag die Konzentrationen in den Gewässern signifikant erhöht werden.



4.8.5 Untersuchung des Östrogenen Potentials in den Wasserproben

Mittels dem ER-CALUX –Test wurde das Östrogenpotential in entnommenen Wasserproben von Oberhalb und Unterhalb der ARA-Ellikon untersucht.

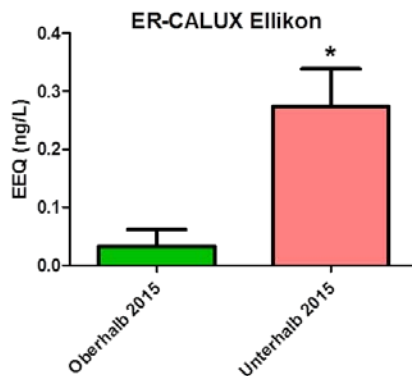


Abbildung 16: ER-CALUX Test durchgeführt mit drei unabhängigen Wasserproben pro Standort ($n=3$). EEQ = Östradiol-Äquivalenz-Konzentration. Signifikanzanalyse wurde mittels *t*-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Die Ergebnisse von 2015 zeigen ein signifikant erhöhtes Östrogenpotential in den Wasserproben von Unterhalb der ARA im Vergleich zu Oberhalb.



4.8.6 Fischbeprobung

Mittels Elektrofischen wurden 2015 jeweils 12 juvenile Bachforellen pro Standort gefangen und untersucht werden. In den folgenden Tabellen sind Geschlecht, Länge, Gewicht und Lebergewicht der gefangenen Fische dargestellt.

Tabelle 45: Übersicht der gefangenen Bachforellen 2015. M = Männchen, F = Weibchen und j = juveniler Fisch noch keine eindeutigen Geschlechtsmerkmale ausgebildet

Älikerbach Oberhalb der ARA Ellikon 2015				
Fischnr.	Länge (cm)	Gewicht (g)	Lebergewicht (g)	Sex
1	9.0	6.4	0.08	j
2	11.9	15.5	0.20	j
3	10.6	10.5	0.13	j
4	11.8	17.2	0.47	j
5	8.2	5.8	0.18	j (?)
6	11.3	14.2	0.45	j
7	10.3	10.8	0.26	j
8	9.4	8.6	0.11	j
9	10.2	10.0	0.20	j
10	9.1	8.7	0.03	j
11	7.1	3.8	0.11	F
12	11.6	10.5	0.13	j (?)
Älikerbach Unterhalb der ARA Ellikon 2015				
1	11.7	15.9	0.29	j (?)
2	9.8	9.6	0.11	j (?)
3	12.2	18.0	0.33	j (?)
4	18.8	57.9	0.52	F

Im Vergleich zu anderen Standorten (Steinach oder Herisau) konnten in Ellikon fast nur juvenile Fische gefangen werden. Unterhalb der ARA konnten trotz mehreren Versuchen nur vier geeignete Bachforellen gefangen werden. Oberhalb der ARA war die Fischdichte beträchtlich höher. Diese geringe Fischdichte Unterhalb könnte durch den erhöhten Schadstoffeintrag durch die ARA hervorgerufen werden. Ausserdem war die Bachbeschaffenheit Unterhalb durch erhöhte Verschlammung kein ideales Habitat für Bachforellen.



4.8.7 Vitellogenin (VTG)-Proteingehalt im Mucus

Als weiterer Marker für den Einfluss von östrogenaktiven Substanzen wurde die Vitellogenin-Proteinkonzentration im Mucus (äussere Schleimschicht der Fischhaut) von männlichen und juvenilen Fischen bestimmt. Eine Bestimmung im Lebergewebe wurde durchgeführt und zeigt einen vergleichbaren Trend.

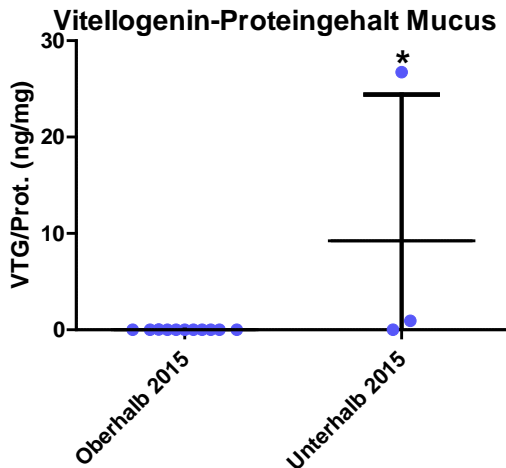


Abbildung 17: Dargestellt ist der Proteingehalt von Vitellogenin pro mg Gesamtprotein gemessen im Mucus von juvenilen (Blau markiert) Fischen (Oberhalb n=11, Unterhalb n=3). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Die Ergebnisse von 2015 zeigen einen signifikant erhöhten Vitellogeningehalt in den Mucusproben der juvenilen Fische von Unterhalb der ARA. Dies deutet auf eine erhöhte Belastung mit östrogenaktiven Substanzen hin. Dieses Ergebnis wird durch die ER-CALUX Daten bekräftigt. Es bleibt zu erwähnen das die Aussagekraft durch die geringe Anzahl der Fische von Unterhalb nicht sehr hoch ist.

4.8.8 Fischgesundheit

Die Untersuchungen zur Fischgesundheit wurden von der Arbeitsgruppe von Helmut Segner (Univ. Bern) durchgeführt. In diesem Bericht werden die wichtigsten Schlussfolgerungen präsentiert, welche aus den einzelnen Gesundheitsberichten entnommen wurden. Die vollständigen Gesundheitsberichte sind im Anhang enthalten.

Zusammenfassung Fischgesundheit 2015:

Das an beiden Standorten festgestellte, teilweise noch akute und teilweise bereits abgeklungene, PKD-Geschehen ist als Hauptbefund zu betrachten. Der Bakterien- und Parasitenbefall sind in den vorgefundenen Befallsstärken klinisch unbedeutend. Bei den Fischen mit akuter PKD-Erkrankung fanden sich nicht nur massive Nierenschäden, sondern auch starke Schädigungen der Lebern. Die LSI-Werte (Lebersomatischer Index) scheinen mit diesen Leberschädigungen zu korrelieren. Somit führen die PKD-Erreger *T. bryosalmonae* vermutlich nicht nur in den Nieren, sondern auch in den Lebern zu einer Proliferation des Gewebes.

Das PKD-Geschehen schien am Standort Oberhalb der ARA stärker ausgeprägt gewesen zu sein. Aufgrund der für die beiden Standorte unterschiedlichen Stichprobengrößen müssen diese Ergebnisse jedoch mit Vorsicht bewertet werden.



4.8.9 Reduzierte Analyse durch Verlust der Gewebeproben von Ellikon und Elgg

Im November 2015 kam es zum Verlust der Gewebeproben von Ellikon und Elgg: Alle Gewebeproben wurden ordnungsgemäss in einem -80°C Gefrierschrank gelagert. Am 13.11.2015 kam es zu einer Funktionsstörung an diesem Gerät, ein Alarm ging gegen 24:00 Uhr in der Empa-Zentrale ein. Daraufhin wurden die Geräteverantwortlichen direkt informiert. Die erreichte Person handelte nach entsprechendem Notfallplan, welcher vorsieht, dass die Proben zuerst in einen -20°C Gefrierraum zwischengelagert werden. Die Proben wurden nicht in den -20°C Gefrierraum transferiert, sondern versehentlich in den vorgelagerten $+4^{\circ}\text{C}$ Kühlraum gebracht. Durch die Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ tauten die Gewebeproben auf und wurden dadurch unbrauchbar für eine weitere Genexpressionsanalyse, da die RNA durch RNasen abgebaut wurde. Zur Überprüfung wurden RNA-Probe-Isolierungen von allen Geweben durchgeführt. Bei allen Proben wurde eine vollständige Degradierung der RNA festgestellt. Daher waren die Proben nicht mehr geeignet für die Durchführung der Genexpressionsanalyse.

Um zumindest eine reduzierte Analyse durchzuführen, erhielten wir Ersatzproben von den gleichen Fischen von der Arbeitsgruppe von Helmut Segner (Uni. Bern), welche für die Bestimmung der Fischgesundheit ebenfalls diverse Gewebeproben entnommen hatte. Dies waren Nierenproben und Mischproben (Herz, Milz, Niere) in RNAlater und Leberproben welche in Paraffin eingebettet waren.

Zuerst wurde versucht, intakte RNA aus den in Paraffin eingebetteten Leberproben mittels eines speziellen Paraffin-RNA-Kit (Qiagen) zu isolieren. Leider war jegliche isolierte RNA aus den Paraffinproben so stark degradiert, dass diese nicht für weitere Analysen verwendet werden konnte. Dadurch entfiel die Leber-Genexpressionsanalyse der Fische von beiden Standorten.

Die RNA-Isolation der Nierenprobe und Mischprobe verlief erfolgreich. Es konnte genügend intakte RNA für weitere Analysen gewonnen werden. Dementsprechend wurde die Genexpressionsanalyse mit den Nieren- und Mischproben für alle gefangenen Fische von den Standorten Ellikon und Elgg durchgeführt.

4.8.10 Biomarker-Genexpression

Im Folgenden werden die Ergebnisse entsprechend der zellulären Funktionen der Gene präsentiert. Dargestellt ist die Genexpression in der Mischprobe, ausser für TNFa und Socs3, bei denen die Daten der Nierengewebe dargestellt werden.

Es bleibt zu erwähnen, dass durch die geringere Anzahl der gefangenen Fische von Unterhalb der ARA die Aussagekraft beeinträchtigt sein kann, da die statistische Aussagekraft (Statistic Power) von 94% (bei zwölf Fischen) auf 36% (bei vier Fischen) sinkt.



