

SCHÄDIGEN PFLANZEN- SCHUTZMITTEL FISCHE?

EFFEKTE VON PSM-MISCHUNGEN, IN KOMBINATION MIT ANDEREN UMWELTSTRESSOREN, AUF JUNGE FORELLEN

Eine umweltrelevante Mischung aus fünf Pflanzenschutzmitteln (PSM) hatte direkte sowie langfristige subletale Effekte auf den Energiehaushalt von jungen Bachforellen. Zudem gab es Wechselwirkungen mit den beiden anderen Stressoren, erhöhter Wassertemperatur und PKD-Parasitenbefall. Die Studie konnte darüber hinaus einen Satz von molekularen Biomarkern identifizieren, die deutlich auf die PSM-Expositionen reagiert haben.

*Kristina Rehberger; Melanie Fasel; Helmut Segner, Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Vetsuisse Fakultät, Universität Bern
Anne-Sophie Voisin*; Daniel Olbrich; Inge Werner, Oekotoxzentrum
Maxime Regnier, Université de Namur, Belgique
Pamela Nicholson, NGS Plattform, Institut für Genetik, Vetsuisse Fakultät, Universität Bern
Marco Kreuzer, Interfaculty Bioinformatics Unit, Universität Bern*

RÉSUMÉ

LES MÉLANGES DE PPH, ASSOCIÉS À D'AUTRES FACTEURS DE STRESS ENVIRONNEMENTAL, PERTURBENT-ILS LES JEUNES TRUITES DE RIVIÈRE?

Les analyses chimiques menées ces dernières années ont montré que les cours d'eau de petite à moyenne taille affichent des concentrations parfois importantes de produits phytosanitaires (PPH) dans les régions suisses où l'agriculture est intensive. Les poissons sont soumis à de multiples facteurs de stress supplémentaires, ce qui est susceptible d'entraîner des conséquences combinées inattendues. L'étude avait donc pour objectif d'analyser les conséquences potentielles d'un mélange PPH sur l'état général de santé et de condition physique des jeunes truites de rivière, en prenant en compte aussi bien le mélange PPH seul que son association avec les facteurs de stress supplémentaires (p. ex. l'élévation de la température de l'eau et les attaques parasitaires provoquant la maladie rénale proliférative). Il s'agissait aussi de développer des méthodes pour la détection précoce de l'exposition des truites aux PPH (ici: à l'aide de biomarqueurs moléculaires), méthodes pouvant être mises en œuvre sur le terrain. Les résultats ont montré que des effets PPH sublétaux survenaient sur les réserves énergétiques des poissons aussi bien immédiatement qu'à long terme, après une phase de récupération de deux mois. En outre,

AUSGANGSLAGE UND ZIELSETZUNG

Kleine und mittelgrosse Fliessgewässer in landwirtschaftlich intensiv genutzten Gebieten gehören zu den stark durch menschliche Einflüsse belasteten aquatischen Ökosystemen. Verbauungen, Wassernutzung, Einträge von Chemikalien, Auswirkungen der Klimaveränderung und Krankheiten verändern die Gewässerlandschaft und haben Auswirkungen auf die Flora und Fauna unserer Gewässer. Bezeichnenderweise figuriert ein hoher Anteil der heimischen Fischarten auf der Roten Liste der gefährdeten Arten [1]. Bestände wie die der Bachforelle, einer Leitfischart Schweizer Gewässer, verzeichnen seit Jahren einen deutlichen Rückgang [2, 3]. Ein Faktor, der als mögliche Ursache für den schlechten Zustand der Schweizer Fischfauna angesehen wird, ist unter anderem die Belastung der Gewässer mit Pestiziden (Pflanzenschutzmitteln [PSM] und Bioziden). Chemisch-analytische Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass kleine und mittelgrosse Fliessgewässer in landwirtschaftlich intensiv genutzten Gebieten der Schweiz teilweise stark mit PSM belastet sind [4-7]. Dies führt zu der Frage, ob die PSM-Belastung der Gewässer eine nachteilige Wirkung auf

* Kontakt: anne-sophie.voisin@oekotoxzentrum.ch

(Titelbild: © M. Zeh)

Gesundheit und ökologische Fitness der einheimischen Fische hat und zu Gefährdung und Rückgang der Fischbestände beiträgt.

Risikoabschätzungen hinsichtlich möglicher Wirkungen auf Fische kommen zu dem Schluss, dass die in der Schweiz gemessenen PSM-Konzentrationen zeitweise ein Risiko für Fische darstellen [8, 9]. In der Regel stammen die in Risikoabschätzungen verwendeten Toxizitätsdaten jedoch nicht von einheimischen Fischarten und decken nicht alle Lebensstadien ab [10]. Es stellt sich die Frage, inwieweit diese Abschätzungen für Arten wie die Bachforelle und deren unterschiedliche Lebensstadien zutreffen. Auch mögliche subletale Wirkungen von PSM auf Fische, z. B. Auswirkungen auf das Verhalten oder die Fähigkeit zur Abwehr von Krankheitserregern, finden in der Regel noch keinen Eingang in die Risikoabschätzung [10, 11]. Jedoch können subletale Effekte verschiedene Eigenschaften von Lebewesen beeinflussen, die für den Erhalt der Population wichtig sind, zum Beispiel die Fortpflanzungshormone, das Verhalten oder das Immunsystem [12]. So wurde beispielsweise gezeigt, dass PSM den Geruchssinn von Lachsen stören können und damit deren Laichwanderung beeinflussen und so die Fortpflanzungsfähigkeit der Population beeinträchtigen [13]. Zudem sind Fische in ihren Gewässern nicht nur PSM, sondern einer Vielzahl von unterschiedlichen Stressoren ausgesetzt, was zu unerwarteten Kombinationswirkungen und kumulativen Effekten führen kann [14]. Es besteht daher ein dringender Forschungsbedarf zur Schliessung von Wissenslücken. Zudem ist es erforderlich, Methoden zu entwickeln, die im Freiland zur Erkennung von PSM-Expositionen bei Fischen eingesetzt werden können.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die möglichen Wirkungen einer für die Schweiz relevanten PSM-Mischung auf den allgemeinen Gesundheits-/Fitnesszustand von Bachforellen zu untersuchen – sowohl allein als auch in Kombination mit zusätzlichen Stressoren wie erhöhter Wassertemperatur und Parasitenbefall. Die kontrollierten Versuchsbedingungen wurden so gewählt, dass sie möglichst nahe an der Freilandsituation lagen: Die Auswahl der PSM baute auf den Erkenntnissen aus der Risikoanalyse von [9, 10] auf, in der jene PSM ermittelt wurden, die das höchste Risiko für Fische darstellen.

