

*Salmo trutta*  
**und *Thymallus thymallus***  
**in der Wupper**

-

molekularbiologischer Nachweis von  
*Saprolegnia* spp. sowie Berechnungen zu Alter  
und Längenwachstum

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

an der Fakultät der Mathematik und Naturwissenschaften

der Bergischen Universität Wuppertal

angefertigt am Lehrstuhl für Zoologie

vorgelegt von

Cora Agnes Berger

Wuppertal

Oktober 2016

Erstprüferin: Prof. Dr. G. Preisfeld

Zweitprüfer: PD Dr. E. Schmidt

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20170914-123149-9

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade3A468-20170914-123149-9>]

Hast du je einen schwimmenden Fisch berührt?

Du umkreist seinen Körper mit beiden Händen

Dann wird er nicht fliehen

Wird ruhig atmen

Und sanft deine Hände berühren.

Leiko Ikemura

Meinen Eltern gewidmet



1.6.2.2. <i>Mucuna pruriens</i>	32
1.7. Ziele der Arbeit	32
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>34</b>
2.1. Messung der physikochemischen Parameter Sauerstoffgehalt, Temperatur und pH-Wert	34
2.2. Elektrofischung	35
2.3. Sedierung der Salmoniden	36
2.3.1. Entnahme und Lagerung von Mukusproben	37
2.3.2. Entnahme und Lagerung von Schuppenproben	38
2.4. Molekularbiologische Untersuchungen	39
2.4.1. Kultivierung von <i>Saprolegnia ferax</i>	39
2.4.2. Isolierung der DNA	41
2.4.3. Primerauswahl	44
2.4.4. PCR-Bedingungen	45
2.4.5. Elektrophoretische Auftrennung der DNA	47
2.4.6. Aufreinigung der PCR-Produkte und Überprüfung der DNA-Sequenzierung	47
2.4.7. Mukusproben der Salmoniden	48
2.5. Morphologische Untersuchungen	48
2.5.1. <i>In vitro</i> -Versuche zur Behandlung von <i>Saprolegnia ferax</i>	49
2.5.1.1. Verdünnungsreihen und Tauchbäder zur Inkubation von <i>Saprolegnia ferax</i> mit Extrakten aus <i>Carica papaya</i> und <i>Mucuna pruriens</i>	49
2.5.2. Untersuchung der Schuppenproben	51
2.5.2.1. Präparation und Digitalisierung	51
2.5.2.2. Berechnungen des Längenzuwachses und Altersbestimmungen	52

<b>3. Ergebnisse</b>	56
3.1. Untersuchungen zu <i>Saprolegnia</i> spp.	56
3.1.1. Molekularbiologische Untersuchungen: Auswertung der Mukusproben	56
3.1.1.1. Nachweis von <i>Saprolegnia</i> spp. bei den Salmoniden in der Wupper	57
3.1.1.2. Vergleich der Probenstellen und Fischarten in Bezug auf den Befall mit <i>Saprolegnia</i> spp.	58
3.1.2. Morphologische Untersuchungen: Darstellung der <i>in vitro</i> -Versuche	67
3.1.2.1. Inkubation von <i>Saprolegnia ferax</i> mit Extrakten von <i>Carica papaya</i> und <i>Mucuna pruriens</i>	67
3.2. Ökologische Untersuchungen	71
3.2.1. Darstellung der physikochemischen Parameter 2009 bis 2015	71
3.2.2. Auswertung der Schuppenproben	86
3.2.2.1. Altersbestimmung der Salmoniden an den unterschiedlichen KM und im Jahresvergleich	86
3.2.2.2. Berechnungen des Längenzuwachses an den unterschiedlichen KM	90
<b>4. Diskussion</b>	93
4.1. Mukusproben als Nachweismöglichkeit von <i>Saprolegnia</i> spp. bei <i>Salmo trutta</i> und <i>Thymallus thymallus</i> an den unterschiedlichen KM im Jahresvergleich	93
4.2. Wirksamkeit der Extrakte von <i>Carica papaya</i> und <i>Mucuna pruriens</i> bei <i>in vitro</i> -Versuchen	98
4.3. Bewertung der gemessenen physikochemischen Parameter Temperatur, Sauerstoffgehalt und pH-Wert: Vergleich der Jahre und unterschiedlichen Probestellen	101

4.3.1. Der Einfluss der Temperatur auf die Biozönose und die Veränderungen in der Wupper	102
4.3.2. Der Sauerstoffgehalt in der Wupper	104
4.3.3. Bewertung der gemessenen pH-Werte in der Wupper	105
4.4. Auswertung der Schuppenproben: Alter und Längenwachstum der Salmoniden im Verlauf der Wupper	106
<b>5. Ausblick</b>	114
5.1. Der Befall mit <i>Saprolegnia</i> spp.: Auswirkungen auf die Salmonidenpopulation in der Wupper	114
5.2. Möglichkeiten einer phytotherapeutischen Behandlung zur Prävention von <i>Saprolegnia</i> spp. in der Aquazucht	114
5.3. Veränderungen der physikochemischen Parameter in der Wupper	116
5.4. Altersbestimmungen und weitere Forschungsfragen	116
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	117
<b>7. Danksagung</b>	144
<b>8. Anhang</b>	146
8.1. Herstellerangaben zu Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräten	
8.2. Rohdaten	
8.3. Abkürzungsverzeichnis	
8.4. Abbildungsverzeichnis	
8.5. Tabellenverzeichnis	
8.6. Selbstständigkeitserklärung	

## Abstract

In Germany the river Wupper flows through North-Rhine-Westfalia. It was originally inhabited by salmonids. But anthropogenous influences changed the fish fauna. Since then cyprinids dominate the river. Therefore physicochemical parameters were measured from 2009 till 2015 and analysed. They showed a changing temperature. Although the temperature was not exceeded for adults of *Salmo trutta* in the summer, it could be still defined as critical during the time of reproduction as well as during hatching.

Mucus can be seen as an adequate alternative to the traditional fin-clipping for molecularbiological testing of salmonids on the fish pathogen *Saprolegnia* spp.. With the help of molecularbiological analysis the pathogen could be documented on nearly 50 % of the salmonids, although an infestation could not be monitored on the fish while taking samples.

A comparison of the different seasons when the samples were taken showed a change of the occurrence of *Saprolegnia* spp. from September to May, regarding the years 2012 till 2015. Indeed no correlation between the measured temperature and the occurrence of *Saprolegnia* spp. could be made. The natural population of *S. trutta* is still being stocked, which could lead to the entry of *Saprolegnia* spp. in the river. Potentially it can happen that morphological normal fish are already infected. Instead of using chemicals for infected fish in aquaculture the application of phytotherapeutic extracts can be seen as an alternative treatment. *In vitro*-experiments showed that plant extracts of *Mucuna pruriens* and *Carica papaya* could be used to inhibit the growth of the mycel of *Saprolegnia ferax* in the long-term.

The analysis of scales showed that the sampled *Salmo trutta* and *Thymallus thymallus* were not older than four years. Additionally these analyses showed that the oldest and biggest individuals were caught in the warmest regions of the river.

## Zusammenfassung

Die Wupper fließt, als ursprüngliches Salmonidengewässer, durch NRW. Allerdings haben anthropogene Einflüsse die Fischfauna verändert - daher dominieren Cypriniden den Fluss. Bei der Analyse der physikochemischen Parameter konnte im Jahresvergleich von 2009 bis 2015 festgestellt werden, dass es zu einer veränderten Temperatursituation gekommen war: Seit 2013 wurden die Temperaturgrenzwerte für ein Salmonidengewässer in den Sommermonaten nicht mehr überschritten, dafür aber weiterhin zur Reproduktionszeit von *Salmo trutta* sowie zur Zeit des Schlupfes.