4.8.11 Allgemeiner Stress

Tabelle 46: Biomarker-Gene für allgemeinen Stress

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe 2015
<p>HSP70</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	
<p>Abcb1</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>PXR</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=4. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Für **HSP70** wurde keine signifikant höhere Expression in der Fischgruppe von Unterhalb der ARA gemessen. Dies ist etwas unerwartet, da ein deutlicher Temperaturunterschied zwischen beiden Standorten gemessen wurde.

Abcb1 zeigte eine signifikant erhöhte Expression in der Fischgruppe von Unterhalb der ARA im Vergleich zu den Fischen von Oberhalb. Dies spiegelt die generell erhöhten Konzentrationen der verschiedenen organischen Verbindungen von Unterhalb wieder, welche potentielle Substrate dieses „universalen Xenobiotika-Transporters“ darstellen.

PXR zeigte keine signifikante Regulierung der Expression zwischen beiden Fischgruppen.



4.8.12 Zellzyklus / Apoptose/ Karzinogenese

Tabelle 47: Biomarker-Gene Zellzyklus, Apoptose und Karzinogenese

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe 2015
<p>p53</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	
<p>C-fos</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>C-myc</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=4. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün = Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Keine signifikanten Unterschiede der **p53** Expression konnten in den Mischproben der Gruppe Unterhalb der ARA gegenüber Oberhalb gemessen werden. p53 ist ein sensibler Apoptose-Marker, daher könnten die verstärkten Gewebeschädigungen (siehe 4.8.8 Fischgesundheit), welche durch die PKD-Infektion in beiden Gruppen gefunden wurden, einen Einfluss auf die Expression haben.

C-myc zeigte ebenfalls keine standortabhängigen Regulierungsmuster. Dies könnte auch mit verstärkter Gewebeschädigung durch die PKD-Infektion in Zusammenhang stehen.

Dagegen konnte für **C-fos** eine signifikant erhöhte Expression in den Fischen von Unterhalb der ARA gemessen werden. Da C-fos ein Protoonkogen ist und in der Humanmedizin als Marker für Krebs benutzt wird, könnte dies darauf hinweisen, dass die Fische von Unterhalb verstärkt karzinogen wirkenden Stoffen ausgesetzt waren.



4.8.13 Biotransformation

Tabelle 48: Biomarker-Gene für Biotransformation von Schadstoffen

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe
<p>Cyp1a</p> <p>-Signifikant höher Expression Unterhalb</p>	
<p>Cyp3a</p> <p>-Signifikant höher Expression Unterhalb</p>	
<p>GST</p> <p>- Signifikant höher Expression Unterhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=4. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Alle drei Marker-Gene zeigten eine signifikant höhere Expression in der Fischgruppe Unterhalb der ARA. Dies weist auf eine stark erhöhte Schadstoffbelastung durch den Eintrag des Abwassers hin, welches von der Analytik bestätigt wurde. Interessanterweise war Ellikon der einzige Standort bei welchem eine Regulierung von Cyp1a gemessen wurde. Dieses Ergebnis weist auf erhöhte Konzentrationen von z.B. polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) hin.



4.8.14 Immunregulation / Pathogenabwehr

Für diese Biomarker-Gene sind auch die Resultate vom Nierengewebe abgebildet, da diese eine verstärkte Expression in diesem Gewebe im Vergleich zur Mischprobe aufzeigten.

Tabelle 49: Biomarker-Gene für Immunregulation / Pathogenabwehr

Biomarker-Gene	Expression im Nierengewebe 2015
<p style="text-align: center;">TNFa</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	
<p style="text-align: center;">Socs3</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=4. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Für beide Marker-Gene konnten keine Unterschiede zwischen Fischgruppen von Unterhalb und Oberhalb der ARA detektiert werden. Dies weist auf eine vergleichbare Belastung des Immunsystems hin. Vergleichbare Bakterieninfektionsraten zwischen beiden Fischgruppen konnten bei der Fischgesundheitsanalyse (4.8.8) bestimmt werden. Das Immunsystem von beiden Gruppen könnte aber auch durch die verstärkte PKD-Infektion beeinflusst sein.



4.8.15 Metall und Oxidativer Stress

Tabelle 50. Biomarker-Gene für Metall und Oxidativen Stress

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe 2015
<p>MTa</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>MTb</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>Abcc2</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	
<p>Hmox</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>NrF2</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=4. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.



MTa und **MTb** zeigten eine signifikante Erhöhung in der Gruppe Unterhalb der ARA gegenüber Oberhalb. Dies korreliert sehr gut mit den erhöhten Metallkonzentrationen an diesem Standort.

Abcc2 zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Standorten. Abcc2 wird spezifisch im Lebergewebe exprimiert. Die niedrige Expression im Mischgewebe zeigt die geringere Eignung dieser Probe für die Analyse von Abcc2 auf.

Für **Hmox** wurde eine signifikante standortsspezifische Regulierung gemessen. Dies deutet darauf hin, dass diese Fische Unterhalb der ARA einem höheren oxidativen Stress ausgesetzt waren, welcher auch durch die erhöhte Metallbelastung und den geringeren Sauerstoffgehalt hervorgerufen werden kann.

NrF2 zeigte keine Unterschiede zwischen Gruppen Unterhalb und Oberhalb der ARA. Dies ist im Vergleich zu den Ergebnissen von MTa, MTb und Hmox sehr unerwartet, könnte aber durch die Verwendung der Mischprobe bedingt sein.



4.8.16 Endokrine Effekte

Tabelle: 51 Biomarker-Gene für endokrine Effekte

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe
<p>ERa</p> <p>-Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>VTG</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=4. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Für **ERa** wurde eine erhöhte Expression in den Mischgeweben der Gruppe Unterhalb der ARA im Vergleich Oberhalb ermittelt. Dies weist auf einen höheren Gehalt von endokrin wirkenden Substanzen an diesem Standort hin. Diese Resultate korrelieren sehr gut mit der Analyse der organischen Verbindungen, den Ergebnissen des ER-Calux-Tests und der Analyse des VTG-Proteingehalts.

Für **VTG** wurden keine spezifischen Regulierungsmuster zwischen den Fischgruppen erfasst. Dies könnte an der geringen Eignung der Mischprobe liegen, da VTG hauptsächlich in der Leber exprimiert wird.



4.8.17 Metabolismus

Tabelle 52: Biomarker-Gene für Metabolismuseffekte

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe
<p style="text-align: center;">PEPCK</p> <p style="text-align: center;">-Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	
<p>Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=4. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.</p>	

Für **PEPCK** konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Fischgruppen gemessen werden. Dies korreliert mit den Daten zum Ernährungszustand der Fische, welcher in den jeweiligen Gruppen von Oberhalb und Unterhalb sehr divers war.

4.8.18 Principal Component Analysis (PCA) Ellikon

Um die Ergebnisse der Genexpression zwischen Oberhalb und Unterhalb der ARA direkt miteinander zu vergleichen, wurde eine PCA durchgeführt. Ausserdem dient diese Analyse dazu die Sensitivität der molekularen Biomarker-Methode zu überprüfen.

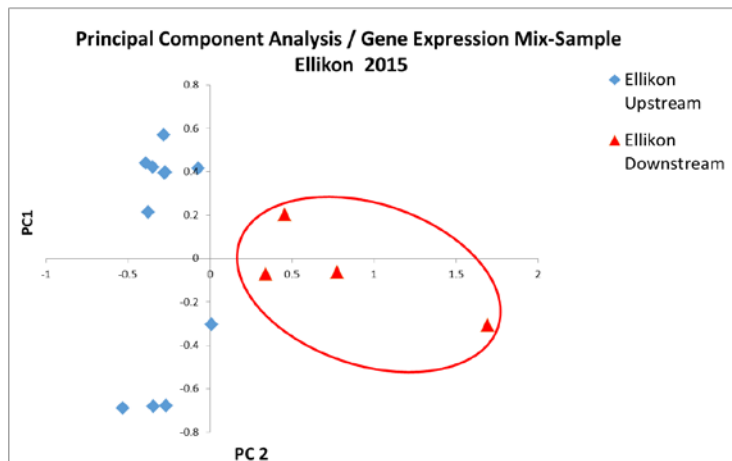


Abbildung 18: Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker in der Mischprobe in allen Bachforellen von Oberhalb und Unterhalb der ARA Ellikon 2015.

Die PCA-Analyse zeigt deutlich auf, dass sich die beiden Fischgruppen stark voneinander abtrennen, was auf den Einfluss des eingeleiteten Abwassers zurückzuführen ist. Ausserdem erkennt man eine höhere Diversität in der Gruppe Oberhalb. Interessanterweise korreliert dies recht gut mit der verstärkten PKD-Infektion der Fische an diesem Standort. Aber auch hier müssen aufgrund der für die beiden Standorte unterschiedlichen Stichprobengrössen die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden.



4.8.19 Schlussfolgerung Ellikon

Vergleichbar zu den Standorten Steinach und Herisau zeigen die Daten, dass die Genexpression standortspezifisch ist. Fische, welche Unterhalb der ARA gefangen wurden, zeigen eine generell erhöhte Stressantwort an. Diese Regulation wird eindeutig durch den Abwassereintrag in den Fluss Älikerbacher hervorgerufen. Die zusätzlich durchgeführten Feldmessungen und Wasseranalysen bestätigten die Ergebnisse der Genexpression.

Es bleibt zu erwähnen, dass die geringe Anzahl an untersuchten Fischen von Unterhalb der ARA einen möglichen Einfluss auf die Aussagekraft haben könnte.



4.9 Ergebnisse Elgg

Für Elgg war eine Beprobung geplant, welche im Oktober 2015 durchgeführt wurde.