Die Fische wurden zudem nicht einem Einzelstoff, sondern einer PSM-Mischung ausgesetzt. Die eingesetzten Konzentrationen lagen im Bereich von gemessenen Umweltkonzentrationen (1x) bzw. spiegelten hypothetische Spitzenbelastungen wider (5x). Da die Hauptapplikationsperiode vieler PSM im Frühjahr und Frühsommer liegt, wurden als zu untersuchendes Lebensstadium junge Bachforellen ausgewählt. Um einen möglichen Einfluss der Wassertemperatur zu erfassen, wurde der Versuch bei 12 °C und 15 °C durchgeführt. Die für diese Studie ausgewählten Wassertemperaturen treten im Frühjahr resp. Frühsommer in Gewässern des Schweizer Mittellands auf. Allerdings ist zu betonen, dass infolge der Klimaerwärmung die Temperaturen Schweizer Bäche mittlerweile häufig deutlich höhere Werte erreichen und zudem stark schwanken können. Da in mehr als 50% der Mittellandgewässer die Bachforellen mit dem Parasiten *Tetracapsuloides bryosalmonae* infiziert sind, wurde auch dieser Umweltstressor in der Studie berücksichtigt. Es handelt sich dabei um den in Schweizer Gewässern weitverbreiteten Erreger der Proliferativen Nierenerkrankung (PKD) – zentraler Faktor im Rückgang der Bachforellenbestände [15–17]. Die vorliegende Studie diene darüber hinaus der Entwicklung von Methoden, die in Freilandstudien zur Früherkennung einer PSM-Exposition bei Fischen eingesetzt werden könnten. Molekulare Biomarker

stellen hierbei vielversprechende Parameter dar, denn es handelt sich um Gene, die frühzeitig auf eine bestimmte Belastung reagieren und diese somit anzeigen können.

Zusammenfassend sollten also folgende drei Leitfragen mit der vorliegenden Studie beantwortet werden:

- Hat eine PSM-Mischung, wie sie in Schweizer Bächen auftreten kann, direkte und/oder längerfristige subletale Wirkungen auf Jugendstadien von einheimischen Bachforellen?
- Modifizieren weitere Stressoren – erhöhte Wassertemperatur und/oder Parasiteninfektion – den Einfluss der PSM auf die Bachforellen?
- Gibt es für Felduntersuchungen geeignete Parameter (hier: molekulare Biomarker), um eine PSM-Exposition bei Bachforellen zu erkennen?

DURCHFÜHRUNG DER STUDIE

STUDIEN-DESIGN

Hälterung

Junge Bachforellen wurden Ende April 2019 von Biasca e dintorni (Tessin) ans Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin (FIWI) der Universität Bern transferiert und dort für etwa drei Monate in Quarantäne gehalten, anschliessend während gut eines Monats an die Versuchsbecken (zwanzig 35-Liter-Glas-Durchflusssaquarien) und die Wassertemperaturen des

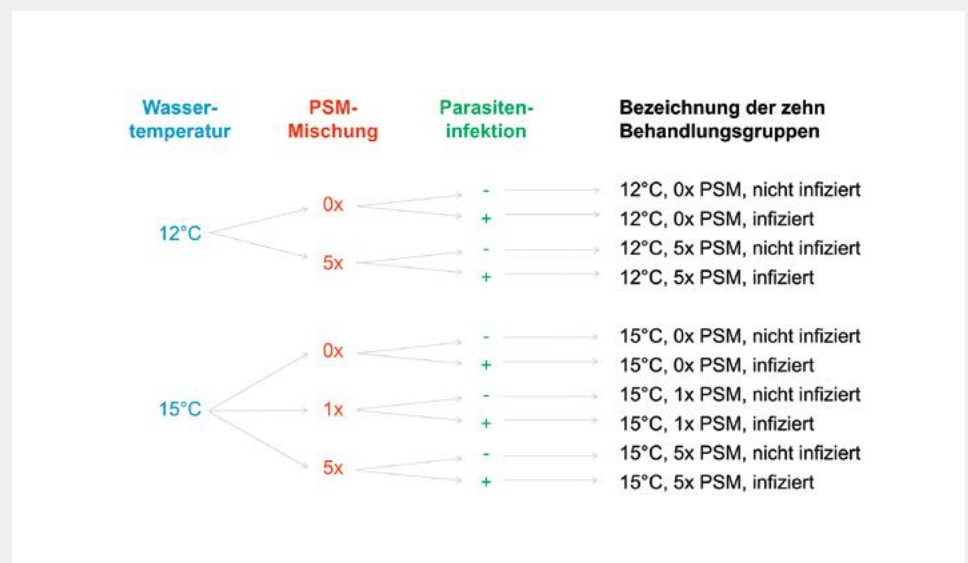


Fig. 1 Experimentelles Design. Die Fische wurden bei zwei Wassertemperaturen gehalten. Neben der Kontrolle ohne PSM (0x), wurden eine Konzentration, wie sie in Schweizer Gewässern gemessen wurde (1x, nur bei erhöhter Wassertemperatur), sowie eine 5-fach höhere Konzentration (5x) verwendet. Eine Hälfte der Fische wurde mit einem Parasiten infiziert (+), die andere Hälfte nicht (-). Die Behandlungen wurden im Duplikat durchgeführt.

Versuchs (8 Becken: $11,94 \pm 0,61$ °C; und 12 Becken: $15,3 \pm 0,43$ °C) akklimatisiert. Bei Beginn des Versuches waren die Fische etwa sechs Monate alt, das individuelle Gewicht betrug im Durchschnitt $5,74 \pm 2,08$ g und die Tiere wurden bei einer Dichte von 14,76 g Fisch pro Liter gehalten. Die Behandlungsgruppen (Fig. 1) wurden im Duplikat durchgeführt. Die Bewilligungsnummer des Kantons Bern lautet BE 39/19.

PSM-Exposition

Die Fische wurden zunächst für 14 Tage einer umweltrelevanten Mischung von fünf Pestiziden ausgesetzt. Diese Mischung, im Folgenden «PSM-Mischung» genannt, bestand aus den Fungiziden Fluopyram und Epoxiconazol, dem Herbizid Diuron und den Insektiziden Chlorpyrifos und λ -Cyhalothrin (Tab. 1). Diese Wirkstoffe können derzeit alle (z.T. innerhalb der Aufbrauchsfristen) noch als PSM

eingesetzt werden, bis auf Chlorpyrifos, dessen Aufbrauchfrist Ende Mai 2021 ausgelaufen ist. Diuron kann zusätzlich als Biozid eingesetzt werden. Neben der Kontrolle ohne PSM (0x) wurden zwei nicht-letale Konzentrationen der PSM-Mischung verwendet: zum einen die maximale Konzentration, die 2017 in Schweizer Gewässern in 3,5-Tage-Mischproben ($MEC_{max,2017}$) gemessen wurde (1x; Tab. 1); zum anderen eine fünffach höhere Konzentration (5x), um eine hypothetische Spitzenbelastung nachzustellen, und um die Konzentrationsabhängigkeit der PSM-Effekte zu prüfen (Fig. 2). Die Wasserqualitätsparameter (pH, Härte, Ammonium und Nitrat/Nitrit) wurden regelmässig überprüft und waren konstant.

Parasiteninfektion

Direkt nach Ende der PSM-Exposition wurde die Hälfte der Fische mit dem PKD-Parasiten infiziert (Fig. 2). Dazu wurden

| PSM | $MEC_{max,2017}$ (ng/l) | Im Versuch gemessene Konzentrationen (median, ng/l) | |
|------------------------|----------------------------|---|-----------------|
| | | 1x PSM-Mischung | 5x PSM-Mischung |
| Fluopyram | 3000 | 2476 | 11400 |
| Diuron | 93 | 67 | 330 |
| Epoxiconazol | 330 | 305 | 1435 |
| Chlorpyrifos | 21 | 13 | 118 |
| λ -Cyhalothrin | 31 | 28 | 336 |

Tab. 1 In der Schweiz gemessene Umweltkonzentrationen ($MEC_{max,2017}$) und im Versuch gemessene Konzentrationen der Pflanzenschutzmittel (PSM).