Als Alternative zum traditionellen fin-clipping eignen sich Mukusproben für molekularbiologische Analysen und wurden in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis von *Saprolegnia* spp. eingesetzt. Bei ca. 50 % der beprobten Salmoniden war auf molekularbiologischer Ebene ein Befall zu erkennen, obwohl die Fische augenscheinlich unauffällig waren. Bei einem Vergleich der Jahreszeiten, in denen die Proben genommen wurden, konnte festgestellt werden, dass es im Zeitraum von 2012 bis 2015 zu einer Verschiebung der saisonalen Häufigkeit von September zu Mai kam. Allerdings konnte beim Auftreten von *Saprolegnia* spp. kein Zusammenhang zur Temperatur hergestellt werden.

Nach wie vor werden Besatzmaßnahmen in der Wupper durchgeführt, die möglicherweise zu einem hohen Befall der Salmoniden mit *Saprolegnia* spp. beitragen können, da die Gefahr besteht, dass bereits infizierte, aber morphologisch unauffällige Fische, eingesetzt worden sein können. Eine alternative Behandlung in der Aquazucht stellt die Phytotherapie dar. An Hand von *in vitro*-Experimenten konnte in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, dass sich die Pflanzenextrakte von *Mucuna pruriens* und *Carica papaya* eignen, um das Wachstum des Myzels von *Saprolegnia ferax* langfristig zu inhibieren.

Die Analysen von Schuppenproben haben gezeigt, dass die in der Wupper beprobten Salmoniden *Salmo trutta* und *Thymallus thymallus* nicht älter als vier Jahre waren. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die ältesten und größten Individuen in Bereichen gefangen wurden, in denen die höchsten Temperaturspitzenwerte gemessen werden konnten.

## 1. Einleitung

Zunächst wird ein Einblick in die Hydromorphologie der Wupper in NRW sowie der darin heimischen Fischarten gegeben, wobei der Fokus auf die Salmoniden (Lachsartige) *Salmo trutta*, Linnaeus 1758 (Bachforelle), und *Thymallus thymallus*, Linnaeus 1758 (Europäische Äsche), gerichtet ist. Anschließend erfolgen die Darstellung der Probenentnahme und ein kurzer Einblick in das Schmerzempfinden von Fischen: Mukusproben eignen sich als fischschonende Methode zur Isolierung von genomischer DNA und bieten somit eine Alternative zum traditionellen fin-clipping. Der regelmäßige Besatz von Fischen aus der Aquazucht zur Stützung der natürlichen Population von *Salmo trutta* sowie z. T. veränderte physikochemische Parameter lassen vermuten, dass *Saprolegnia* spp. ideale Bedingungen vorfinden, die einer Ausbreitung im Gewässer förderlich sind. So kann er sich optimal auf den Salmoniden ansiedeln und ausbreiten.

### 1.1. Die Wupper als Salmonidengewässer

Der „Amazonas des Bergischen Landes“ hat in Börlinghausen seinen Ursprung und durchzieht bis zur Mündung in den Rhein bei Leverkusen mit einer Gesamtließstrecke von ca. 115 KM u. a. die Städte Wuppertal, Solingen und Leichlingen (Lacombe et al. 2000, Wupperverband 2011). Der Fokus der aktuellen Arbeit liegt auf dem Einzugsgebiet der „Unteren Wupper“, die sich vom Stausee Beyenburg bis zur Mündung in den Rhein erstreckt. Hierbei wurden die Proben flussabwärts von KM 61,4 bis KM 15,6 genommen (**Abb. 1**). Dieser Gewässerabschnitt wurde gewählt, weil anthropogene Einflüsse den ursprünglichen Zustand besonders in der „Unteren Wupper“ als Fischgebiet verändert haben: Die charakteristische Äschenregion wird heute von Cypriniden (Karpfenartige) dominiert.



**Abb. 1:** Verlauf der Wupper von der Quelle bis zur Mündung (Internetquelle 1). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurden Proben in der „Unteren Wupper“ genommen, die vom Stausee Beyenburg bis zur Mündung in den Rhein verläuft.

Bis zum 16. Jahrhundert war die Wupper ein schnellfließender und kühler Mittelgebirgsfluss mit vielfältigen Strukturen. Starkes Gefälle führte zu einem hohen  $O_2$ -Anteil im Gewässer. Steiniger, felsiger Untergrund bot den Salmoniden optimale Laichbedingungen. Viele unterschiedliche Fischarten besiedelten die Wupper: *S. trutta* und *T. thymallus* zählten als stationäre Fische zu den Stellvertretern der Salmoniden. Doch auch der Wanderfisch *Salmo salar*, Linnaeus 1758 (Atlantischer Lachs), war häufig vertreten.

*Barbus barbus*, Linnaeus 1758 (Barbe), und *Leuciscus cephalus*, Linnaeus 1758 (Döbel), repräsentierten als Cypriniden die Fischpopulation. Diese Artenvielfalt hatte für die Fischerei

und das gesamte ökologische System der Wupper eine wesentliche Bedeutung (Wuttke 1997, Lacombe et al. 2000, Wupperverband 2011). Doch mit Beginn der zunehmenden Industrialisierung wurde diese Vielfalt massiv beeinträchtigt:

1527 wurde den Gemeinden Barmen und Elberfeld das Exklusivrecht für Garnbleichung verliehen. Zahlreiche Abwässer durch Färbereien sowie Fäkalien wurden ungeklärt in die Wupper eingeleitet (Lacombe et al. 2000, Wupperverband 2011). Deutlich intensiver wurde die Belastung des Flusses durch die Industrialisierung zu Ende des 18. Jahrhunderts mit einer schnellwachsenden Textilproduktion (Wehler 2005). Aufgrund der ungeklärten Einleitungen von Fäkalien sowie der salz- und schwermetallhaltigen Abwässer war es nicht überraschend, dass die Fischerei Anfang des 19. Jahrhunderts zum Erliegen kam (Lacombe et al. 2000, Wupperverband 2011).

Erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts entwickelte sich ein Bewusstsein für die dringend erforderliche Wasserbewirtschaftung. 1930 kam es mit Gründung des Wupperverbandes durch die eingeführte Abwasserreinigung und die Unterhaltung von Nebengewässern zu einer Verbesserung der Gewässergüte. Wesentliche Erfolge erbrachte 30 Jahre später der Bau von Kläranlagen (Wupperverband 2011), doch der Grundzustand der Unteren Wupper blieb zunächst in der Güteklasse II-III („kritisch belastet“). In den 1980er Jahre erholte sich langsam der Fischbestand (Lacombe et al. 2011). Chemieunfälle in den Jahren 1988 und 1989 lösten Rückschläge durch massives Fischsterben aus. Im Einzugsbereich der Wupper gelangten fischtoxische Stoffe, wie z. B. Tenside, Ammoniak oder Natronlaugen in den Fluss: Es kam zu akutem O<sub>2</sub>-Mangel, der sich vor allem auf sauerstoffsensitive Arten wie *T. thymallus* letal auswirkte. *L. cephalus*, als Beispiel für robustere Arten, konnte ökologische Nischen besetzen und ist immer noch wesentlicher Bestandteil der heutigen Fischfauna (Wuttke 1997, Lacombe et al. 2000), (**Abb. 3** und **4**).