4.9.1 Feldparameter:

Tabelle 53: Gemessene Feldparameter in der Eulach (Elgg)

Parameter	Elgg 2015	
	Oberhalb	Unterhalb
Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	472.00 \pm 80.23	763.50 \pm 118.60 *
pH-Wert	8.49 \pm 0.04	7.86 \pm 0.11 *
Wassertemperatur ($^{\circ}\text{C}$)	8.54 \pm 1.58	11.54 \pm 1.42 *
Sauerstoffgehalt (mg/L)	12.51 \pm 0.41	9.40 \pm 0.51 *

Legende: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Feldmessungen im Fluss Eulach Ober- und Unterhalb der ARA-Elgg. Die Messung wurde viermal durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt.

Für alle gemessenen Parameter konnten signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb gemessen werden. Dies zeigt deutlich, dass das eingeleitete Abwasser einen signifikanten Einfluss auf die Wasserqualität Unterhalb der ARA hatte.

4.9.2 Wasserparameter im Labor gemessen

Tabelle 54: Wasserparameter im Labor gemessen

Parameter	Elgg 2015	
	Oberhalb	Unterhalb
Alkalinität (mmol/L)	5.11 \pm 0.85	4.71 \pm 0.75
Gesamthärte (mmol/L)	2.63 \pm 0.41	3.11 \pm 0.55
Nitrat (mg N/L)	1.19 \pm 0.26	9.07 \pm 3.39 *
o-Phosphat ($\mu\text{g}/\text{L}$)	9.00 \pm 4.57	97.43 \pm 44.60 *
Chlorid (mg/L)	14.57 \pm 3.03	112.72 \pm 39.97 *
Sulfat (mg/L)	7.47 \pm 0.88	23.28 \pm 7.78 *
DOC (mg/L)	1.99 \pm 0.37	3.13 \pm 0.42 *

Legende: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Wasserprobenanalysen aus dem im Fluss Eulach Ober- und Unterhalb der ARA-Elgg. Die Messung wurde viermal durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt.



Alkalinität und Gesamthärte:

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb der ARA gemessen werden.

Nitrat, o-Phosphat, Chlorid, Sulfat und gelöster organischer Kohlenstoff (DOC):

Es wurde für alle Substanzen eine signifikant erhöhte Konzentration Unterhalb der ARA gemessen. Dies ist eindeutig auf das eingeleitete Abwasser zurückzuführen.

4.9.3 Schwermetallanalyse

Tabelle 55: Schwermetallanalyse im Fluss Eulach Oberhalb und Unterhalb der ARA

Metalle	Elgg 2015	
	Oberhalb	Unterhalb
Blei ($\mu\text{g/L}$)	0.03 \pm 0.03	0.29 \pm 0.13 *
Cadmium ($\mu\text{g/L}$)	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00
Chrom ($\mu\text{g/L}$)	0.21 \pm 0.03	0.20 \pm 0.02
Mangan ($\mu\text{g/L}$)	1.80 \pm 0.63	6.28 \pm 1.13*
Eisen ($\mu\text{g/L}$)	19.33 \pm 8.70	26.18 \pm 12.05
Nickel ($\mu\text{g/L}$)	0.28 \pm 0.04	0.80 \pm 0.17*
Kupfer ($\mu\text{g/L}$)	1.96 \pm 0.15	4.94 \pm 1.09 *
Zink ($\mu\text{g/L}$)	2.49 \pm 1.68	5.76 \pm 0.88 *
Kobalt ($\mu\text{g/L}$)	0.03 \pm 0.00	0.14 \pm 0.06 *

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Schwermetallanalysen (ICP-MS) gemessen in filtrierten Wasserproben aus dem Fluss Eulach, entnommen von Ober- und Unterhalb der ARA-Elgg. Die Messungen wurden mit vier unabhängigen Wasserproben durchgeführt (n=4). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert und grau hinterlegt.

In den Wasserproben wurden signifikant erhöhte Konzentrationen für Blei, Mangan, Nickel, Kupfer, Zink und Kobalt Unterhalb der ARA im Vergleich zu Oberhalb gemessen. Dies zeigt auf, dass durch den Abwassereintrag die Konzentration dieser Metalle erhöht wird.

4.9.4 Analyse von organische Mikroverunreinigungen

In Zusammenarbeit mit dem Eawag Department Umweltchemie (Uchem) wurden 2015 Wassersammelproben über sieben Tage, von Oberhalb und Unterhalb der ARA, generiert. Die Wasserentnahme endete genau an dem Tag der Fischbeobachtung (16.10.2015). Diese Sammelproben wurden mit Hilfe eines ISCO-Sampler gewonnen. Die erhaltenen Wassersammelproben wurden in Labor auf 57 organische Mikroverunreinigungen hin untersucht.



Tabelle 56: Analyse von 57 Mikroverunreinigungen in Wochensammelproben. **Rot:** Zunahme der Konzentration Unterhalb im Vergleich zu Oberhalb. **Leere Zellen:** Werte <LOQ (Unterhalb der Bestimmungsgrenze) **Fett:** Substanz wurde mit einem strukturidentischen isotope-markierten internen Standard gemessen. Werte ohne eigenen internen Standard haben grössere Unsicherheiten.

Substanzinformation					Concentrations in ng/L		
Wirkstoff	CAS-No	ID	Wirkstoffgruppe	Untergruppe Wirkstoffklasse	LOQ	Elgg Oberhalb 2015	Elgg Unterhalb 2015
4-/5-Methyl-Benzotriazol	136-85-6	167	Korrosionsschutzmittel		1	23	740
Amisulprid	71675-85-9	2852	Pharmazeutika	Neuroleptikum	2	0.9	100
Atenolol	29122-68-7	169	Pharmazeutika	Beta-blocker	2		190
Atrazin	1912-24-9	288	Pestizid	Herbizid	1	7.2	17
Azoxystrobin	131860-33-8	89	Pestizid	Fungicide	1	1.7	
Benzotriazol	95-14-7	166	Korrosionsschutzmittel		3	30	1200
Boscalid	188425-85-6	2938	Pestizid	Fungicide	5		
Candesartan	139481-59-7	2804	Pharmazeutika	Sartan	1	2.2	400
Carbamazepin	298-46-4	194	Pharmazeutika	Antiepileptic	4		290
Carbendazim	10605-21-7	278	Biozid	Fungicide	0.5	1.8	13
Chlorpyrifos	2921-88-2	2950	Pestizid	Insecticide	7		
Chlorpyrifos-methyl	5598-13-0	2951	Pestizid	Insecticide	35		
Chlortoluron	15545-48-9	273	Pestizid	Herbizid	1		
Citalopram	59729-33-8	2901	Pharmazeutika	Antidepressivum	2.5	0.9	120
Clarithromycin	81103-11-9	191	Pharmazeutika	Antibiotic	4.5	1.3	180
Climbazol	38083-17-9	2739	Personal Care Product		1		22
Clothianidin	210880-92-5	2933	Pestizid	Insecticide	2		
Coffein	58-08-2	303	Tracer		8	32	72
Cyproconazol	94361-06-5	86	Pestizid	Fungicide	2	1.1	1.6
Cyprodinil	121552-61-2	148	Pestizid	Fungicide	0.5	0.5	
Diazinon	333-41-5	293	Pestizid	Insecticide	0.5		1.8
Diclofenac	15307-86-5	201	Pharmazeutika	Anti-inflammatory	5	10	1300
Dimethoat	60-51-5	2761	Pestizid	Insecticide	1		
Diuron	330-54-1	292	Biozid	Herbizid	2	11	27
Epoxyconazol	133855-98-8	95	Pestizid	Fungicide	0.5		
Fexofenadin	83799-24-0	3019	Pharmazeutika	Antihistaminikum	4		7.1
Fipronil	120068-37-3	2666	Pestizid	Insecticide	1		
Gabapentin	60142-96-3	2561	Pharmazeutika	Antiepileptic	200		500
Hydrochlorothiazid	58-93-5	2610	Pharmazeutika	Diuretic	1	6.7	760
Imidacloprid	138261-41-3	2709	Pestizid	Insecticide	2		15
Iopromid	73334-07-3	242	Pharmazeutika	Contrast medium	35		
Iprovalicarb	140923-17-7	2936	Pestizid	Fungicide	2		
Irbesartan	138402-11-6	2774	Pharmazeutika	Sartan	2		130
Isoproturon	34123-59-6	286	Pestizid	Herbizid	1.5		2.4
Lamotrigin	84057-84-1	2676	Pharmazeutika	antiepileptics	1		450
Mecoprop	93-65-2	308	Pestizid	Herbizid	5	4.4	32
Methoxyfenozid	161050-58-4	2935	Pestizid	Insecticide	1		
Metoprolol	37350-58-6	172	Pharmazeutika	Beta-blocker	1		200
Metribuzin	21087-64-9	90	Pestizid	Herbizid	0.5		
Oxazepam	604-75-1	2743	Pharmazeutika	Seditativ	4	2	190
Penconazol	66246-88-6	3107	Pestizid	Insecticide	0.7		
Pirimicarb	23103-98-2	2711	Pestizid	Insecticide	7		
Propamocarb	24579-73-5	2945	Pestizid	Fungicide	0.9	1.1	2
Propiconazol	60207-90-1	212	Pestizid	Fungicide	1		1.9
Simazin	122-34-9	262	Pestizid	Herbizid	1	2.2	4.7
Sitagliptin	486460-32-6	2903	Pharmazeutika	Antidiabetikum	45	1.8	440
Sucralose	56038-13-2	703	Lebensmittelzusatzstoff	Suessungsmittel	10	63	2900
Sulfamethoxazol	723-46-6	298	Pharmazeutika	Antibiotic	2		95
Tebuconazol	107534-96-3	327	Pestizid	Fungicide	2		2.5
Terbutryn	886-50-0	306	Biozid	Herbizid	1.5	0.7	1.8
Terbutylazin	5915-41-3	284	Pestizid	Herbizid	0.5	3.4	4
Thiacloprid	111988-49-9	2954	Pestizid	Insecticide	2		
Thiamethoxam	153719-23-4	2941	Pestizid	Insecticide	6		ND
Torasemid	56211-40-6	3145	Pharmazeutika	Schleifendiuretika	4		71
Valsartan	137862-53-4	2583	Pharmazeutika	Angiotensin II antagonist	7	2.3	120
Venlafaxin	93413-69-5	645	Pharmazeutika	Antidepressant	1		81
Vildagliptin	274901-16-5	3146	Pharmazeutika	Antidiabetikum	2		48

Die Analyse der organischen Mikroverunreinigungen zeigt deutlich, dass 2015 fast alle analysierten Substanzen eine deutlich erhöhte Konzentration in den Wasserproben von Unterhalb der ARA aufwiesen. Dies bestätigt, dass die Abwasseraufbereitung diese Stoffe nicht effizient eliminieren bzw. herausfiltern konnte und durch den Abwassereintrag die Konzentrationen in den Gewässern signifikant erhöht werden.