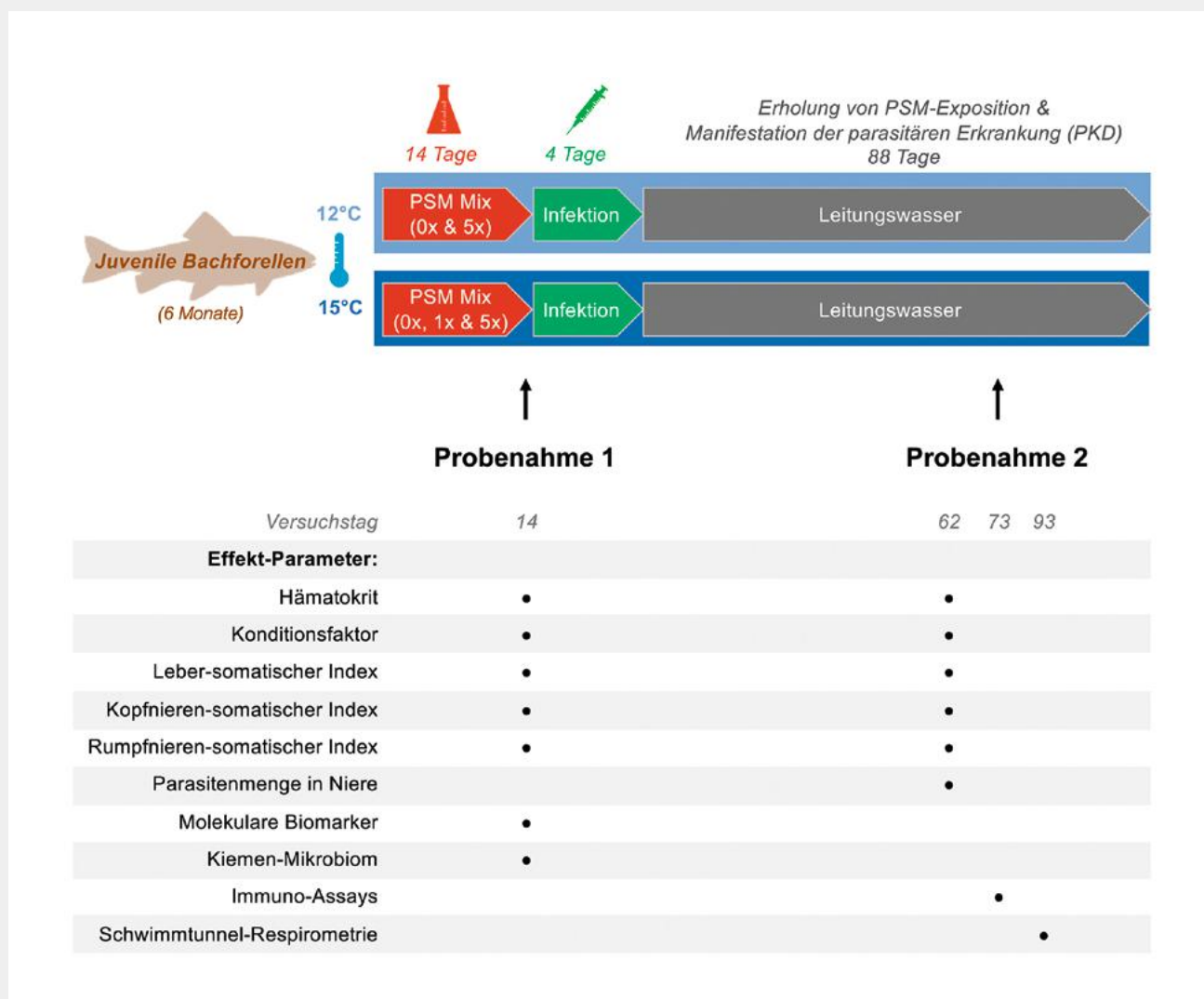


Fig. 2 Zeitlicher Ablauf des Experiments (oben) und Auflistung (unten), welche Effekt-Parameter pro Probenahme untersucht wurden – angezeigt durch den Punkt in der Tabelle.

die Bachforellen an vier aufeinanderfolgenden Tagen jeweils für eine Stunde über das Wasser einer definierten, nicht-letalen Menge Parasitensporen ausgesetzt [18].

Erholungsphase

Nach Beendigung der Infektionsphase wurden alle Fische, infizierte wie nicht-infiziert, weitere 88 Tage ohne Zusatz von PSM und PKD-Parasiten in den Becken gehalten, um mögliche Nachwirkungen und Spätfolgen der PSM-Exposition zu erfassen (Fig. 2).

PSM-WASSERANALYTIK

Während der PSM-Exposition wurden aus jedem Becken im Abstand von zwei bis drei Tagen insgesamt fünfmal Wasserproben entnommen, um die PSM-Stoffkonzentrationen analytisch zu bestimmen. Die Wasserproben wurden mit internen Standards versetzt und für die Analyseverfahren aufbereitet. Aufgrund der chemischen Eigenschaften wurden die Konzentrationen von Diuron, Epoxiconazol und Fluopyram mittels ESI-LC-MS/MS (Flüssigchromatographie mit Elektrospray-Ionisation und Massenspektrometrie-Kopplung) und die Konzentrationen von Chlorpyrifos und λ -Cyhalothrin mittels GC-APCI-MS/MS (Gaschromatographie und chemische Ionisation bei Atmosphärendruck gekoppelte Massenspektrometrie) ermittelt. Die nominalen ($MEC_{max,2017}$) und gemessenen ($1\times, 5\times$) Konzentrationen sind in *Tabelle 1* aufgeführt.

PROBENAHME

Während der Zeitpunkt der ersten Probenahme auf die Erfassung der direkten Auswirkungen der PSM-Exposition abzielte, sollten in den Fischen der zweiten Probenahme die längerfristigen Wirkungen der drei Stressoren gemessen werden (Fig. 2). Zum Zeitpunkt der zweiten Probenahme hatte die Parasitenmenge in den infizierten Fischen ein Maximum erreicht. Die Studie umfasste weitere Probenahmen, der Übersichtlichkeit halber sind diese hier nicht aufgeführt.

Aus jedem Versuchsbecken wurden acht juvenile Bachforellen entnommen und mit einer Überdosis des Betäubungsmittels MS222 und Kiemenschnitt euthanasiert. Fischlänge und -gewicht der abgetrockneten Fische wurden gemessen und Blut aus der Kaudalvene entnommen. Organe wurden seziiert, gewogen, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei minus 80 °C gelagert. Die Analysen

der molekularen Biomarker wurden in Gehirn und Leber, die Parasitenmenge in der Rumpfniere und das Mikrobiom (bei nur vier Fischen pro Becken) in den Kiemen dieser Fische analysiert. Für die Immuno-Assays wurden zusätzliche neun Fische pro Becken beprobt. Bei der Schwimmstapel-Respirometrie wurden weitere acht Fische pro Becken beprobt und jeweils als Vierergruppe gemessen. Der Sauerstoffverbrauch wurde pro Fischgruppe mindestens dreimal bei beiden Strömungsgeschwindigkeiten erfasst. Die Zunahme des Sauerstoffverbrauchs wurde pro Fischgruppe kalkuliert. Die Immuno-Assays sowie die Schwimmstapel-Respirometrie wurden mit jeweils nur fünf Behandlungsgruppen durchgeführt: (1) 12 °C, 0 \times PSM, nicht infiziert (2) 15 °C, 0 \times PSM, nicht infiziert (3) 15 °C, 0 \times PSM, infiziert (4) 15 °C, 5 \times PSM, nicht infiziert (5) 15 °C, 5 \times PSM, infiziert

EFFEKT-PARAMETER

In *Figur 2* ist grafisch dargestellt, welche Effekt-Parameter bei welcher Probenahme gemessen wurden.