Die Chemieunfälle lösten Debatten um den Schutz der Wupper aus. Der 1990 vorgelegte Bewirtschaftungsplan „Untere Wupper“ vom Staatlichen Amt für Wasser- und Abfallwirtschaft Düsseldorf formuliert allgemeine Ziele, die dem Schutz und der Reinhaltung des Gewässers, sowie der Verbesserung der Lebens- und Umweltqualität dienen. Seitdem müssen Produktionsabwässer vor der Einleitung in den Fluss vorbehandelt werden. Der Ausbau von Kanalsystemen und Mischwasserbehandlungsanlagen hat einen positiven Effekt auf die Gewässerqualität. Die Wupper wird besonders auf toxisch wirkende Substanzen, die durch die chemische Industrie eingeleitet werden, regelmäßig überprüft. Im Laufe der Jahre verbesserte sich die Wasserqualität zunehmend - Salmoniden siedelten sich vermehrt an

(Lacombe et al. 2000). Allerdings gelangen Reinigungsmittel, Medikamente und Pflanzenschutzmittel trotz der Kläranlagen nach wie vor in die Wupper. Zudem ist eine vollständige Adsorption von Metallen an den Klärschlamm nicht erreichbar und eine deutliche Restfracht wird in die Gewässer eingeleitet (Bürgel et al. 2005). Seit 2000 werden europaweit in der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) einheitliche Ziele definiert, die dabei helfen sollen, den Gewässerschutz aktiv und nach vorgegebenen Kriterien umzusetzen. Die EU-Mitgliedstaaten sollen entweder den „guten Zustand“ ihrer Gewässer erreichen, indem sie die erforderlichen Maßnahmen im Rahmen integrierter Programme festlegen und umsetzen oder den guten Zustand bewahren. Der „gute Zustand“ eines Gewässers bedeutet, dass die Werte für die biologischen Qualitätskomponenten des Oberflächengewässertyps geringe anthropogene Abweichungen anzeigen. Sie weichen nur in geringem Maße von den Werten ab, die normalerweise bei Abwesenheit störender Einflüsse mit dem betreffenden Oberflächengewässertyp einhergehen (Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates).

### **1.1.1. Einflüsse physikochemischer Parameter auf Salmonidenpopulationen**

Die Auswirkungen physikochemischer Parameter auf ein Fließgewässer werden im Hinblick auf die Gewässergüte, die Veränderungen der Gewässerstrukturen und anthropogener Nutzungen regelmäßig kontrolliert. In der Fischgewässerrichtlinie (2006) werden daher Kriterien formuliert, die eingehalten werden müssen, um Salmoniden langfristig zu schützen und ihren Bestand in einem Fließgewässer zu etablieren. Gibson (1993) formuliert Basis-Kennwerte für die physikochemischen Parameter, die für geeignete Lebensbedingungen der Salmoniden notwendig sind. Als Basis-Kennwert der Temperatur wird nicht nur der Maximalwert für Adulte definiert, sondern auch der zur erfolgreichen Reproduktion benötigte Temperaturbereich (MUNLV 2006).

#### **1.1.1.1. Temperatureinflüsse auf ein Fließgewässer**

Die Temperatur zählt zu einem der wichtigsten Parameter im Gewässer: Sie beeinflusst alle biochemischen und physiologischen Aktivitäten der Organismen, sowie die Entwicklung der Flora (u. a. Cairns et al. 1978, Beitinger et al. 2000). Viele aquatische Organismen besitzen genetisch determinierte Temperaturbereiche innerhalb derer ein Leben bzw. Überleben

möglich ist. Örtlich und zeitlich auftretende Schwankungen der Temperaturen im Gewässer bestimmen das Vorkommen und die Bestandsbildung von Arten (Coutant 1977, Coutant 1987, Reinartz 2007). Salmoniden sind stenotherme Tiere, die nur einen geringen Temperatur- und Hitzetoleranzbereich besitzen (Currie et al. 1998, Moyes & Schulte 2008). Daher definiert die Fischgewässerrichtlinie (2006) für adulte Salmoniden eine Maximaltemperatur von 21,5 °C in den Sommermonaten unterhalb von Warmwassereinleitungen, während in den Wintermonaten eine Temperatur von maximal 10 °C erreicht werden darf. Die Temperatur nimmt somit als grundlegender Parameter Einfluss auf die Artenzusammensetzung sowie den Gesundheitszustand der aquatischen Zönose (Coutant 1987).

Die Wassertemperatur kann entweder natürlicherweise täglich und saisonal bedingt schwanken (Hari 2006) oder Resultat anthropogener Einflüsse sein. Dazu zählen Einleitungen von Kühlwasser (Magaud et al. 1997) und industrielle Abwässer (Schmidt 2004, MUNLV 2006). Thermischer Stress bezieht sich auf jeden Temperaturwechsel, der eine bedeutende Störung der normalen Funktionen der Süßwasser-Teleostei hat und beeinflusst die Überlebensrate negativ (Pickering 1981).

Fische haben die gleiche Körpertemperatur wie das sie umgebende Wasser (Moyes & Schulte 2008), daher sind bei ihnen zahlreiche Stoffwechselaktivitäten (z. B. Atmung und Verdauung) temperaturabhängig und laufen beschleunigt ab. Doch auch ihr Immunsystem wird durch eine erhöhte Temperatur beeinflusst (Coutant 1987, Reinartz 2007). Eine Temperaturerhöhung sensibilisiert die Organismen gegenüber toxischen Substanzen, Parasiten und Krankheiten (u. a. Cairns et al. 1978, Beitinger et al. 2000). Geringe Wassertemperaturen erzeugen hingegen thermischen Stress und wirken deshalb immunsuppressiv (Bly & Clem 1992). Deshalb kann ein Befall mit pathogenen Mikroorganismen leichter zum Ausbruch einer Erkrankung führen (Rottmann et al. 1992). Sie lösen bei Fischen einen lethargischen Zustand aus (Beitinger et al. 2000), so dass sie ihre Nahrungsaufnahme einstellen. Zusätzlich verlieren die Fische die Fähigkeit der Osmoregulation, das zentrale Nervensystem kollabiert (Brett 1956).

Im Vergleich dazu bewirken hohe Wassertemperaturen das Gegenteil: Bei Fischen kann dann eine erhöhte Aktivität beobachtet werden (Beitinger et al. 2000). Dadurch arbeitet der Metabolismus, in Abhängigkeit der jeweiligen Fischart, so schnell, dass die Fische nicht mehr genügend Nahrung finden und beginnen ihre Fettreserven aufzuzehren, um eine ausreichende Energiezufuhr zu gewährleisten (Brett 1956).

Fische versuchen ihre physiologischen, verhaltensökologischen und reproduktiven Funktionen den unterschiedlichen Temperatureinflüssen anzupassen (Coutant 1987). Sie vermeiden hohe Temperaturen (Beitinger et al. 2000) und migrieren während dieser Perioden in kühlere Areale. Dies wird als verhaltensgesteuerte Thermoregulation bezeichnet (Gibson 1966, Kaya et al. 1977, Berman & Quinn 1991, Moore et al. 2012). Fische orientieren sich dabei an thermischen Gradienten, die die Struktur des Habitats beeinflussen. Zusätzlich haben sie sich an thermale Nischen in ihren natürlichen Habitaten evolviert (Coutant 1987). Ebersole et al. (2001) konnten z. B. bei *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792 (Regenbogenforelle), Bewegungen in Kaltwasserrefugien bei einer Temperatur zwischen 18-25 °C beobachten, sobald die Temperatur nachmittags ihr Maximum erreicht hatte. Die Wanderbewegungen waren vorwiegend während einer Temperaturerhöhung im Sommer (Mitte Juli bis Mitte August) zu beobachten. Durch Abwanderung in kühlere Areale besitzen Fische die Möglichkeit Energie zu sparen, indem sie weniger aktiv sind (Moyes & Schulte 2008). Bei einem Temperaturwechsel spielt der Zeitraum, in dem er stattfindet, eine entscheidende Rolle. Natürliche, langsame Temperaturschwankungen wirken sich nicht negativ auf die Populationen aus, da sich aquatische Organismen gut daran adaptieren können. Auf plötzliche Schwankungen reagieren sie hingegen sehr sensitiv (Adam et al. 2013).