4.9.5 Untersuchung des Östrogenen Potentials in den Wasserproben

Mittels dem ER-CALUX –Test wurde das Östrogenpotential in entnommenen Wasserproben von Oberhalb und Unterhalb der ARA-Elgg untersucht. In diesem Fall wurden nur zwei von drei unabhängigen Wasserproben untersucht, da bei einer Beprobung höchstwahrscheinlich ein Fehler unterlief.

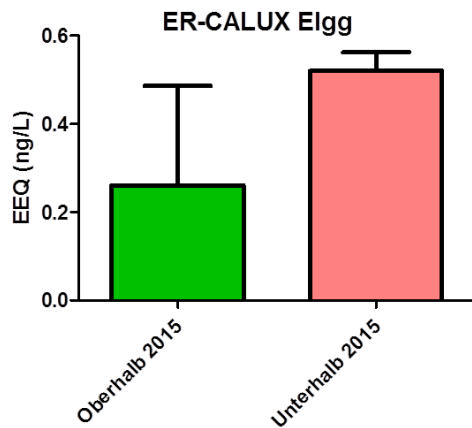


Abbildung 19: ER-CALUX Test durchgeführt mit zwei unabhängigen Wasserproben pro Standort ($n=2$). EEQ = Östradiol-Äquivalenz-Konzentration. Signifikanzanalyse wurde mittels t -Test durchgeführt.

Die Ergebnisse von 2015 zeigen ein erhöhtes Östrogenpotential in den Wasserproben von Unterhalb der ARA im Vergleich zu Oberhalb, welches jedoch nicht signifikant war.



4.9.6 Fischbeprobung

Mittels Elektrofischen wurden 2015 jeweils 12 juvenile Bachforellen pro Standort gefangen und untersucht. In den folgenden Tabellen sind Geschlecht, Länge, Gewicht und Lebergewicht der gefangenen Fische dargestellt.

Tabelle 57: Übersicht der gefangenen Bachforellen 2015. M = Männchen, F = Weibchen und j = juveniler Fisch noch keine eindeutigen Geschlechtsmerkmale ausgebildet

Eulach Oberhalb der ARA Elgg 2015				
Fischnr.	Länge (cm)	Gewicht (g)	Lebergewicht (g)	Sex
1	12.5	19.3	0.19	F
2	10.8	12.0	0.17	F
3	11.2	14.0	0.16	M
4	9.5	8.6	0.20	F
5	12.2	17.5	0.24	M
6	16.8	42.3	0.37	M
7	12.4	17.3	0.17	M
8	12.1	17.0	0.17	j (?)
9	12.4	18.2	0.17	M
10	11.0	12.7	0.18	F
11	10.5	12.6	0.18	j (?)
12	10.7	11.4	0.11	F
Eulach Unterhalb der ARA Elgg 2015				
1	13.4	22.2	0.28	M
2	11.0	12.9	0.14	M
3	11.8	16.8	0.24	M
4	11.9	18.0	0.28	j (?)
5	11.1	15.5	0.20	M
6	10.7	13.1	0.17	M
7	13.0	21.6	0.18	F
8	9.1	8.5	0.10	j (?)
9	10.0	10.1	0.26	F
10	9.7	9.3	0.36	j (?)
11	10.5	11.5	0.25	M
12	12.4	19.0	0.22	F



4.9.7 Vitellogenin (VTG)-Proteingehalt im Lebergewebe

Als weiterer Marker für den Einfluss von östrogenaktiven Substanzen wurde die Vitellogenin-Proteinkonzentration im Lebergewebe von männlichen Fischen bestimmt.

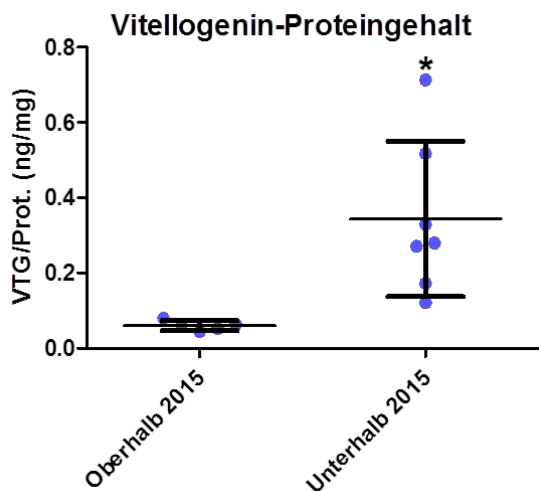


Abbildung 20: Dargestellt ist der Proteingehalt von Vitellogenin pro mg Gesamtprotein gemessen im Lebergewebe von männlichen (Blau markiert) Fischen (Oberhalb n=5, Unterhalb n=7). Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test durchgeführt und signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Die Ergebnisse von 2015 zeigen einen signifikant erhöhten Vitellogeningehalt in den Leberproben der männlichen Fische von Unterhalb der ARA. Dies deutet auf eine erhöhte Belastung mit östrogenaktiven Substanzen hin.

4.9.8 Fischgesundheit

Die Untersuchungen zur Fischgesundheit wurden von der Arbeitsgruppe von Helmut Segner (Uni. Bern) durchgeführt. In diesem Bericht werden die wichtigsten Schlussfolgerungen präsentiert, welche aus den einzelnen Gesundheitsberichten entnommen wurden. Die vollständigen Gesundheitsberichte sind im Anhang enthalten.

Zusammenfassung Fischgesundheit 2015:

Auch in Elgg muss für beide Standorte das teilweise noch akute und teilweise bereits abgeklungene PKD-Geschehen als Hauptbefund betrachtet werden, denn auch hier waren der Bakterien- und Parasitenbefall klinisch eher unbedeutend. Wie bereits in Ellikon fanden sich bei den Fischen mit akuter PKD-Erkrankung nicht nur massive Nierenschäden, sondern auch starke Schädigungen der Lebern. Die LSI-Werte (Lebersomatischer Index) scheinen auch hier mit den Leberschädigungen zu korrelieren.

In Elgg war das PKD-Geschehen Unterhalb der ARA stärker ausgeprägt. Eventuell könnten die Einleitungen der ARA für die Bryozoen zu besseren Umweltbedingungen geführt haben, wodurch sich die PKD-Erreger *T. bryosalmonae* allenfalls an jenem Standort stärker verbreiten konnten.

Sowohl für die Ellikon- wie auch für die Elgg-Standorte bleibt noch zu erwähnen, dass für die Jahreszeit noch erstaunlich viele Fische mit akuter PKD-Erkrankung gefunden werden konnten.



4.9.9 Biomarker-Genexpression

Im Folgenden werden die Ergebnisse entsprechend der zellulären Funktionen der Gene präsentiert. Dargestellt ist die Genexpression in der Mischprobe, ausser für TNFa und Socs3, bei denen die Daten der Nierengewebe dargestellt werden.

4.9.10 Allgemeiner Stress

Tabelle 58: Biomarker-Gene für allgemeinen Stress

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe 2015
<p>HSP70</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	
<p>Abcb1</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>PXR</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Für **HSP70** wurde keine signifikant höhere Expression in der Fischgruppe von Unterhalb der ARA gemessen. Wie bei Ellikon ist dies etwas unerwartet, da ein deutlicher Temperaturunterschied zwischen beiden Standorten gemessen wurde.

Abcb1 zeigte eine signifikant erhöhte Expression in der Fischgruppe von Unterhalb der ARA im Vergleich zu den Fischen von Oberhalb. Dies spiegelt die generell erhöhten Konzentrationen der verschiedenen organischen Verbindungen von Unterhalb wieder, welche potentielle Substrate dieses „universalen Xenobiotika-Transporters“ darstellen.



PXR zeigte eine signifikante Regulierung der Expression zwischen beiden Fischgruppen. Dies zeigt eine höhere Belastung mit Schadstoffen Unterhalb der ARA an. Dieses ist die einzige signifikante Regulierung von PXR im Vergleich zu den anderen Beprobungen (Steinach, Hertsch und Ellikon), was durch ein anderes Belastungsprofil ausgelöst worden sein könnte.

4.9.11 Zellzyklus /Apoptose/ Karzinogenese

Tabelle 59: Biomarker-Gene Zellzyklus, Apoptose und Karzinogenese

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe 2015
<p>p53</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>C-fos</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	
<p>C-myc</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Im Vergleich zu Ellikon konnten für **p53** signifikante Unterschiede in den Mischproben der Gruppe Unterhalb der ARA gegenüber Oberhalb gemessen werden. Daher ist davon auszugehen dass die Gewebeschädigung durch die PKD-Infektion nicht der Hauptauslöser der Regulierung sein kann. Diese Regulierung scheint eher durch einen erhöhten Eintrag von genotoxisch wirkenden Stoffen hervorgerufen worden zu sein. Vergleiche zu Ellikon können aber, wegen der geringen Fischanzahl Unterhalb, nur bedingt gezogen werden.

C-fos zeigte keine standortabhängigen Regulierungsmuster.