Hämatokrit

Der Hämatokrit repräsentiert den Volumenanteil der Blutkörperchen im Blut und gibt einen indirekten Hinweis auf den allgemeinen Gesundheitszustand der Fische. Er ist erhöht, wenn z.B. mehr Immunzellen im Blut vorhanden sind. Zur Bestimmung des Hämatokrits wurde Blut der Kaudalvene in Na-heparinisierten Mikro-Hämatokrit-Röhrchen gesammelt, zentrifugiert, die Fraktionen wurden abgemessen und in ein prozentuales Verhältnis gesetzt.

Konditionsfaktor

Um die Reaktion des Fisches als Gesamtorganismus auf die PSM-Exposition zu erfassen, wurde der *Fulton'sche* Konditionsfaktor (KF) berechnet. Dieser repräsentiert das Verhältnis aus Länge und Gewicht der Fische. Folglich würde z.B. ein Gewichtsverlust eine Reduktion des KF verursachen. Die verwendete Formel lautet: $KF = 100 * (\text{Fischgewicht}/\text{Fischlänge}^3)$.

Organ-Somatischer Index

Organ-Somatische Indizes setzen das jeweilige Organgewicht in Relation zum Körpergewicht. Beispielsweise kann eine Abnahme von Reservestoffen (Fett, Glykogen) zu einer Reduktion des Leber-

Somatischen Index (LSI) führen, eine Aktivierung des Immunsystems zu einer Zunahme des Kopfnieren-Somatischen Index (KSI) oder eine Infektion mit dem PKD-Parasiten zu einer Zunahme des Rumpfnieren-Somatischen Index (RSI). Die Somatischen Indizes wurden wie folgt berechnet: $SI = 100 * (\text{Organgewicht}/\text{Fischgewicht})$.

Parasitenmenge

Dieser Wert gibt einen Hinweis, wie viel Parasiten sich im Fisch befindet. Ist z.B. der Wert einer Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrolle höher, so hat die Behandlung die Krankheitsempfindlichkeit der Fische erhöht. Für die Bestimmung wurde die DNA aus der Rumpfniere der Fische extrahiert und mittels *TaqMan-qPCR* quantifiziert (für Primer und Probe s. [19]).

Molekulare Biomarker

Um die PSM-Belastung anzeigen zu können, wurden Gene als molekulare Biomarker ausgewählt, die auf spezifische Wirkmechanismen von Pestiziden ansprechen oder in der Immun- bzw. Stressantwort eine Rolle spielen. Zusätzlich wurden sechs Referenzgene ausgewählt, welche auf diese Stressoren nicht reagieren (*Tab. 2*). Für die Analyse wurde die Boten-RNA (mRNA) aus Leber oder Gehirn isoliert, die Konzentration spektrophotometrisch abgeleitet und die Qualität überprüft. Nach DNase-Behandlung wurde die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Jede Probe wurde mittels qPCR unter Verwendung gen-spezifischer Primer gemessen. Das Verhältnis der Biomarker-mRNA von Behandlung zu Kontrolle wurde als «relative Genexpression» berechnet [20].

Kiemen-Mikrobiom

Als natürliche Barriere besitzen die Kiemen von Fischen eine feine Schutzschicht, die u. a. eine Vielzahl von Bakterien – das Mikrobiom – enthält. Wird das Mikrobiom z.B. durch Schadstoffe verändert, so können der Gesundheitszustand des Fisches und seine Fähigkeit, eine Infektion mit Krankheitserregern abzuwehren, beeinflusst sein. Für die Analyse wurden die DNA aus den Kiemen extrahiert, die V3-V4-Region der 16S rRNA amplifiziert und die resultierenden Amplicons mit einem *Illumina MiSeq*-Gerät sequenziert. Die Daten wurden bioinformatisch ausgewertet und die bakterielle Artenzusammensetzung (Alpha-Diversität) abgeleitet.

| Gen | Name | Funktion | Gewebe |
|---------|--|------------------------------|--------|
| ache | Acetylcholinesterase | Neurotransmission | G |
| app | Amyloid-Vorläuferprotein beta | Synaptische Plastizität | G |
| aspa | Aspartoacylase | Neurotransmission | G |
| c-myc | Myc Protoonkogen | Zellwachstum / -tod | G, L |
| calm1a | Calmodulin 1a | Synaptische Plastizität | G |
| cat | Katalase | Antioxidative Abwehr | L |
| cyp1a | Cytochrome P450 1A | Biotransformation | L |
| cyp3a | Cytochrome P450 3A | Biotransformation | L |
| cyp51 | Lanosterin-14 α -Demethylase | Steroid Metabolismus | L |
| epd | Ependymin | Neuronale Regeneration | G |
| gpx | Glutathionperoxidase | Antioxidative Abwehr | G, L |
| gst | Glutathion-S-Transferasen | Biotransformation | L |
| hsd17b7 | 3-Keto-Steroid-Reduktase | Steroid Metabolismus | L |
| hsp70 | Hitzeschock Protein 70 | Proteinreparatur | G |
| hsp90b | Hitzeschock Protein 90 beta | Protein Homeostase | L |
| igf1 | Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1 | Wachstum | L |
| mtor | «mechanistic Target of Rapamycin» | Zellmetabolismus | L |
| nfkb | «nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells» | Regulator für Immunantworten | G, L |
| nrf2 | «nuclear factor erythroid 2-related factor 2» | Antioxidative Abwehr | G, L |
| pxr | Pregnan-X-Rezeptor | Biotransformation | L |
| srebf2 | «sterol regulatory element-binding protein 2» | Steroid Metabolismus | L |
| tp53 | Tumor Protein p53 | Zellwachstum / -tod | G, L |
| actb | Beta-Aktin | Referenzgen | L |
| arp | Aktin-ähnliches Protein | Referenzgen | G, L |
| b2m | Beta-2-Mikroglobulin | Referenzgen | L |
| eef1b | Elongationsfaktor-1-beta | Referenzgen | G, L |
| rpl7 | 60S Ribosomales Protein L7 | Referenzgen | L |
| ubi | Ubiquitin | Referenzgen | G, L |

Tab. 2 In Leber (L) bzw. Gehirn (G) gemessene Biomarkergene und ihre Funktion in der Zelle.

Immuno-Assays

Um die Auswirkungen der PSM auf das Immunsystem zu untersuchen, wurden Immunzellen aus der Kopfniere der Forelen isoliert, gezählt und zwei immunologische Funktionsparameter analysiert [21]:

– Phagozytose:

Die Fähigkeit, fremde Partikel wie z. B. Krankheitserreger aufzunehmen.