Die meisten Fischarten reagieren bzgl. ihres Wachstums äußerst sensitiv auf schwankende Umweltbedingungen (McDowall 1994). Brett et al. (1969) und Selong et al. (2001) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass *Oncorhynchus nerka*, Walbaum 1792 (Rotlachs), und *Salvelinus confluentus*, Suckley 1859 (Stierforelle), eine Optimaltemperatur für ihr Wachstum und die physiologischen Prozesse haben. Während *O. nerka* bei einer Temperatur von 15 °C ein stabiles Wachstum zeigen, kann *S. confluentus* Temperaturen bis zu 20 °C überleben.

Die Wassertemperatur hat zudem für den Zeitpunkt und den Ablauf der Reproduktion und das Überleben früherer Entwicklungsstadien eine entscheidende Bedeutung (Reinartz 2007): Sie spielt bei der Gonadenentwicklung, dem Ablaichen, aber auch der Entwicklung von Jungfischen eine essentielle Rolle (Hoffmann et al. 2011). Die Embryos und Larven rheophiler Fischarten können sich, im Vergleich zur tolerierten Temperaturspanne adulter Tiere, nur in einem vergleichsweise engen Temperaturbereich erfolgreich entwickeln (Reinartz 2007). Bei erhöhten Temperaturen während der Embryogenese verringern sich die Entwicklungsraten und der Prozentsatz an geschlüpften Ova. Gleichzeitig nimmt der Anteil an missgebildeten Larven dramatisch zu, die oft durch eine deformierte, stark verkrümmte Wirbelsäule zu erkennen sind. Sie können nicht schwimmen und sterben innerhalb weniger

Tage (Lahnsteiner 2012). Juvenile reagieren während der Entwicklungsphase besonders sensibel auf Schwankungen der Wassertemperatur (Windmann et al. 2001). In der Zeit von Dezember bis April müssen anthropogen bedingte Temperaturerhöhungen vermieden werden, während Temperaturerniedrigungen, z. B. durch Grundablässe aus Talsperren, die Wassertemperatur in der Zeit von Juni bis August nicht abkühlen dürfen, die Adulte nachhaltig beeinflussen (MUNLV 2006). Dies zieht langfristige Veränderungen in den Zusammensetzungen und damit in der Stabilität von Fischbeständen nach sich (Reinartz 2007).

#### **1.1.1.2. Der Eintrag von Sauerstoff und sein Einfluss auf die Biozönose**

Neben der Limitierung der Temperatur ist ein O<sub>2</sub>-Gehalt von mindestens 6 mg/ L für ein Salmonidengewässer vorgeschrieben (Fischgewässerrichtlinie 2006). In den Wintermonaten sollte der Sauerstoffgehalt allerdings 8 mg/ L nicht unterschreiten, um die Entwicklung der Ova nicht nachhaltig zu beeinflussen (Blohm et al. 1994).

Aus der Atmosphäre gelangt O<sub>2</sub> natürlicherweise über die Wasseroberfläche in ein Gewässer. Je niedriger die Temperatur, desto mehr O<sub>2</sub> kann im Wasser gelöst und gebunden werden. Der O<sub>2</sub>-Gehalt turbulent fließender, kalter Oberläufe ist somit höher, als der in langsam fließenden Flussunterläufen, die sich stärker erwärmen. Eine ausreichende Versorgung mit gelöstem O<sub>2</sub> ist für die meisten Wasserorganismen lebensnotwendig: Ein niedriger O<sub>2</sub>-Gehalt kann Fischsterben durch Ersticken verursachen (Adam et al. 2013). Der gelöste O<sub>2</sub> ist von den unterschiedlichen Temperaturen, den Schadstoffeinträgen und dem Ausmaß von Warmwassereinträgen abhängig (Alabaster & Lloyd 1980).

In Anpassung an ihren natürlichen Lebensraum haben die verschiedenen Fischarten physiologische Anpassungen an die jeweiligen O<sub>2</sub>-Verhältnisse entwickelt. Während die O<sub>2</sub>-bedürftigeren Salmoniden in sommerkühlen Oberläufen nachgewiesen werden können, siedeln sich Cypriniden in wärmeren, O<sub>2</sub>-ärmeren Flussregionen in den Unterläufen der Flüsse an (Adam et al. 2013).

Einige Fische verfügen über äußere O<sub>2</sub>-Chemorezeptoren, mit denen sie den O<sub>2</sub>-Gehalt des Wassers messen und eine umweltbedingte Hypoxie, aufgrund des erniedrigten O<sub>2</sub>-Gehalts im Wasser, wahrnehmen können. Sie verhindern die Hypoxie, indem verhaltensbiologische oder physiologische Reaktionen eingeleitet werden: Sollte ein Standortwechsel nicht möglich sein,

kommt es zu einem Absinken des Sauerstoffpartialdruckes ( $pO_2$ ) im Blut, welcher die inneren  $O_2$ -Chemorezeptoren stimuliert und dadurch zu einer stärkeren Ventilation führt. Bei der  $O_2$ -Ventilation öffnet der Fisch weit das Maul, um den Wasserstrom über seine Kiemen zu vergrößern und somit die Sauerstoffaufnahme zu erhöhen. Fische, die mittels Mund- und Kiemenhöhlenpumpe ventilieren, steigern die Frequenz und Tiefe dieser Bewegungen. Zusätzlich besteht für Fische die Möglichkeit an der Wasseroberfläche die dünne Schicht  $O_2$ -reicheren Wassers in der Luft bzw. der Wasser-Grenzschicht zu ventilieren. Sobald Fische über einen längeren Zeitraum  $O_2$ -Mangel ausgesetzt sind, steigt in Folge einer erhöhten Zahl an Erythrozyten die Hämoglobinkonzentration. Dies steigert die  $O_2$ -Bindekapazität und damit die  $O_2$ -Gewinnung aus der Wasser-Grenzschicht (Moyes & Schulte 2008).

### **1.1.1.3. Direkte und indirekte Einflüsse des pH-Wertes auf ein Fließgewässer**

Die Fischgewässerrichtlinie (2006) definiert für Salmonidengewässer einen Schwankungsbereich des pH-Wertes zwischen 6-9. Da er in einem Fließgewässer jedoch geringer ist, wirkt sich der normalerweise auftretende pH-Wert von 7 nicht negativ auf die Fischfauna und die Reproduktion aus (Staas et al. 2013).

Auch der pH-Wert kann die Biozönose beeinflussen (Kallert 2009): Die Festsetzung eines Grenzbereichs für den pH-Wertes basiert sowohl auf möglichen direkten Schädigungen v. a. der Kiemen durch saure oder alkalische Verätzung als auch indirekt durch eine mögliche Verschiebung des Ammonium-/ Ammoniak-Gleichgewichtes (MUNLV 2006). Wie stark Säuren und Basen den pH-Wert einer Lösung verändern, ist davon abhängig, wie leicht die Moleküle unter physiologischen Bedingungen dissoziieren (Rosenthal & Munro 1985). So können z. B. alkalische pH-Werte in Kombination mit erhöhtem Ammoniumgehalt zur Bildung von fischtoxischem Ammoniak führen (Kallert 2009).