Dagegen konnte für **C-myc** eine signifikant erhöhte Expression in den Fischen von Unterhalb der ARA gemessen werden. Dies könnte durch die erhöhte Schadstoffbelastung hervorgerufen worden sein und deutet auf eine erhöhte Konzentration von karzinogen wirkenden Stoffen hin.



4.9.12 Biotransformation

Tabelle 60: Biomarker-Gene für Biotransformation von Schadstoffen

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe 2015
<p>Cyp1a</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	
<p>Cyp3a</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>GST</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Cyp3a und **GST** zeigten eine signifikant höhere Expression in der Fischgruppe Unterhalb der ARA. Dies weist auf eine stark erhöhte Schadstoffbelastung durch den Eintrag des Abwassers hin, welche von der Analytik bestätigt wurde.



4.9.13 Immunregulation / Pathogenabwehr

Für diese Biomarker-Gene sind auch die Resultate vom Nierengewebe abgebildet, da diese eine verstärkte Expression in diesem Gewebe im Vergleich zur Mischprobe aufzeigten.

Tabelle 61: Biomarker-Gene für Immunregulation / Pathogenabwehr

Biomarker-Gene	Expression im Nierengewebe 2015
<p style="text-align: center;">TNFa</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	
<p style="text-align: center;">Socs3</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Für **TNFa** konnten keine Unterschiede zwischen Fischgruppen von Unterhalb und Oberhalb der ARA detektiert werden. Für **Socs3** konnte zwar eine signifikant erhöhte Expression in der Gruppe Unterhalb der ARA gemessen werden. Dies wurde aber durch die stark erhöhte Expression von einem Tier verursacht. Daher kann man von einer vergleichbaren Belastung des Immunsystems ausgehen, was auch mit den Fischgesundheitsdaten korreliert.



4.9.14 Metall und Oxidativer Stress

Tabelle 62. Biomarker-Gene für Metall und Oxidativen Stress

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe
<p>MTa</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	
<p>MTb</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>Abcc2</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>Hmox</p> <p>- Kein signifikanter Unterschied zwischen Unterhalb und Oberhalb</p>	
<p>NrF2</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zw. Ober- und Unterhalb sind mit * markiert.



MTb, Abcc2 und NrF2 zeigten eine signifikante Erhöhung in der Gruppe Unterhalb der ARA gegenüber Oberhalb. Dies korreliert sehr gut mit den erhöhten Metallkonzentrationen an diesem Standort und zeigt an, dass die Fische einen höheren oxidativen Stress ausgesetzt waren.

Für **MTa** und **Hmox** finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen von Oberhalb und Unterhalb.

4.9.15 Endokrine Effekte

Tabelle: 63 Biomarker-Gene für endokrine Effekte

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe 2015
<p>ERa</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	
<p>VTG</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=12. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün = Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Für **ERa** wurde eine erhöhte Expression in den Mischgeweben der Gruppe Unterhalb der ARA im Vergleich zu Oberhalb ermittelt. Dies weist auf einen höheren Gehalt von endokrin wirkenden Substanzen an diesem Standort hin. Diese Resultate korrelieren sehr gut mit der Analyse der organischen Verbindungen, den Ergebnissen des ER-Calux-Tests und der Analyse des VTG-Proteingehalts.

Im Vergleich zu Ellikon wurde für **VTG** ein spezifisches Regulierungsmuster zwischen den Fischgruppen erfasst. Dies könnte an der höheren Anzahl von untersuchten Tieren liegen. Die generellen Expressionswerte sind aber auch in diesem Fall viel geringer im Vergleich zu den im Lebergewebe gemessenen Werten von anderen Standorten.



4.9.16 Metabolismus

Tabelle 64: Biomarker-Gene für Metabolismuseffekte

Biomarker-Gene	Expression im Mischgewebe 2015
<p>PEPCK</p> <p>- Signifikant höhere Expression Unterhalb</p>	

Legende: Dargestellt sind die Expressionswerte von jedem analysierten Fisch. Oberhalb der ARA n= 12 und Unterhalb der ARA n=4. Die Farben geben die Geschlechter der Fische wieder, Blau = Männchen, Rot = Weibchen und Grün =Juvenile. Des Weiteren sind Mittelwerte der Expression aller Fische und die Standardabweichung dargestellt. Signifikanzanalyse wurde mittels t-Test (GraphPad) durchgeführt, signifikante Unterschiede zwischen Oberhalb und Unterhalb sind mit * markiert.

Für **PEPCK** konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Fischgruppen gemessen werden. Dies deutet auf einen schlechteren Ernährungszustand der Tiere Unterhalb der ARA hin. Bei der Erhebung der Fischgesundheit wurden vermehrt kleinere Fische Unterhalb erfasst, dies wird aber begründet durch die unterschiedlichen Altersstrukturen in den Fischen von Oberhalb.

4.9.17 Principal Component Analysis (PCA) Elgg

Um die Ergebnisse der Genexpression zwischen Oberhalb und Unterhalb der ARA direkt miteinander zu vergleichen wurde eine PCA durchgeführt. Ausserdem dient diese Analyse dazu die Sensitivität der molekularen Biomarker-Methode zu überprüfen.

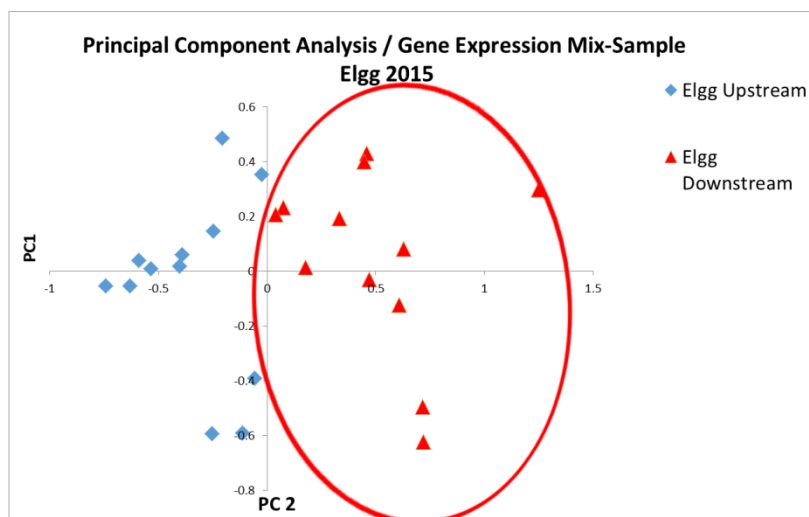


Abbildung 21: Principal Component Analyse aller getesteten Biomarker in der Mischprobe in allen Bachforellen von Oberhalb und Unterhalb der ARA Elgg 2015.

Die PCA-Analyse zeigt deutlich auf, dass sich die beiden Fischgruppen stark voneinander abtrennen, was auf den Einfluss des eingeleiteten Abwasser zurückzuführen ist.



4.9.18 Schlussfolgerung Elgg

Auch an diesem Standort konnte der Einfluss des eingeleiteten Abwassers auf die wildgefangenen Bachforellen eindeutig mittels Genexpressionsanalyse nachgewiesen werden. Fische, welche Unterhalb der ARA gefangen wurden, zeigen eine generell erhöhte Stressantwort an. Die zusätzlich durchgeführten Feldmessungen und Wasseranalysen konnten die Ergebnisse der Genexpression sehr gut bestätigen.



4.10 Zelllinienversuche

In diesem Projekt wird versucht, das molekulare Biomonitoring auf etablierte Fischzelllinien anzuwenden. Diese stellen eine tierfreie, kostengünstigere und schnellere Alternative für diese Methode dar im Vergleich zu den Fischtests. Dabei werden permanente Zelllinien der Regenbogenforelle eingesetzt, welche direkt im Labor mit Wasserproben, die an den Feldstandorten gewonnen wurden, für maximal 24h exponiert werden.

Anschliessend wird in diesen Zellen die Expression des gleichen Biomarker-Gensets wie in den wildgefangenen Bachforellen gemessen. Stimmen die biologischen Antworten überein, könnten die Fischzellen zukünftig die Versuche mit Fischen ersetzen.

Es wurden permanente Kiemen- (RTgill-W1, Bols et al., 1994) und Leber- (RTL-W1, Lee et al., 1993) Zelllinien der Regenbogenforelle für diese Tests verwendet. Die Kiemenzellen wurden verwendet, da diese Zellen als Alternativmethode zur Vorhersage der akuten Fischtoxizität gut etabliert sind (Tanneberger et al., 2013). Der RTgill-W1 Zelllinientest wurde bereits als ISO-Richtlinie vorgeschlagen und von den Vertretern der Mitgliedsstaaten als „Working/Committee Draft“ akzeptiert. Die Leberzellen wurden vor allem hinsichtlich ihrer guten Biotransformationseigenschaften ausgewählt.

4.10.1 Material und Methoden

Permanente Kiemen- (RTgill-W1) und Leber- (RTL-W1) Zelllinien der Regenbogenforelle wurden 48 h nach dem Aussäen in 6-well Platten mit jeweils 8 mL Flusswasserproben von Ober- und Unterhalb der ARAs exponiert. Es wurden Expositionszeiträume von 4 und 24 h untersucht. Um eine direkte Exposition der Zellen mit den Testwässern zu ermöglichen, wurden diese, angelehnt an Dayeh et al. (2002) mit den Salz- und organischen Komponenten des proteinfreien Expositionsmediums L-15/ex versetzt und anschliessend mit einer Glasfilter-Apparatur und 0,22 µm Membran filtriert, um Mikroorganismen zu entfernen. Die Leberzelllinie RTL-W1 bedingt die Zugabe von mindestens 1 % fötalem Kälberserum (FBS) zum Expositionsmedium für eine vollumfängliche Zellvitalität. Es wurden 1 und 2.5 % FBS-Zugabe getestet. Für die Exposition der Kiemenzelllinie RTgill-W1 ist keine FBS-Zugabe erforderlich.