– Respiratorischer Burst:

Die Fähigkeit, diese Partikel innerhalb der Zelle durch Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies zu «verdauen».

Beides sind wichtige Prozesse in der angeborenen Immunantwort. Eine Störung kann die Fähigkeit zur Abwehr von Krankheitserregern reduzieren.

Schwimmtunnel-Respirometrie

Der Sauerstoffverbrauch wurde in einem Schwimmtunnel gemessen und ist ein Indikator für den Energieanteil, den

die Fische für die Schwimmaktivität zur Verfügung haben. Lösen Umweltbedingungen eine Stressreaktion beim Fisch aus, muss er dafür einen Teil seines Energiebudgets einsetzen und es steht weniger Energie bereit. Die Analysen wurden mittels intermittierender Schwimmtunnel-Respirometrie durchgeführt [18]. Der Sauerstoffverbrauch wurde bei zwei Schwimgeschwindigkeiten (basal: 10 cm/s; erhöht: 20 cm/s) als metabolisierter Sauerstoff (MO_2) erfasst. Es wurden zwei Parameter untersucht:

– Sauerstoffverbrauch:

Der Sauerstoffverbrauch für die basale Schwimmaktivität ist ein Indiz dafür, wie viel Energie dem Fisch im Ruhezustand zur Verfügung steht.

– Zunahme des Sauerstoffverbrauchs:

Die Berechnung der durchschnittlichen Zunahme des Sauerstoffs, unter Einbezug beider Schwimgeschwindigkeiten und der gesamten Messperi-

ode ($MO_{2,max}$ minus $MO_{2,min}$), gibt einen Hinweis auf den benötigten Energieaufwand für die Schwimmaktivität unter Belastung.

Informationen zur statistischen Auswertung
Die statistische Datenanalyse wurde mit dem Softwareprogramm *R 4.0.1 (Statistical Software for Computing, Wien)* durchgeführt. Die statistische Auswertung umfasste zwei Aspekte:

– Mittels multiplen linearen Modells wurde auf Wechselwirkungen (Interaktionen) zwischen den drei Stressoren getestet. Die molekularen Biomarker und das Mikrobiom wurden dabei nicht berücksichtigt.

– Aus dem multiplen linearen Modell wurden zusätzlich ausgewählte Behandlungsgruppen mit der jeweiligen Kontrolle verglichen, um Effekte einzelner Stressoren zu detektieren. So wurden Effekte, die durch die PSM-Mischung ausgelöst wurden, durch den Vergleich der PSM-exponierten Tiere zur jeweiligen Kontrolle (pro Temperatur und Infektionsstatus) erfasst, bspw. «12 °C, 5× PSM, nicht infiziert» vs. «12 °C, 0× PSM, nicht infiziert».

Die Messwerte zur Parasitenmenge und Zellzahl wurden für beide statistischen Analysen log-transformiert. Statistische Signifikanz wurde akzeptiert bei p-Wert $\leq 0,05$; in diesem Artikel wird dann von «deutlichen» Effekten gesprochen.

ERGEBNISSE UND INTERPRETATION

Die Daten der Studie legen nahe, dass das von der PSM-Belastung unserer Gewässer ausgehende Risiko für Bachforellen des untersuchten Lebensstadiums nicht primär in einer akut erhöhten Sterberate besteht, sondern bei den subletalen Effekten liegt. Unter den genannten Versuchsbedingungen verursachte die 14-tägige PSM-Exposition keine Mortalität. Die durchschnittliche Mortalität für die gesamte Versuchsdauer von insgesamt 106 Tagen lag mit 2,45% im zu erwartenden Bereich. Es wurden jedoch sowohl direkt wie auch längerfristig subletale Effekte und Wechselwirkungen mit den beiden anderen Stressoren festgestellt (s. unten).

DIREKTE UND LANGFRISTIGE WIRKUNGEN AUF ENERGIEHAUSHALT DER FISCHÉ

Die veränderten Parameter sind in *Figur 3* für beide Probenahmen zusammenge-

fasst. Direkt, am Ende der 14-tägigen Exposition, war der Leber-Somatische Index (LSI) bei PSM-exponierten Fischen im Vergleich zur Kontrolle deutlich, also signifikant reduziert (12 °C; Fig. 4A). Da die Leber bei Fischen ein Speicherorgan für Energiereserven ist, zeigt die Abnahme des LSI, dass die PSM-exponierten Fische verstärkt Energie verbrauchten; vermutlich zur Bewältigung der PSM-Exposition. Einen weiteren Hinweis auf den verstärkten Energieaufwand PSM-exponierter Fische gibt der Konditionsfaktor (KF) – ein Indikator für die Gesamt-Energiesituation und das Wachstum des Organismus. Dieser war bei 15 °C durch die PSM-Exposition im Vergleich zur Kontrolle konzentrationsabhängig reduziert (Fig. 3). Die PSM-Exposition hatte darüber hinaus direkte Effekte auf molekulare Biomarker im Gehirn (Ergebnisse s. unten).

Nach zweimonatiger Erholungsphase finden sich auch längerfristige Nachwirkungen der PSM-Exposition auf den Energiehaushalt der Fische – erkennbar am veränderten Sauerstoffverbrauch. Vormalis 5x PSM-exponierte Fische wiesen im Vergleich zur Kontrolle einen deutlich niedrigeren basalen Sauerstoffverbrauch auf (15 °C; Fig. 4B) – ihnen stand demnach insgesamt weniger Energie zur Verfügung. Gleichzeitig scheinen die Schwimmbedingungen für die vormalis PSM-exponierten Fische «anstrengender» gewesen zu sein als für die Kontroll-Fische, denn sie mussten bereits tendenziell mehr Sauerstoff verbrauchen, um gegen die nur leicht erhöhte Wasserströmung anschwimmen zu können (15 °C; Fig. 4C). In der Umwelt könnte dies einen Nachteil hinsichtlich Beutefang und bei

der Flucht vor Räubern bedeuten. Während langfristige Auswirkungen der PSM-Exposition im Sauerstoffverbrauch der Fische erkennbar waren, zeigten andere Parameter wie der KF und LSI nach zwei Monaten in PSM-freiem Wasser eine Erholung. Auch bei den untersuchten Immunparametern (Phagozytose, respiratorischer Burst) waren keine deutlichen Unterschiede zwischen vormalis PSM-

exponierten und Kontroll-Fischen zu beobachten. In Übereinstimmung damit gab es bei der Suszeptibilität der Fische gegenüber dem PKD-Parasiten (Parasitenmenge in Niere) und der Diversität des Kiemen-Mikrobioms (welches eine Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern spielt) zwischen den Kontroll-Fischen und den zuvor PSM-exponierten Fischen ebenfalls keinen deutlichen Unterschied.