### **1.1.2. Vorkommen und Lebensbedingungen der Salmoniden in der Wupper unter besonderer Betrachtung anthropogener Einflüsse**

Die Untere Wupper ist ein Fischgewässer im Sinne der Fischgewässer-Richtlinie der Europäischen Union. Um das Leben von Fischen zu erhalten, muss die Qualität von Süßwasser, das schutz- oder verbesserungswürdig ist, gewährleistet sein (Fischgewässerrichtlinie 2006). Die Fischgewässerrichtlinie (2006) definiert die Unterschiede

zwischen Cypriniden- und Salmonidengewässern unter Berücksichtigung verschiedener physikochemischer Parameter: Gewässer, in denen das Leben von Fischen solcher Arten wie *S. salar*, *S. trutta*, *T. thymallus* und *Coregonus*, Linnaeus 1758 (Renken), erhalten wird oder erhalten werden könnte, werden als Salmonidengewässer bezeichnet, während Gewässer, in denen das Leben von Fischen wie Cypriniden oder anderen wie z. B. *Esox lucius*, Linnaeus 1758 (Hecht), *Perca fluviatilis*, Linnaeus 1758 (Flussbarsch), und *Anguilla anguilla*, Linnaeus 1758 (Europäischer Aal), erhalten wird oder erhalten werden könnte, zu den Cyprinidengewässern gezählt werden.

Seit den 1990er Jahren ist die Untere Wupper laut Fischgewässerverordnung NRW als Cyprinidengewässer ausgewiesen (FischgewV 1997). Ursprünglich ist sie jedoch aufgrund ihrer naturräumlichen hydromorphologischen Gegebenheiten ein potentiell Salmonidengewässer (Bürgel et al. 2005). Die Leitbilder für die Fließgewässer in NRW erklären, welche Fische natürlicherweise im Fluss vorkommen sollten, wenn dieser frei von anthropogenen Einflüssen ist (LUA 1999, 2001).

#### Anthropogene Einflüsse wirken sich in der Wupper auch heute noch auf den Fischbestand und die Gewässerqualität aus:

Einerseits haben die Heizkraftwerke Elberfeld (KM 46,0) und Barmen (KM 52,8) im Stadtgebiet Wuppertal sowie im Winter der Betrieb der Kläranlage Buchenhofen (KM 40,4) jahrelang durch die Einleitung ihrer Kühlwässer eine Aufwärmung der Unteren Wupper verursacht, die sich auf die Artzusammensetzung des Fischbestandes, andere Organismengruppen und diverse biologische Prozesse auswirkt (MUNLV 2009). Durch die räumliche Nähe der verschiedenen Einleitungen kommt es zu einer Akkumulation der Wärmebelastung. Die negativen Auswirkungen der Wärmeeinleitungen können über eine Gesamtstrecke von insgesamt ca. 40 km nachgewiesen werden. Die Einleitungen der Kläranlage Buchenhofen unterhalb des Wuppertaler Stadtgebietes zeigen negative Auswirkungen auf die Gewässergüte und haben diese z. T. verändert. Sie führen tageweise zu einer Temperaturerhöhung, gekoppelt mit einem niedrigen O<sub>2</sub>-Gehalt (Bürgel et al. 2005). Andererseits erzeugt der Ablauf der Talsperre in Beyenburg durch die Speisung von Tiefenwasser eine Erniedrigung der Wassertemperatur.

Seit den 1990er Jahren hat sich die Gewässergüte verbessert und eine Rückkehr vieler Fischarten bewirkt. Insgesamt wurden in den letzten Jahren ca. 32 unterschiedliche Arten

nachgewiesen, von denen 22 als typische Fische der Wupper gelten. Dazu zählen einige Arten der Familie der Salmonidae, wie z. B. *S. trutta* oder *T. thymallus*. Als Stellvertreter für die Familie der Cyprinidae sind *B. barbatus*, *L. cephalus*, *P. phoxinus* sowie *Barbatula barbatula*, Linnaeus 1758 (Bachschmerle), vertreten (Wupperverband 2008). Salmoniden, die kälteres Wasser präferieren und ursprünglich in der Wupper vorkamen, wurden von den Cypriniden verdrängt, die höhere Wassertemperaturen benötigen (**Abb. 3**), (MUNLV 2009). Ein Indiz für diese Entwicklung ist das vermehrte Auftreten von *Phoxinus phoxinus*, Linnaeus 1758 (Elritze), an allen Probestellen im Flussverlauf. Bei einem Vergleich der unterschiedlichen KM kann ein Ungleichgewicht der Populationen nach der Einleitung der Heizkraftwerke beobachtet werden. Im Vorstadtbereich ist der Anteil an nachweisbaren Salmoniden wesentlich höher als unterhalb der Einleitungen.

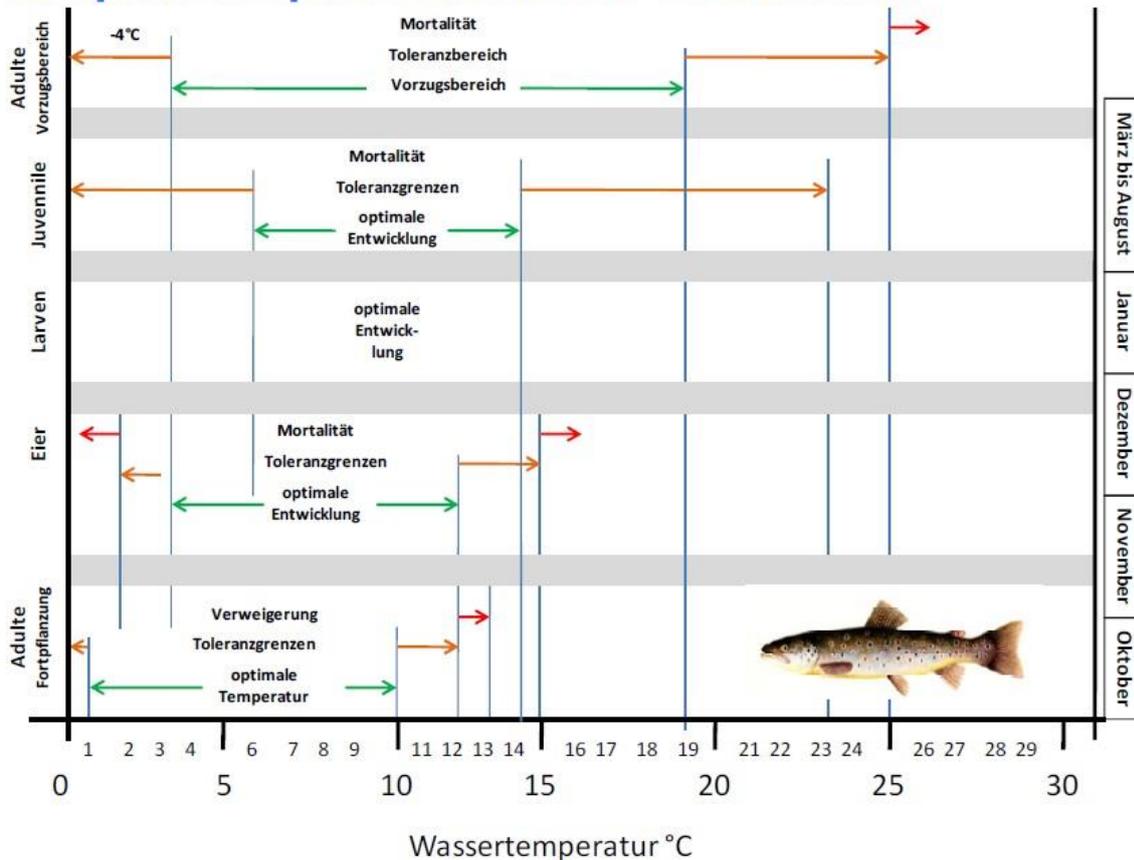
Im Stadtgebiet von Wuppertal wurden bis 2013 zwei Heizkraftwerke betrieben. Der Betrieb des Heizkraftwerks in Elberfeld erfolgt ganzjährig. Die Wärmeeinleitungen sind im Rahmen der zulässigen Grenzen. Das Heizkraftwerk in Barmen wird seit April 2013 nicht mehr kontinuierlich genutzt, sondern entsprechend der Anforderungen der Fernwärme und des Strommarktes eingesetzt. Zusätzlich wird es dann betrieben, wenn in Elberfeld die Versorgung auf Grund eines Kesselausfalls nicht gewährleistet wird (2014: Jan./ Feb. ca. 4 Wochen; Nov./ Dez. ca. 2 Wochen; 2015: Jan. ca. 2 Wochen und 2015 bei einem Gesamtstillstand des Heizkraftwerks Elberfeld im Juli für ca. 3 Wochen). Die Wärmeeinleitung ist insgesamt in diesen Fällen geringer als bei Kesselbetrieb im Heizkraftwerk Elberfeld. Als ausschlaggebend gelten die für die Wupper zulässigen Temperaturen, die jahreszeitlich gestaffelt sind und je nach Abflussmenge zu einer Aufwärmung der Wupper führen (Leonhard 2016, Internetquelle 3).