Nach Expositionsende wurden die Testwässer entfernt und die Zellen direkt in Lysis-Puffer überführt und weiterhin für die RNA-Isolation und Genexpressionsanalysen exakt wie die Fischgewebeproben bearbeitet.

4.10.2 Ergebnisse und Interpretation

Ende 2014 wurden erste Expositionsversuche mit frischen Wasserproben von der Steinach durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten vor allem für Biotransformations-Marker eine gute Übereinstimmung mit den Fischdaten. Vergleichbar zu den Fischergebnissen konnte eine erhöhte Expression in den Zellen, welche mit Wasserproben von Unterhalb der ARA exponiert wurden, im Vergleich zu Oberhalb gemessen werden (siehe Abb. 22).

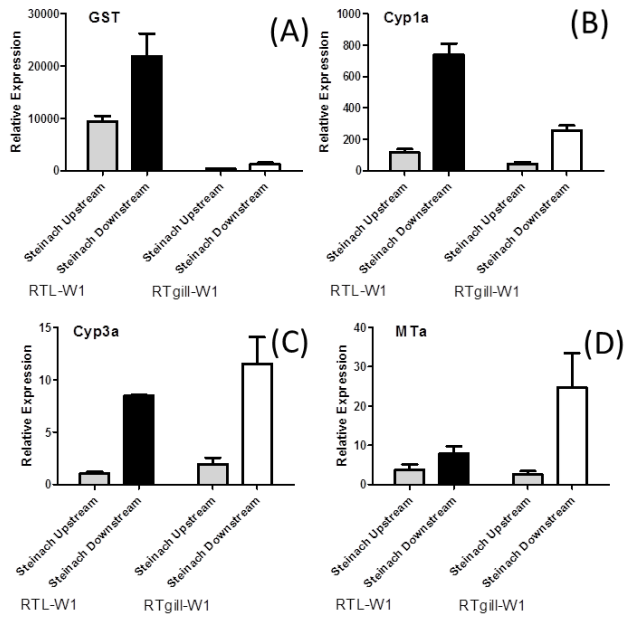


Abbildung 22: 24 h Exposition von RTL-W1 und RTgill-W1 Zellen mit frischen Wasserproben aus der Steinach 2014. A) GST Expression, B) Cyp1a Expression, C) Cyp3a Expression und D) MTa Expression.

Fortführend wurde in diesem Projekt versucht, den Wasser-Fischzelllinien-Test weiter zu etablieren und alle Testparameter genau zu untersuchen damit ein stabiles und aussagkräftiges System gewährleistet werden kann. Um dies zu erreichen wurden folgende Parameter untersucht:

- **Expositionsdauer und Zelllinienpassage**
- **Zelllinienmedium / Serumkonzentration**
- **Probenlagerung**

Expositionsdauer und Zelllinienpassage:

Um zu untersuchen, welche Expositionsdauer am besten geeignet ist um signifikante Regulationsmuster in den Zellen zu detektieren, wurden 4h und 24h getestet (siehe Abb. 23). Ausserdem wurde für die Leberzellen getestet, welchen Einfluss die Zelllinienpassage auf die Genexpression haben kann. Ältere Passagen (P80-100) könnten geringere Biotransformationseigenschaften aufzeigen im Vergleich zu jüngeren Passagen (P25-40).

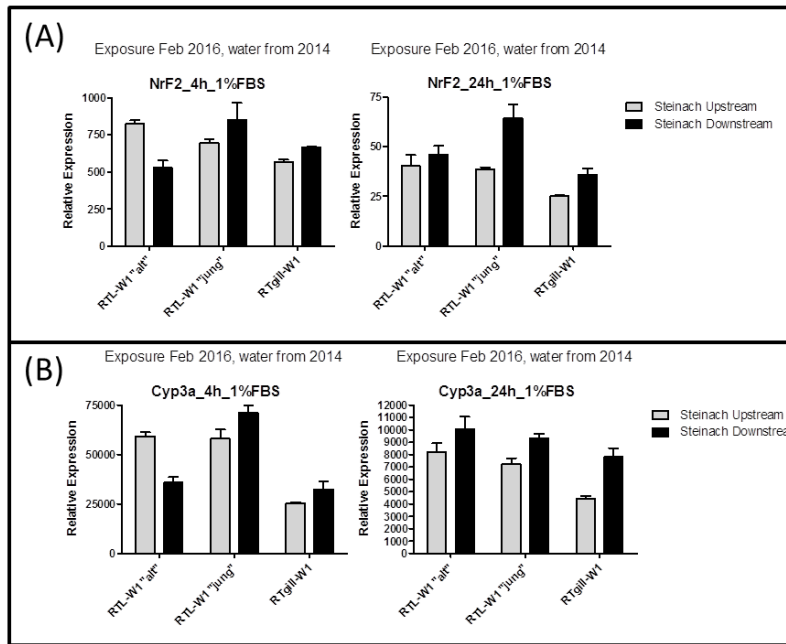


Abbildung 23. Vergleich 4h und 24 h Exposition von RTL-W1 und RTgill-W1 Zellen mit Wasserproben aus der Steinach 2014. Zusätzlich Vergleich zwischen älteren und jüngeren Passagen der RTL-W1 Zellen. A) NrF2 Expression, B) Cyp3a Expression.

Die Ergebnisse für die 4h Exposition zeigten für die meisten getesteten Gene eine erhöhte Expression im Vergleich zur 24h Exposition. Dafür waren eindeutigeren Regulierungsmuster der Genexpression nach 24h Exposition erkennbar. Der Vergleich zwischen jüngeren und älteren Passagen der RTL-W1 Zellen zeigte eine bessere Eignung der jüngeren Passagen auf. Bei älteren Passagen wurden zum Teil geringere Unterschiede zwischen den Behandlungen erfasst und auch nicht erklärbare Verschiebungen der Genexpressionsmuster zwischen den Behandlungen gemessen.

Auf Grund der signifikanteren Regulationsmuster wurde die Expositionsdauer auf 24h festgelegt und die Verwendung von älteren RTLW-1 Passagen ausgeschlossen.

Effekt der Serumkonzentration im Zelllinienmedium für RTL-W1 Zellen:

Zum Erhalt der vollen Zellvitalität der Leberzelllinie RTL-W1 ist die Zugabe von fötalem Kälberserum (FBS) zum Expositionsmedium essentiell. FBS kann jedoch die Verfügbarkeit von Chemikalien durch verstärkte Proteinbindung im Expositionsmedium herabsetzen. Daher war es notwendig, verschiedene Konzentrationen von FBS zu testen (siehe Abb. 24).

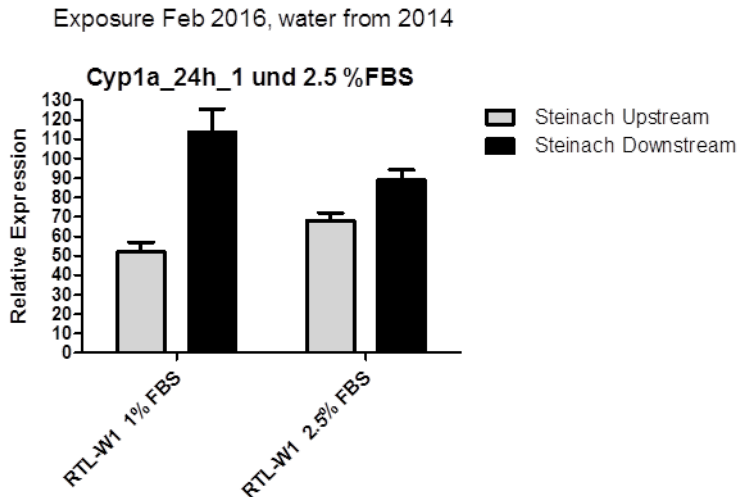


Abbildung 24. Dargestellt ist die Expression von Cyp1a nach 24 h Exposition von RTL-W1 mit Wasserproben aus der Steinach 2014. Es wurde die Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen an FBS getestet.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig auf, dass die Konzentration an FBS einen Einfluss auf die Regulierungsintensität hat. Spezifischere Unterschiede konnten in den Leberzellen gemessen werden, welchen eine geringere Konzentration an FBS hinzugefügt wurde. Bei höheren Konzentrationen an FBS waren die Unterschiede zwischen den Behandlungen viel geringer. Dies bestätigt, dass die Proteine im FBS vermehrt Substanzen binden und somit die Verfügbarkeit dieser Stoffe verringert wird.

Anhand dieser Ergebnisse werden die Wasserexpositionen der RTL-W1 Zellen mit 1% FBS durchgeführt.

Effekt durch Probenlagerung:

Um zu beurteilen, ob die Wasserprobenlagerung einen Einfluss auf die Resultate der Genexpressionsanalysen in den Zellen haben kann, wurden frische Wasserproben mit eingefrorenen verglichen (Lagerung bei -20°C).

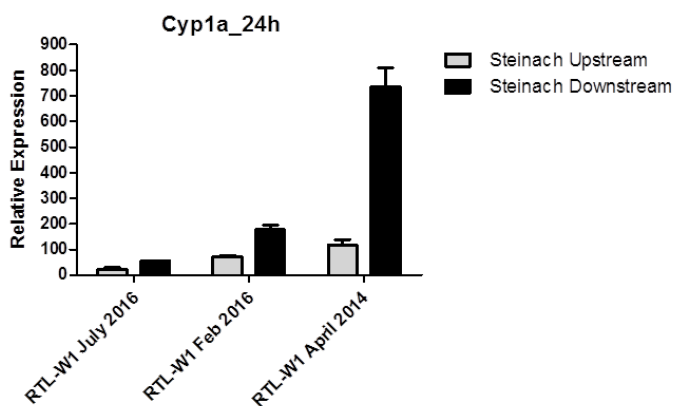


Abbildung 25. Dargestellt ist die Expression von Cyp1a nach 24 h Exposition von RTL-W1 Zellen (1% FBS) mit Wasserproben aus der Steinach 2014. Getestet wurden frische Wasserproben aus dem Feld (April 2014) und bei -20 °C eingelagerte Wasserproben (Februar und Juli 2016).