| Behandlung vs. Kontrolle Parameter Probenahme 1 Probenahme 2 | 5x PSM vs. 0x PSM 1x PSM vs. 0x PSM | | | | 15°C vs. 12°C | | infiziert vs. nicht infiziert | |
|---|--|---|-----------|---|--|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| | 12°C | | 15°C | | nicht infiziert | infiziert | 12°C | 15°C |
| | nicht infiziert | nicht infiziert | infiziert | infiziert | 0x PSM | 0x PSM | 0x PSM | 0x PSM |
| Hämatokrit | | ↑ 0.045 (2.99 [0.073; 5.90]) (1x) | | | ↓ 0.007 (-3.76 [-5.5; -1.07]) | | | |
| Konditionsfaktor | | ↓ 0.043 (-0.08 [-0.164; -0.003]) (5x) | | | | | | |
| Leber-somatischer Index | ↓ 0.018 (-0.19 [-0.338; -0.033]) | | | | | | | |
| Kopfnieren-somatischer Index | | | | | | | | |
| Rumpfnieren-somatischer Index | | | | | | | | ↑ 0.025 (0.06 [0.008; 0.113]) |
| Parasitenmenge in Niere | | | | | | ↑ 0.048 (0.85 [0.008; 1.7]) | | |
| Molekulare Biomarker | | ● | | | ● | | | |
| Immuno-Assays | | | | | ↓ 0.002 (-4.5 [-7.1; -1.9]) ¹ | | | |
| Schwimmtunnel-Respirometrie | | ↓ 0.003 (-370 [-803; -136]) (5x) ² | | ↑ 0.035 (270 [27; 513]) (5x) ³ | | | | |

Fig. 3 Übersicht über die signifikanten Effekte (p-Wert ≤ 0,05) bei Probenahme 1 (schwarz) und Probenahme 2 (gelb). Der Pfeil gibt an, ob der Parameter bei belasteten Tieren höher/niedriger war als bei den Kontroll-Fischen. Angegeben sind der p-Wert in fetter Schrift sowie in Klammer die Mittelwertdifferenz und das Konfidenzintervall. Sind keine Angaben gemacht, so gab es keine signifikanten Effekte. Die Biomarker sind in Figur 7 detailliert aufgeführt.

¹ prozentualer Anteil Lymphozyten; ² basaler Sauerstoffverbrauch; ³ Zunahme Sauerstoffverbrauch

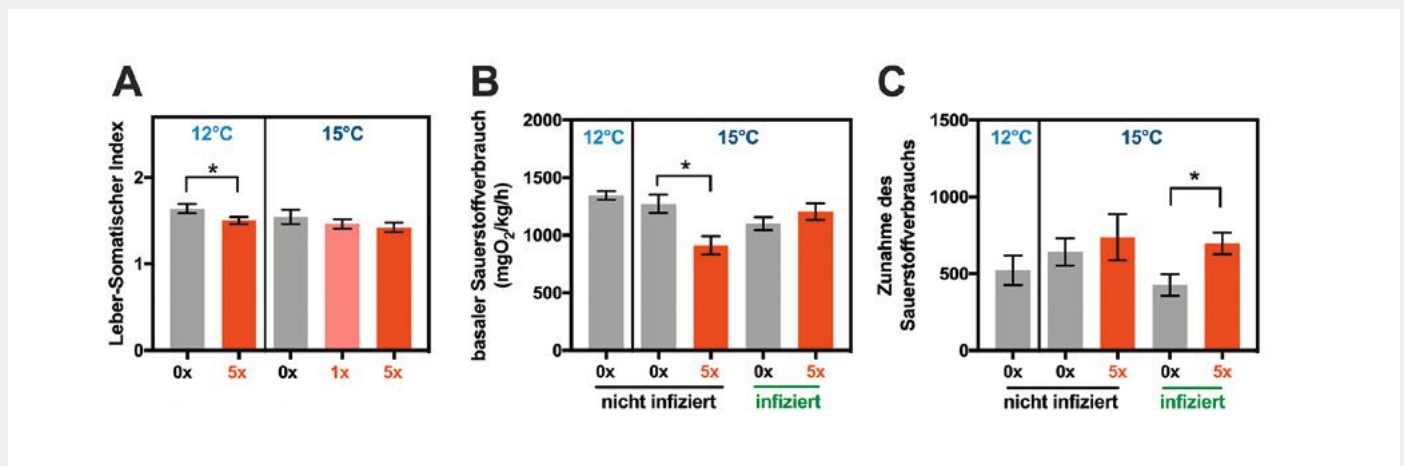


Fig. 4 Ergebnisse zum Leber-Somatische Index bei Probenahme 1 (A, nicht infizierte Fische) sowie zum basalen Sauerstoffverbrauch bei 10 cm/s Wasserströmung (B) und die durchschnittliche Zunahme des Sauerstoffverbrauchs unter Belastung (C) bei Probenahme 2. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind gekennzeichnet (*).

| Interaktion zwischen Parameter Probenahme 2 | PSM & Temperatur | | PSM & Infektion | | Temperatur & Infektion | | | PSM & Temp. & Infektion |
|---|--|-----------|-----------------|---------------------------------------|------------------------|--------|--------|---------------------------------------|
| | nicht infiziert | infiziert | 12°C | 15°C | 0x PSM | 1x PSM | 5x PSM | |
| | Hämatokrit | | | | | | | |
| Konditionsfaktor | | | | | | | | |
| Leber-somatischer Index | | | | | | | | 0.045 (0.313 [0.008; 0.62]) |
| Kopfnieren-somatischer Index | 0.014 (-0.046 [-0.082; -0.01]) | | | 0.005 (0.075 [0.023; 0.13]) | | | | 0.006 (0.06 [0.018; 0.1]) |
| Rumpfnieren-somatischer Index | | | | | | | | 0.001 (0.176 [0.075; 0.28]) |
| Parasitenmenge in Niere | | | | | | | | |
| Immuno-Assays | | | | | | | | |
| Schwimmtunnel-Respirometrie (Sauerstoffverbrauch) | | | | 0.003 (474 [172; 776]) | | | | |

Fig. 5 Übersicht über die signifikanten Wechselwirkungen (p -Wert $\leq 0,05$) zwischen den Stressoren. Angegeben sind der p -Wert in fetter Schrift sowie in Klammer die Mittelwertdifferenz und das Konfidenzintervall. Sind keine Angaben gemacht, so gab es keine signifikanten Wechselwirkungen, einschliesslich Probenahme 1.

| Behandlung vs. Kontrolle Biomarker Probenahme 1 | 5x PSM vs. 0x PSM 1x PSM vs. 0x PSM | | 15°C vs. 12°C | |
|---|---|--|--------------------------------------|--|
| | 15°C nicht infiziert Gehirn | | nicht infiziert 0x PSM Gehirn | nicht infiziert 0x PSM Leber |
| | ache | 0.01 (0.29 [0.073; 0.51]) (1x) | | |
| aspa | 0.02 (0.26 [0.042; 0.48]) (1x) | | 0.016 (0.29 [0.058; 0.53]) | |
| c-myc | 0.014 (0.26 [0.055; 0.46]) (1x) | | | 0.001 (-1.51 [-2.2; -0.8]) |
| calm1a | 0.049 (0.2 [0.001; 0.40]) (5x) | | | |
| cat | 0.019 (0.32 [0.054; 0.58]) (1x) | | | 0.017 (-0.77 [-1.4; -0.15]) |
| cyp1a | | | | 0.001 (-1.09 [-1.7; -0.48]) |
| cyp3a | | | | 0.049 (-0.53 [-1.1; -0.002]) |
| cyp51 | | | | 0.024 (-1.07 [-2; -0.15]) |
| gst | | | | 0.006 (-0.67 [-1.1; -0.21]) |
| hsd17b7 | | | | 0.024 (-0.74 [-1.4; -0.1]) |
| hsp70 | 0.046 (0.33 [0.006; 0.65]) (1x) | | 0.013 (0.51 [0.12; 0.9]) | |
| hsp90 | | | | 0.007 (-0.56 [-0.96; -0.17]) |
| mtor | | | | 0.011 (-1.2 [-2.1; -0.29]) |
| nf-κB | | | | 0.05 (-1.05 [-2.1; 0.002]) |
| nrf2 | 0.04 (0.19 [0.01; 0.37]) (1x) | | | |
| pepck | | | | 0.01 (-0.79 [-1.4; -0.21]) |
| tp53 | | | | 0.015 (-0.86 [-1.5; -0.18]) |

Fig. 6 Übersicht über die signifikanten Effekte (p -Wert $\leq 0,05$) bei Probenahme 1. Bei den belasteten Tieren waren die Biomarker-Level höher als bei den Kontroll-Fischen (Pfeil). Angegeben sind der p -Wert in fetter Schrift sowie in Klammer die Mittelwertdifferenz und das Konfidenzintervall. Sind keine Angaben gemacht, so gab es keine signifikanten Effekte.