Die Einführung eines Temperaturmanagements soll helfen, den Salmonidenbestand in der Wupper zu etablieren und die rheophilen Zielarten zu schützen (MUNLV 2009). Es müssen jahreszeitliche Temperaturgradienten gewählt werden, die den natürlichen Bedingungen ähnlich sind und die Letalgrenzen in keinem Entwicklungsstadium überschreiten (Hoffmann et al. 2011). Dabei werden art- und entwicklungsspezifische Grenzwerte definiert, ab deren Erreichen eine normale Entwicklung der Zielfischarten, wie z. B. *S. salar*, nicht mehr möglich ist (Windmann et al. 2011).

**Abb. 2** zeigt die Temperaturspannweiten von *S. trutta* als Stellvertreter der Salmoniden in der Wupper, die in Abhängigkeit der unterschiedlichen Lebensstadien variiert. Von März bis August tolerieren Adulte eine Temperatur von ca. 3-19 °C, zur Reproduktion in den Monaten

Oktober und November jedoch nur eine geringe Temperaturspannweite von 1-10 °C. Die Ova und Juvenilen besitzen die geringste Akzeptanz gegenüber Temperaturschwankungen. Während die Ova im November und Dezember eine Temperatur von ca. 3-12 °C benötigen, können Juvenile von März bis August Schwankungen von 6-15 °C akzeptieren.

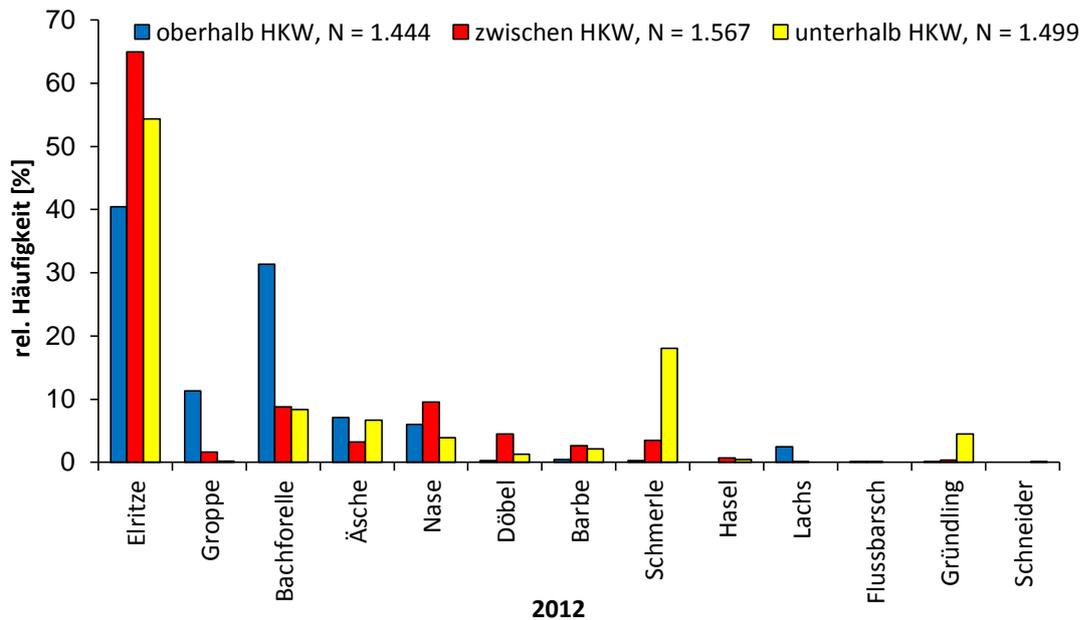
## Temperaturspannweiten der Fischfauna



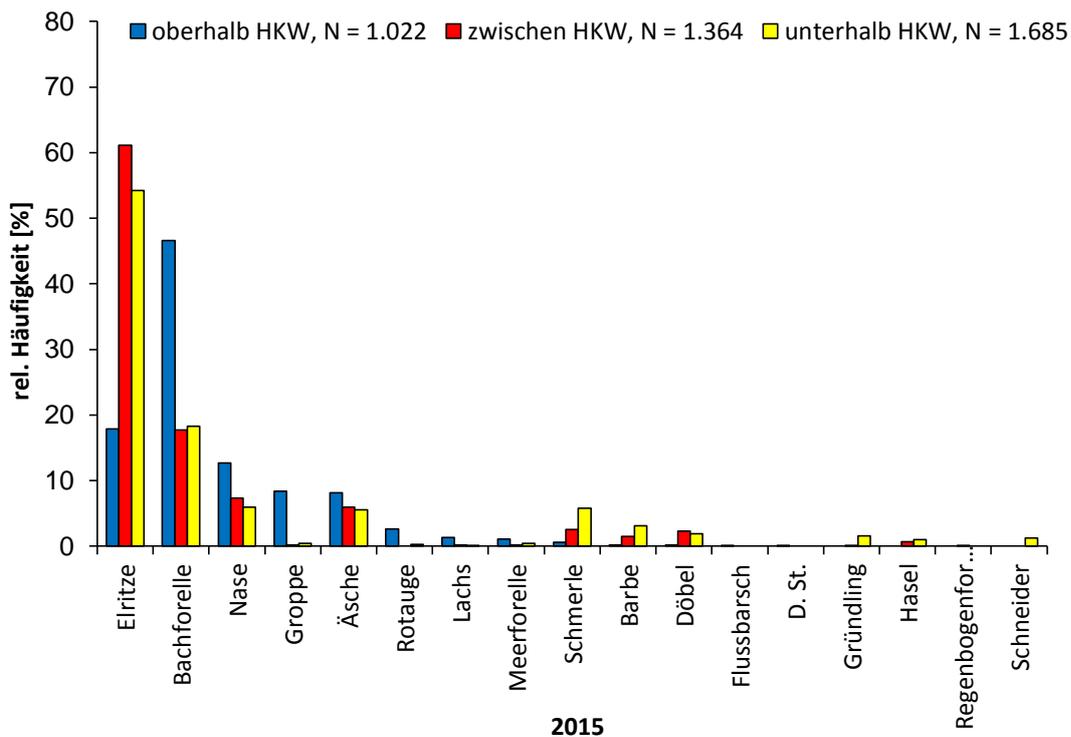
**Abb. 2:** Dynamisches Temperaturmanagement in der Wupper. Dargestellt werden die Temperaturspannweiten und Grenzbereiche der Fischfauna in der Wupper in ihren unterschiedlichen Lebensphasen mit besonderem Fokus auf die Salmoniden (verändert nach Hoffmann 2009).

→ Mortalität/ Verweigerung, → Toleranzgrenzen, → optimale Temperatur

Die **Abb. 3** und **4** zeigen exemplarisch die relative Häufigkeit der einzelnen Fischarten in den Jahren 2012 und 2015, verteilt an den unterschiedlichen Probestrecken in der Wupper (zum Beginn bzw. zum Ende der Probenaufnahme für die vorliegenden Auswertungen).