Die Ergebnisse zeigen, dass die Wasserprobeneinlagerung einen Effekt auf die Expressionsintensität haben kann. Generell konnte für fast alle Marker-Gene eine geringere Induktion der Genexpression nach längerer Lagerung (>6 Monate) gemessen werden. Für Biotransformationsmarker konnten zwar auch nach der längeren Lagerung immer noch standortsabhängige Regulationsmuster detektiert werden, dafür konnten keine Unterschiede mehr für oxidativen Stress oder Immunantworten erfasst werden. Dies zeigt deutlich auf, dass Einfrieren und Auftauen der Wasserproben einen essentiellen Einfluss auf die Analyse hat.

Da alle genierten Wasserproben von den einzelnen Standorten, mit der Ausnahme von Herisau 2014, zuerst bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden, könnte dies erklären, warum für die meisten Biomarker-Gene kaum expositionsabhängige Genregulierungen gemessen wurden. Daher werden zukünftig nur noch frische Wasserproben für diesen Test verwendet.

Nichtsdestotrotz, konnten vor allem Effekte auf den Schadstoffmetabolismus in Abhängigkeit zum Wasserprobenentnahmeort detektiert werden (siehe Abb. 26).

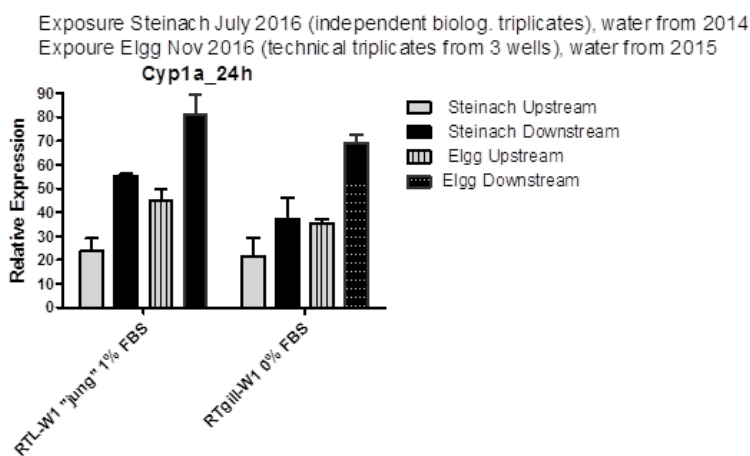


Abbildung 26. Dargestellt ist die Expression von Cyp1a nach 24 h Exposition mit eingefrorenen ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) Wasserproben von Steinach 2014 und Elgg 2015 für RTL-W1 Zellen (1% FBS).

4.10.3 Schlussfolgerungen und Ausblick Zelllinienversuche

Die Genexpressionsanalyse in den exponierten Fischzelllinien zeigte auf, dass fast alle Biomarker-Gene, welche in den Fischen untersucht wurden, auch in diesem in-vitro System exprimiert und messbar sind. Vergleichbare Regulationsmuster der Genexpression zu den Fischdaten konnten mehrheitlich nur bei Exposition mit frischen Wasserproben gemessen werden. Die Lagerung der Wasserproben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hatte einen eindeutigen Einfluss auf die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse. Eine Ausnahme waren Marker-Gene für die zelluläre Biotransformation von Schadstoffen welche auch nach Exposition mit eingefrorenen Wasserproben zwar geringere Expressionslevel aber spezifische Regulationsmuster aufzeigten.

Derzeit wird weiter an der Etablierung des Biomarker-Zelllinien-Wassertests gearbeitet. In Kooperation zwischen dem Eawag Department Umwelttoxikologie (Utox) und dem Oekotoxzentrum werden frische Wasserproben aus dem NAWA SPEZ 2017 Projekt (BAFU gefördertes Projekt) verwendet, um den Zelllinientest weiter zu etablieren. Diese Tests werden kostenneutral durchgeführt und die Ergebnisse werden dem BAFU nach Abschluss zur Verfügung gestellt. Des Weiteren sind Versuche mit frischen Wasserproben, welche Unterhalb und Oberhalb von Kläranlagen entnommen werden, geplant. Geeignete Standorte für die Wasserprobenentnahme sind Hochdorf, Dürnten und Buttisholz.



5 ALLGEMEINE SCHLUSSFOLGERUNG

Insgesamt konnte mittels dem durchgeführten molekularen Biomonitoring die subletalen Effekte in den Fischen, welche durch die Exposition mit aufgereinigtem Abwasser hervorgerufen werden, gut detektiert werden.

Arbeitspaket 1: Exposition von juvenilen Regenbogenforellen unter standardisierten Bedingungen

Im ARA-Neugut-Projekt konnte die Leistungsfähigkeit der erweiterten Abwasserbehandlung durch Ozonung bestätigt werden. Es ist eindeutig, dass die Ozonung die Toxizität des biologisch gereinigten Abwassers effizient verringert. Induzierte subletale Effekte in den Regenbogenforellen, wie Aktivierung des Schadstoffmetabolismus, verstärkte Immunantworten oder endokrine Wirkungen durch biologisch behandeltes Abwasser waren nach der Ozonung signifikant reduziert.

Bei der Testung der unterschiedlichen Nachbehandlungsmethoden zur Ozonung konnte testübergreifend die gute Eignung der frischen granulierten Aktivkohle (GAK2) bestätigt werden.

Arbeitspaket 2. Feldversuche mit wildgefangenen Bachforellen

Die Ergebnisse aller Feldversuche (Steinach, Herisau, Ellikon und Elgg) zeigten eine spezifische Regulation der Genexpression in den Fischen auf. Fische, welche Unterhalb der Kläranlagen gefangen wurden, zeigen eine erhöhte Stressantwort an. Zudem konnten aufgrund der Genexpression spezifische Gruppen von Chemikalien identifiziert werden, wie Schwermetalle, endokrine Disruptoren, Pharmaka oder Pestizide, wodurch eine Bewertung der Wasserqualität möglich ist. Diese Ergebnisse konnten durch die begleitenden Wasseranalysen sehr gut verifiziert werden.

Geringere Korrelationen ergaben sich aus dem Vergleich der Expressionsdaten mit den Daten zur Fischgesundheit. Dennoch konnten mittels der Genexpressionsanalyse Hinweise auf einzelne gesundheitlich schwer beeinträchtigte Fische erhalten werden. Nichtsdestotrotz könnten, basierend auf der Analyse des Biomarkergensets, Vorhersagen von potentiellen Gesundheitseffekten möglich sein, besonders für die Erfassung von subletalen Effekten wie z.B. der Beeinflussung der Hormonregulierung (Endokrine Effekte).

Des Weiteren ist diese Testmethode weniger komplex und ressourcenintensiv als beispielsweise eine Analyse des gesamten Transkriptoms. Ausserdem ist sie sehr flexibel hinsichtlich der einzelnen Biomarkergene: neue Marker für andere zelluläre Effekte können einfach integriert oder wenig sensitive Marker wieder entfernt werden. Eine einfache Übertragung auf nahe verwandte Arten könnte ohne größeren Etablierungsaufwand durchgeführt werden. Schliesslich könnten auch andere Gewebe auf gleiche Weise analysiert werden, um andere Endpunkte zu erfassen (Neurotox, Wachstum).

Arbeitspaket 3. Zellinientests:

Die Erweiterung des molekularen Biomonitorings auf etablierte Zelllinien vom Fisch stellt eine tiefreife, kostengünstigere und schneller Alternative dar. Die ersten Ergebnisse sind vielversprechend, es bedarf aber noch einiger Etablierungsarbeit um einen routinemässigen Einsatz zu gewährleisten. Vor allem die Wasserprobenlagerung zeigte einen eindeutigen Effekt auf die Resultate der Genexpression.

Zusammenfassung:

Zusammengefasst ist die Expressionsanalyse eines spezifischen Biomarkersets eine sehr vielversprechende Methode für die Beurteilung und Überwachung der Qualität von Oberflächengewässern, gemessen an tatsächlich vorliegenden Effekten in den im Gewässer lebenden Organismen. Durch ihre geringe Komplexität könnte die Methode auch sehr gut als Früherkennungsmethode eingesetzt und, basierend auf den gewonnenen Ergebnissen, spezifische weiterführende Studien durchgeführt werden.



6 AUSBLICK

Für dieses Projekt sind vorerst zwei Publikationen in Bearbeitung, welche die Freilandversuche beinhalten. Arbeitspaket 1 soll mit in eine Gesamtstudien-Publikation zum ARA-Neugut-Projekt eingebunden werden. Eine Veröffentlichung zu den Zelllinienversuchen ist erst nach weiterer Etablierung geplant.

Des Weiteren wird in Kooperation mit dem Eawag Department Umweltchemie die Konzentration bzw. Akkumulation von Mikroverunreinigungen im Fischgewebe (Muskelgewebe) von jedem untersuchten Fisch von allen Standorten analytisch gemessen. Dadurch ist eine direkte Korrelation zwischen gemessenen Wasserkonzentrationen, Aufnahme in den Fisch und entsprechenden Resultaten der Genexpression möglich. Erste Ergebnisse mit Gewebeproben aus der Steinach-Studie zeigen eine gute Korrelation zwischen Stoffakkumulation und Genexpression (Fu et al., 2017 Poster SETAC Europe 2017, Anhang 2).

Ausserdem arbeitet das Eawag Department Umwelttoxikologie an der Etablierung eines Vorhersagemodells zur Bestimmung der Wasserqualität mittels Genexpressionsdaten aus dieser Studie.