ZUSÄTZLICHE STRESSOREN ZEIGTEN WECHSELWIRKUNGEN MIT PSM-BELASTUNG

Nach der Erholungsphase kam es zu deutlichen Wechselwirkungen zwischen den drei Stressoren – PSM-Exposition, erhöhte Wassertemperatur und Parasiteninfektion (Fig. 5). Auffällig war, dass in der Kopfniere die meisten Stressor-Wechselwirkungen detektiert wurden: Der KSI weist darauf hin, dass Komponenten des Immunsystems durch die Wechselwirkung der drei Stressoren vermutlich stärker beeinflusst wurden als durch die individuellen Stressoren (Fig. 5). Darüber hinaus zeichnete sich eine Tendenz ab, dass bei höherer Wassertemperatur vermehrt PSM-Effekte auftraten und dass die längerfristigen Nachwirkungen der PSM-Exposition bei infizierten Fischen teilweise anders ausfielen als bei nicht-infizierten (Fig. 3 und Fig. 6). Ein deutliches Reaktionsmuster über alle Parameter hinweg war jedoch nicht zu erkennen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen demnach auf, dass bei künftigen Studien nicht nur der alleinige Effekt von PSM untersucht, sondern zusätzliche Umweltparameter in das Studiendesign integriert werden sollten.

MOLEKULARE BIOMARKER REAGIERTEN AUF PSM-EXPOSITION

Die veränderten molekularen Biomarker sind in Figur 6 zusammengefasst. Die bisherigen Daten zeigen, dass sechs im Gehirn gemessene molekulare Biomarker deutlich auf die PSM-Exposition reagierten (Fig. 7). Dagegen sprachen die in der Leber gemessenen Biomarker nicht auf die PSM-Exposition an – jedoch auf die erhöhte Wassertemperatur: Die um 3 °C höhere Wassertemperatur führte zu einem deutlichen Anstieg von zwölf Biomarkern in der Leber (Fig. 6). Dies verdeutlicht, dass die Wirkung der PSM organspezifisch ist. Die Reaktionen im Gehirn der Fische weisen auf die Bedeutung neurotoxischer Wirkungen der PSM hin, welche Folgen für das Verhalten der Fische haben können [22]. Angesichts der Tatsache, dass in vielen Studien meist die Leber, aber nicht das Gehirn untersucht wird, ist dieser Befund von besonderer Bedeutung. Zugleich zeigen die Ergebnisse, dass die ausgewählten Biomarker die vielfältigen Wirkmechanismen der PSM widerspiegeln. Die Daten zeigen darüber hinaus, dass die Mehrzahl der Biomarker überwiegend auf die 1x PSM-Mischung bei 15 °C reagierte, welche tat-

sächlich gemessene Konzentrationen in Fliessgewässern widerspiegelt, während die Messwerte bei 5× PSM-exponierten Fischen nahe an den Kontrollwerten lagen. Dies weist einerseits darauf hin, dass bei höheren Konzentrationen entweder andere zelluläre Abwehrmechanismen aktiviert wurden oder bereits Schädigungen der Zelle auftreten, sodass Abwehrreaktionen nicht mehr initiiert werden (können). Andererseits sind die Studienergebnisse für die Auswahl von molekularen Biomarkern in künftigen Freiland-Monitoring-Studien der Bachforellenpopulation unserer Gewässer von Bedeutung.

FAZIT

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass eine PSM-Exposition unter Konditionen, wie sie in Schweizer Gewässern auftreten können, eine Reihe subletaler Effekte bei jungen Bachforellen auslöste. Bemerkenswerterweise waren PSM-Effekte sowohl direkt wie auch längerfristig, nach einer zweimonatigen Erholungsphase, zu beobachten. Solche subletalen Effekte sind ökologisch relevant, da sie Wachstum, Überleben und Reproduktionsleistung und damit den Bestand der Population beeinflussen können [12]. Ein Beispiel bietet der hier beobachtete subletale PSM-Effekt auf den Energiehaushalt der Fische. Denn unter Freilandbedingungen sind die im Laufe von Frühjahr und Sommer angesammelten Energiereserven massgebend für das Überleben der Jungfische im Winter [23, 24]. Die PSM-Exposition könnte somit durch ihren Effekt auf den Energiehaushalt der Fische, ohne unmittelbar letal zu wirken, dennoch zu der verringerten Rekrutierung der Bachforellenpopulationen in Schweizer Gewässern beitragen. Ein zweiter, im Hinblick auf die Freilandsituation wichtiger Befund der Studie ist, dass Wechselwirkungen zwischen der PSM-Exposition und anderen für unsere Fischpopulationen wichtigen Stressoren auftraten, nämlich erhöhte Wassertemperatur und Infektion mit dem PKD-Parasiten. Diese Beobachtung bekräftigt, dass die Förderung von naturnahen Gewässern mit einer guten chemischen Wasserqualität vor dem Hintergrund des Klimawandels noch zusätzlich an Bedeutung gewinnt. Schliesslich konnte die Studie einen Satz von molekularen Biomarkern ermitteln, mit denen im Rahmen eines biologischen Monitorings

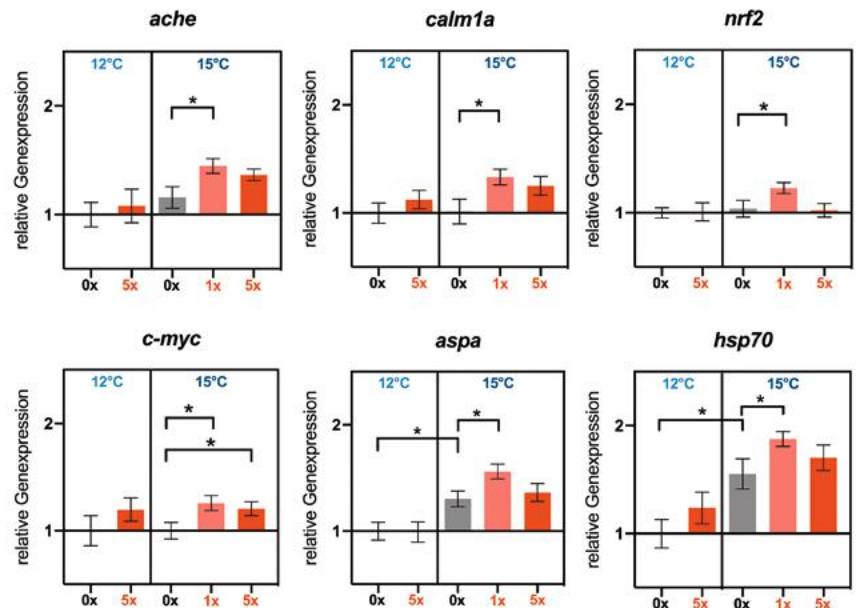


Fig. 7 Ergebnisse zur relativen Genexpression der molekularen Biomarker im Gehirn, die durch die PSM-Exposition verändert wurden (Probenahme 1).