**Abb. 3:** Relative Häufigkeit der Wupperfische 2012. Die Abb. zeigt die unterschiedlichen Fischarten an den unterschiedlichen KM. Der Fokus liegt im Bereich der Warmwassereinleitungen der beiden Heizkraftwerke (HKW) in Barmen und Elberfeld. Gleichzeitig wird das Dominanzverhalten der einzelnen Arten sowie die Gesamtzahl (N) der gefangenen Fische in den unterschiedlichen Bereichen dargestellt (verändert nach BUGEfi 2012).



**Abb. 4:** Relative Häufigkeit der Wupperfische 2015. Die Abb. zeigt die unterschiedlichen Fischarten an den unterschiedlichen KM. Der Fokus liegt im Bereich der Warmwassereinleitungen der beiden Heizkraftwerke (HKW) in Barmen und Elberfeld. Gleichzeitig wird das Dominanzverhalten der einzelnen Arten sowie die Gesamtzahl (N) der gefangenen Fische in den unterschiedlichen Bereichen dargestellt (verändert nach BUGEfi 2015).

Bei einem Vergleich der Diagramme können folgende Entwicklungstrends festgestellt werden:

- der Dominanzanteil von *P. phoxinus* ist immer noch hoch
- die Populationen von *S. trutta* und *T. thymallus* nehmen nur langsam zu.

## **1.2. Vorkommen und Biologie ausgewählter Salmoniden**

Die Familien der Salmonidae und Thymallidae zählen zur Unterordnung der Salmoniformes (Storch & Welsch 2004) und damit zur Überordnung der Teleostei (Nikolski 1957). Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf den Arten *S. trutta* und *T. thymallus*.

### **1.2.1. Vorkommen von *Salmo trutta* und *Thymallus thymallus* in der Wupper**

Seit 2009 kooperiert der Lehrstuhl für Zoologie der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Bergischen Universität Wuppertal mit dem Büro für Umweltplanung, Gewässermanagement und Fischerei (BUGeFi), Bielefeld, und erhebt im Rahmen von Monitoringstudien Daten über die Fischpopulationen der Wupper. Der Fokus liegt hierbei auf der Entwicklung bzw. Erholung des Bestandes der ursprünglich heimischen Salmonidenarten *S. trutta* und *T. thymallus*.

### **1.2.2. Biologie *Salmo trutta***

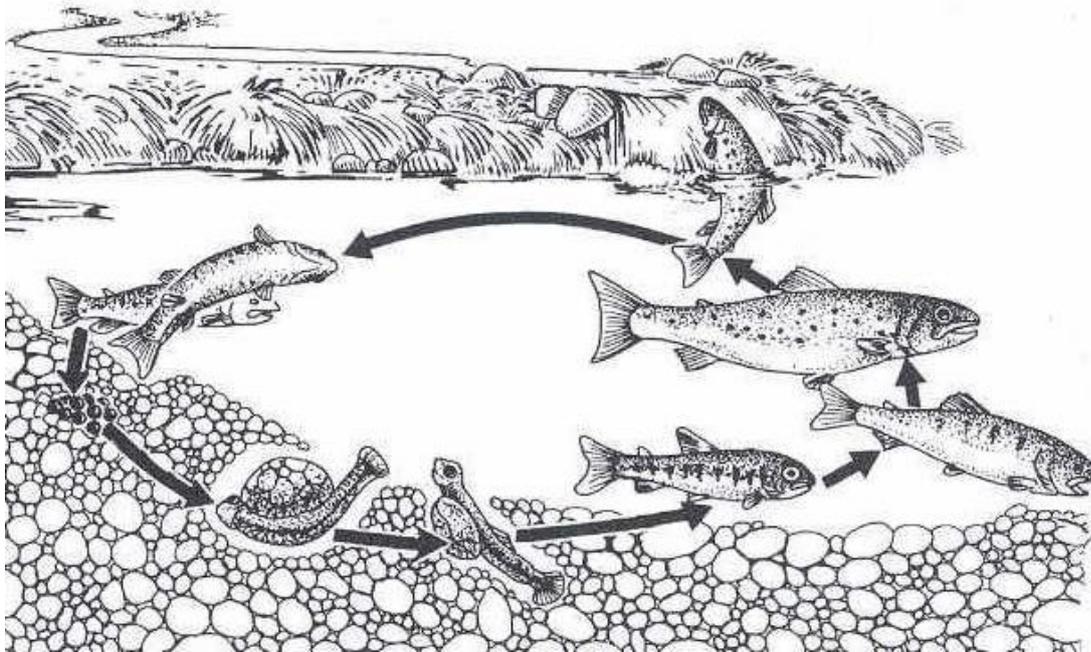
*S. trutta* (**Abb. 5**) besiedeln klare, kühle und O<sub>2</sub>-reiche Gewässer mit starker Strömung. In ihrem Habitat halten sich *S. trutta* vorwiegend unter O<sub>2</sub>-reichen Schussstrecken sowie unter ausgehöhlten Ufern auf (Brehm & Meijering 1996), das sich durch Kies- und Geröllgrund auszeichnet (Gebhardt & Ness 2005). *S. trutta* stellen hohe Ansprüche an die Gewässergüte, besonders der O<sub>2</sub>-Gehalt spielt eine wichtige Rolle. Temperaturschwankungen oder ein Temperaturanstieg gefährden ihren Bestand (Brehm & Meijering 1996).



**Abb. 5:** Adulte *S. trutta*. Das Foto zeigt eine *S. trutta* in der Wupper, die während einer Elektrofischerei gefangen wurde und von der anschließend Schuppen- und Mukusproben entnommen wurden (Foto: Heucken 2012).

*S. trutta* steigen als potamodrome Wanderfische (Wanderungen von Fischen, die sich unabhängig von der Länge der Wanderwege auf das Süßwasser beschränken) zur Laichzeit von Oktober bis Dezember kurze Strecken flussaufwärts, um dort in einem geeigneten Habitat abzulaichen. Der Beginn der Laichzeit wird durch die Tageslänge gesteuert, während die Wanderungsaktivität durch Wassertemperatur, O<sub>2</sub>-Konzentration und Trübung beeinflusst wird. Für die Ablage der Ova wird von den Rognern eine Laichgrube in das Sohlsubstrat geschlagen (**Abb. 6**). Die Embryonen können sich nur erfolgreich entwickeln, wenn es weder zu einer Veränderung von physikochemischen Parametern, mechanischen Einwirkungen auf das Laichsubstrat (Hochwasser) oder der Sedimentation der Gewässersohle kommt (Holm 2000). In Abhängigkeit der Temperatur schlüpfen die Larven zwischen März und April. Dort halten sie sich bis zum fortgeschrittenen Abbau des Dottersacks im Kiesbett auf, um anschließend zu emigrieren und mit der Nahrungsaufnahme zu beginnen. Der Porenraum kann durch Feinsedimentablagerungen im Sohlsubstrat verstopft werden und die Emergenz behindern. Kurze Zeit später setzt mit der Nahrungsaufnahme das Territorialverhalten ein. Salmoniden benötigen Unterstände, visuelle Isolation, Strömungsschutz sowie reduzierte Lichtverhältnisse. Besonders junge Bachforellen halten sich in schnell fließenden, gut strukturierten Gewässern auf, die auch im Sommer kühl bleiben (Holm 2000). Kleine, wirbellose Gewässerorganismen sind die Hauptnahrungsquelle der Brut. Im weiteren Verlauf ihrer Entwicklung ernähren sich *S. trutta* auch von fliegenden Insekten über der Wasseroberfläche (Brehm & Meijering 1996). Kleinfische wie z. B. *Gobio gobio*, Linnaeus 1758 (Gründlinge), zählen zur Nahrung der Adulten, genauso wie ihre eigene Brut oder

Amphibien und deren Larven (Gebardt & Ness 2005).