7 ANHANG

1. Fischgesundheitsberichte:
 - 1.1 Steinach 2014 und 2015
 - 1.2 Herisau 2015 und 2016
 - 1.3 Ellikon 2015
 - 1.4 Elgg 2015
2. Qiuguo Fu, Poster SETAC Europe 2017



8 REFERENZEN

- Ankley, G.T., A. Miracle, E.J. Perkins & G.P. Daston, (2008) Genomics in Regulatory Ecotoxicology: Applications and Challenges. *CRC Press*: .
- Auman, J.T. & H.L. McLeod, (2008) Applications of genomic tools to colorectal cancer therapeutics. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 10: 548-554.
- Beggel, S., R. Connon, I. Werner & J. Geist, (2011) Changes in gene transcription and whole organism responses in larval fathead minnow (*Pimephales promelas*) following short-term exposure to the synthetic pyrethroid bifenthrin. *Aquatic Toxicology* 105: 180-188.
- Bols, N. C., A. Barlian, M. Chirinotrejo, S. J. Caldwell, P. Goegan and L. E. J. Lee (1994). "Development of a cell-line from primary cultures of rainbow-trout, *Oncorhynchus Mykiss* (Walbraum), gills". *Journal of Fish Diseases* 17: 601-611
- Chauvigné, F., Gabillard, J. C., Weil, C., Rescan, P, Y, (2003) Effect of refeeding on IGF1, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. *Gen Comp Endocrinol.* 207:2679-84.
- Clifford, M.A., K.J. Eder, I. Werner & R.P. Hedrick, (2005) Synergistic effects of esfenvalerate and infectious hematopoietic necrosis virus on juvenile chinook salmon mortality. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1766-1772.
- Connon, R., H.L. Hooper, R.M. Sibly, F.L. Lim, L.H. Heckmann, D.J. Moore, H. Watanabe, A. Soetaert, K. Cook, S.J. Maund, T.H. Hutchinson, J. Moggs, W. De Coen, T. Iguchi & A. Callaghan, (2008) Linking molecular and population stress responses in *Daphnia magna* exposed to cadmium. *Environmental Science and Technology* 42: 2181-2188.
- Connon, R.E., L.S. D'Abronzio, N.J. Hostetter, A. Javidmehr, D.D. Roby, A.F. Evans, F.J. Loge & I. Werner, (2012) Transcription profiling in environmental diagnostics: health assessments in Columbia River basin steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol* 46: 6081-6087.
- Connon, R.E., J. Geist, J. Pfeiff, A.V. Loguinov, L.S. D'Abronzio, H. Wintz, C.D. Vulpe & I. Werner, (2009) Linking mechanistic and behavioral responses to sublethal esfenvalerate exposure in the endangered delta smelt; *Hypomesus transpacificus* (Fam. Osmeridae). *BMC Genomics* 10: 608.
- Cosler, L.E. & G.H. Lyman, (2009) Economic analysis of gene expression profile data to guide adjuvant treatment in women with early-stage breast cancer. *Cancer Investigation* 27: 953-959.
- Denslow, N.D., C. J.K., D. Dix, J. Freedman, C. Helbing, S. Kennedy & P. Williams, (2006) Selection of surrogate animal species for comparative toxicogenomics. In: *Genomic Approaches for Cross-Species Extrapolation in Toxicology. Edited by Benson WH, Di Giulio RT. Portland, Oregon, USA: CRC Press* 33-75.
- Fedorenkova, A., J.A. Vonk, H.J.R. Lenders, N.J. Ouborg, A.M. Breure & A.J. Hendriks, (2010) Ecotoxicogenomics: Bridging the gap between genes and populations. *Environmental Science and Technology* 44: 4328-4333.
- Fischer, S., K. Groh, K. Schirmer & I. Werner, (2014) Wirkungsorientierte Gewässerüberwachung: - Erfassung und Monitoring toxischer Wirkungen von Chemikalien in der Umwelt mit Hilfe molekularer Methoden. *Projektbericht*.
- Floyd, E.Y., J.P. Geist & I. Werner, (2008) Acute, sublethal exposure to a pyrethroid insecticide alters behavior, growth, and predation risk in larvae of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 1780-1787.
- Fu, Q., Fischer, S., Munz, N., Schollee, J., Schirmer, K., Werner, I., Hollender, J., (2017) Bioaccumulation and Effects of Emerging Contaminants in the Aquatic Organism Brown Trout. Poster SETAC Europe 2017 Brüssel
- Hasenbein, M., I. Werner, L.A. Deanovic, J. Geist, E.B. Fritsch, A. Javidmehr, C. Foe, N.A. Fangué & R.E. Connon, (2014) Transcriptomic profiling permits the identification of pollutant sources and effects in ambient water samples. *Sci Total Environ* 468-469: 688-698.
- Heckmann, L.H., R.M. Sibly, R. Connon, H.L. Hooper, T.H. Hutchinson, S.J. Maund, C.J. Hill, A. Bouetard & A. Callaghan, (2008) Systems biology meets stress ecology: Linking molecular and organismal stress responses in *Daphnia magna*. *Genome Biology* 9.



- Holmes, E., T.M. Tsang, J.T.J. Huang, F.M. Leweke, D. Koethe, C.W. Gerth, B.M. Nolden, S. Gross, D. Schreiber, J.K. Nicholson & S. Bahn, (2006) Metabolic profiling of CSF: Evidence that early intervention may impact on disease progression and outcome in schizophrenia. *PLoS Medicine* 3: 1420-1428.
- Hostetter, N., A. Evans, D. Roby, K. Collis, M. Hawbecker, B. Sandford, D. Thompson & F. Loge, (2011) Relationship of external fish condition to pathogen prevalence and out-migration survival in juvenile steelhead. *Transactions of the American Fisheries Society* 140: 1158-1171.
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty G, C., Sumpter, J, P., Tyler, C, R., (2002) Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod.* 66(2):272-81
- Kienle, C., Langer, M., Ganser, B., Gut, S., Schifferli, A., Thiemann, C., Vermeirssen, E., Werner, I., (2017) Biologische Nachbehandlung von kommunalem Abwasser nach Ozonung – ReTREAT: Teilprojekt Biotests. *Projektbericht* (<http://www.ecotoxcentre.ch/news-publications>)
- Kidd, K, A., Blanchfield P,J., Mills K,H., Palace V, P., Evans R, E., Lazorchak J, M., Flick R, W., (2007) Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*;104 (21) 8897-901
- Lee, L. E., CLEMONS, J. H., BECHTEL, D. G., CALDWELL, S. J., HAN, K. B., PASITSCHNIAK-ARTS, M., MOSSER, D. D. & BOLS, N. C. (1993) Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. *Cell Biol Toxicol*, 9, 279-94.
- Little, E.E. & R.D. Calfee, (2008a) Acute toxicity of three herbicides, DMA*41VM, Renovate 3, and Sonar A.S., to two life stages of white sturgeon from the Kootenai River and to rainbow trout. . *USGS Report: Columbia Environmental Research Center, Columbia, MO.*
- Little, E.E. & R.D. Calfee, (2008b) Toxicity of Chlorine and Copper to Rainbow Trout and to White Sturgeon from the Kootenai River and Columbia River. In. *USGS Report: Columbia Environmental Research Center, Columbia, MO.*
- Miller, K.M., S. Li, K.H. Kaukinen, N. Ginther, E. Hammill, J.M. Curtis, D.A. Patterson, T. Sierocinski, L. Donnison, P. Pavlidis, S.G. Hinch, K.A. Hruska, S.J. Cooke, K.K. English & A.P. Farrell, (2011) Genomic signatures predict migration and spawning failure in wild Canadian salmon. *Science* 331: 214-217.
- Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A. R. & Dobbie, Z. (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 32, 1372-4, 1376, 1378-9.
- OECD, (1992) Guideline for testing of chemicals 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test
- Poynton, H.C., R. Zuzow, A.V. Loguinov, E.J. Perkins & C.D. Vulpe, (2008) Gene expression profiling in *Daphnia magna*, Part II: Validation of a copper specific gene expression signature with effluent from two copper mines in California. *Environmental Science and Technology* 42: 6257-6263.
- Rand, G.M., (1995) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*: Taylor and Francis. *Bristol, PA.*
- Sandahl, J.F., D.H. Baldwin, J.J. Jenkins & N.L. Scholz, (2005) Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 136-145.
- Schirmer, K., B.B. Fischer, D.J. Madureira & S. Pillai, (2010) Transcriptomics in ecotoxicology. *Anal Bioanal Chem* 397: 917-923.
- Scholz, N.L., N.K. Truelove, B.L. French, B.A. Berejikian, T.P. Quinn, E. Casillas & T.K. Collier, (2000) Diazinon disrupts antipredator and homing behaviors in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 1911-1918.
- Simon, P. (2003) Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*, 19, 1439-40.
- Tanneberger, K., M. Knobel, F. J. M. Busser, T. L. Sinnige, J. L. M. Hermens and K. Schirmer (2013). "Predicting Fish Acute Toxicity Using a Fish Gill Cell Line-Based Toxicity Assay." *Environmental Science & Technology* 47: 1110-1119



- Yeoh, E.J., M.E. Ross, S.A. Shurtleff, W.K. Williams, D. Patel, R. Mahfouz, F.G. Behm, S.C. Raimondi, M.V. Relling, A. Patel, C. Cheng, D. Campana, D. Wilkins, X. Zhou, J. Li, H. Liu, C.H. Pui, W.E. Evans, C. Naeve, L. Wong & J.R. Downing, (2002) Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1: 133-143.
- Van Der Linden SC, Heringa MB, Man HY, Sonneveld E, Puijker LM, Brouwer A, Van Der Burg B (2008). Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 42: 5814-5820
- Zöllig, H., Butz, H., Fischer, S., Messmer, H., Zuleeg, S., (2017): Erste grosstechnische Umsetzung einer PAK-Stufe in der Schweiz – Erfahrungen nach einem Jahr. *Aqua & Gas*, 17/1: p. 14-23