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind gekennzeichnet (*).

subletale PSM-Expositionen bei jungen Bachforellen frühzeitig erkannt werden könnten. Zu diesem Aspekt läuft derzeit noch eine vertiefte Analyse und Auswertung der vorliegenden Studie, um ein robustes Biomarker-Set für das Monitoring zu identifizieren – dies nicht nur für die PSM-Exposition, sondern auch für die zusätzlichen Stressoren erhöhte Wassertemperatur und PKD-Parasiteninfektion.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Kirchofer, A. et al. (2007): Rote Liste der gefährdeten Arten der Schweiz: Fische und Rundmäuler. Bundesamt für Umwelt BAFU & Schweizer Zentrum für die Kartografie der Fauna SZKF/CSCF
- [2] Netzwerk Fischrückgang Schweiz «Fischnetz» (2004): Dem Fischrückgang auf der Spur. Schlussbericht. Eawag, Dübendorf
- [3] Fischereistatistik BAFU (2000 – 2018; Stand März 2021): Abteilung Wasser; Sektion Revitalisierung und Fischerei; <https://www.fischereistatistik.ch/de/statistics?tt=%200&dt=0&at=0&st=0&dp=0&ar=CH&wt=0&th=10&un=0&in=0&yr%5Bfrom%5D=2000&yr%5Bto%5D=2018&sp=%2070012>
- [4] Wittmer, I. et al. (2014): Über 100 Pestizide in Fliessgewässern. Programm NAWA Spez zeigt die hohe Pestizidbelastung der Schweizer Fliessgewässer auf. *Aqua & Gas* 94: 32–43
- [5] Doppler, T. et al. (2017): Hohe PSM-Belastung in Schweizer Bächen. NAWA-SPEZ-Kampagne untersucht Bäche in Gebieten intensiver landwirtschaftlicher Nutzung. *Aqua & Gas* 97: 46–56

- [6] Spycher, S. et al. (2019): Anhaltend hohe PSM-Belastung in Bächen. NAWA SPEZ 2017: kleine Gewässer in Gebieten mit intensiver Landwirtschaft verbreitet betroffen. *Aqua & Gas* 99: 14–25
- [7] Rösch, A. et al. (2019): Geringe Konzentrationen mit grosser Wirkung. Nachweis von Pyrethroid- und Organophosphatinspektiziden in Schweizer Bächen im pg I-1-Bereich. *Aqua & Gas* 99: 54–66
- [8] Junghans, M. et al. (2019): Ökotoxikologische Untersuchungen: Risiko von PSM bestätigt. NAWA-SPEZ-Studie 2017 zeigt Beeinträchtigung von Gewässerorganismen. *Aqua & Gas* 99: 26–34
- [9] Schneeweiss, A. et al. (2019): Ökotoxikologische Risiken von PSM für Fische. *Aqua & Gas* 11: 74–80
- [10] Schneeweiss, A. et al. (2019): Ökotoxikologische Wirkungen von PSM auf Fische. *Aqua & Gas* 11: 82–91
- [11] Werner, I. et al. (2021): Environmental Risk of Pesticides for Fish in Small- and Medium-Sized

DANKSAGUNGEN

Die Autoren bedanken sich beim Bundesamt für Umwelt BAFU für die finanzielle Unterstützung des Gesamtprojekts sowie beim Ökotoxizentrum, welches das Teilprojekt zur Entwicklung molekularer Biomarker finanzierte. Die Autoren möchten sich darüber hinaus bei allen am Projekt beteiligten Personen bedanken, besonders bei Nicole Munz und Bänz Lundsgaard-Hansen (BAFU, Abteilung Wasser) für das konstruktive Feedback zu diesem Artikel.

Streams of Switzerland. Toxics 9: 79

- [12] Relyea, R.; Hoverman, J. (2006): *Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. Ecology Letters 9: 1157-1171*
- [13] Baldwin, DH. et al. (2009): *A fish of many scales: extrapolating sublethal pesticide exposures to the productivity of wild salmon populations. Ecological Applications 19: 2004-2015*
- [14] Segner, H. et al. (2014): *Assessing the impact of multiple stressors on aquatic biota: the receptor's side matters. Environmental Science & Technology 48: 7690-7696*
- [15] Burkhardt-Holm, P. et al. (2005): *Where have all the fish gone?. Environmental Science & Technology 39: 441A-447A*
- [16] Burkhardt-Holm, P.; Scheurer, K. (2007): *Application of the weight-of-evidence approach to assess the decline of brown trout (Salmo trutta) in Swiss rivers. Aquatic Sciences 69: 51-70*
- [17] Wahli, T. et al. (2008): *Role of altitude and water temperature as regulating factors for the geographical distribution of Tetracapsuloides bryosalmonae infected fishes in Switzerland. Journal of Fish Biology 73: 2184-2197*
- [18] Rehberger, K. et al. (2020): *Long-term exposure to low 17 α -ethinylestradiol (EE2) concentrations disrupts both the reproductive and the immune system of juvenile rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Environment International 142: 105836*
- [19] Bettge, K. et al. (2009): *Proliferative kidney disease (PKD) of rainbow trout: temperature-and time-related changes of Tetracapsuloides bryosalmonae DNA in the kidney. Parasitology 136: 615-25*
- [20] Taylor, SC. et al. (2019): *The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. Trends in Biotechnology 37: 761-774*
- [21] Rehberger, K. et al. (2021): *Evaluation of an in vitro assay to screen for the immunotoxic potential of chemicals to fish. Scientific reports 11: 1-16*
- [22] Legradi, J. et al. (2018): *An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment. Environmental Sciences Europe 30: 46*
- [23] Berg, O. et al. (2011): *Pre-winter lipid stores in brown trout Salmo trutta along altitudinal and latitudinal gradients. Journal of Fish Biology - Wiley Online Library 79: 1156-166*
- [24] Auer, SK. et al. (2016): *Flexibility in metabolic rate and activity level determines individual variation in overwinter performance. Oecologia 182: 703-712*

> SUITE DU RÉSUMÉ

les trois facteurs de stress ont interagi les uns avec les autres. Enfin, l'étude a pu identifier des biomarqueurs moléculaires qui peuvent permettre, dans le cadre d'une surveillance biologique, de dépister les expositions sublétales aux PPh. Une analyse approfondie est toujours en cours, afin notamment de détecter les deux autres facteurs de stress.

H₂O-Marketing-Tools

neue attraktive Exponate

Outils de marketing Eau potable
eaupotable.ch/marketing-tools

Marketing-Tools Trinkwasser
trinkwasser.ch/marketing-tools

Strumenti di marketing Acqua potabile
acquapotabile.ch/marketing-tools