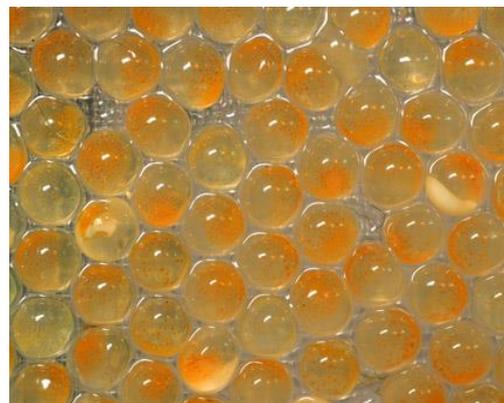


**Abb. 6:** Lebenszyklus Salmoniden. In der Abb. werden die unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus der Salmoniden im Fließgewässer dargestellt (verändert nach Holm 2000).

Populationsdynamische Parameter steuern und beeinflussen das Einsetzen der Geschlechtsreife, die in der Regel bei Milchneuren mit zwei, bei Rognern mit drei Jahren einsetzt (Holm 2000). Besonders bei den Ova (**Abb. 7 A**) können sich selbst kurzfristige Temperaturüberschreitungen negativ auf deren Entwicklung auswirken (**Kap. 1.1.1.1.**), (Elliott & Elliott 2010, Lahnsteiner 2012). Zudem reagieren sie sehr sensitiv auf Abwasserbelastungen (Blohm et al. 1994).



**Abb. 7: A** Ova *S. trutta* (Internetquelle 5)



**B:** Ova *T. thymallus* (Internetquelle 6)

Die **Abb. 7 A** und **B** zeigen die Ova der beiden Salmonidenarten. In diesem Stadium sind sie besonders sensibel gegenüber veränderten physikochemischen Parametern und anfälliger für Krankheiten.

Auch heute noch zählen *S. trutta* zu den gefährdeten heimischen Fischarten in NRW. Grund dafür sind nach wie vor anthropogene Einflüsse, wie z. B. Gewässerverschmutzung oder naturferner Ausbau (MUNLV 2003). Um den Salmonidenbestand zu schützen wurden gerade in den letzten Jahren in der Wupper vermehrt Maßnahmen durchgeführt: Dazu zählen einerseits Renaturierungsmaßnahmen, um einzelne Gewässerabschnitte für die Salmoniden naturnah zu gestalten, andererseits Maßnahmen bzgl. der Verbesserung der physikochemischen Parameter.

### 1.2.3. Biologie *Thymallus thymallus*

*T. thymallus* (Abb. 8) leben in rasch fließenden größeren Bächen und kleinen Flüssen mit klarem, kühlem Wasser auf sandig-kiesigen Grund. Sie bevorzugen tieferes Wasser mit größeren Kolken. Wie *S. trutta* unternehmen sie während der Laichzeit von März bis Mai kurze Wanderungen flussaufwärts, um dort die Ova (Abb. 7 B) ins Interstitial abzugeben (Gebhardt & Ness 2005).



**Abb. 8:** Adulte *T. thymallus*. Charakteristisch für eine adulte *T. thymallus* ist der Äschenkamm, der besonders während der Laichzeit als sekundäres Geschlechtsmerkmal eine wichtige Bedeutung bei der Partnerwahl und bei der Reproduktion hat. Rogner präferieren Milchner mit ausgeprägtem Kamm (Foto: Internetquelle 8).

Zur Nahrung der Brütlinge zählen Insektenlarven, Schnecken und Würmer. Kleine Fische und Fischlaich sind die Nahrung der Adulten. *T. thymallus* reagieren sehr sensitiv auf Gewässerverschmutzung und Gewässerausbau (Gebhardt & Ness 2005) und sind ein bedeutsamer Indikator für eine gute Gewässerqualität (Greenhalgh 2007). Nach wie vor zählen *T. thymallus* zu einer sehr gefährdeten heimischen Fischart (Schmidt 2004).

### 1.3. Besatzfische in der Wupper

Die Besatzfische von *S. trutta* in der Wupper entstammen zum größten Teil aus einem „Pooling-Verfahren“, bei dem Milchner aus Wildfängen mit Rognern aus Farmen gekreuzt werden, um eine genetische Variabilität zu gewährleisten. Generell werden an allen anfahrbaren Stellen entlang des Flusses Brütlinge und Vorgestreckte (ca. 4-6 cm) von *S. trutta* ausgesetzt. In der Regel sind dies 20 kg pro ha Wasserkörper. Die Brütlinge werden auf der Strecke zwischen der Wuppertalsperre und dem Morsbach verteilt. Ein Anteil wird unterhalb der Wuppertalsperre auf Grund der kälteren Frühjahrstemperaturen ausgesetzt. Die Struktur des Gewässers und die Prädation beeinflussen ebenso den Besatz. Einige Brütlinge werden für ca. 6 Wochen angefüttert. Diese vorgestreckten Fische werden in Bereichen ausgesetzt, die für den Brütlingsbesatz ungeeignet sind. Der Besatz von Vorgestreckten ist u. a. vom Wunsch der Nutzer bzw. Pächter der Gewässerabschnitte abhängig. Im Herbst findet jeweils ein Monitoring statt, um Aussagen über den Erfolg des Besatzes machen zu können. Grundsätzlich werden in der Wupper keine *T. thymallus* besetzt (Internetquelle 4, Wuttke 2016).

Um den heimischen Bestand zu hegen und zu erhalten muss die Artenzusammensetzung der heimischen Fischfauna berücksichtigt werden (Schmidt 2004). In Deutschland wird das Aussetzen von Fischen in Fließ- und Stillgewässern auf Länderebene durch die jeweiligen Landesfischereigesetze geregelt: § 3 des Landesfischereigesetzes (LFischG 1994) definiert, dass der heimische Fischbestand erhalten und gepflegt werden muss. Zusätzlich dürfen laut § 14 der Landesfischereiordnung (LFischO 2010) keine Fische besetzt werden, die einen erkennbaren Parasitenbefall oder andere Krankheitssymptome haben.

Anthropogene Einflüsse (z. B. Aquazucht, Besatzmaßnahmen, Gewässerverschmutzung durch industrielle und landwirtschaftliche Nutzung) sind oft Ursache für viele mögliche Interaktionen zwischen wilden und gezüchteten Populationen (Håstein & Lindstad 1991). Der Besatz von Fischen hat nicht nur auf die genetische Variabilität in den Fließgewässern Einfluss, sondern kann zu einem Eintrag von Parasiten führen, so dass sich verschiedene Krankheiten ungehindert ausbreiten können und es zur Übertragung auf die Populationen in den Fließgewässern kommen kann (Almodóvar & Nicola 2004, Hickley & Chare 2004, van Zyll de Jong et al. 2004, Schmidt 2004). Durch unsachgemäßes Handeln können eingeschleppte Krankheiten außer Kontrolle geraten (Håstein & Lindstad 1991). In vielen Fließgewässern Deutschlands müssen die Populationen nach wie vor durch Besatzmaßnahmen gestützt werden. Sie werden jedoch z. T. nicht als erfolgreich gesehen, da

sich entgegen der Erwartungen die Populationen in den meisten Fällen nicht selbstständig reproduzieren können. *S. trutta* zählt zu den am häufigsten besetzten Fischarten in den Mittelgebirgsbächen NRWs (MUNLV 2003).

Gerade in der Aquazucht benötigen Salmoniden eine hohe Gewässerqualität. Auf umweltbedingten Stress reagieren sie sehr sensitiv (Pickering 1989). Durch die daraus resultierende Schwächung des Immunsystems sind Fische nicht mehr in der Lage, unterschiedliche Krankheitserreger abzuwehren, so dass es vermehrt zu Krankheitsausbrüchen kommt. Dazu zählen ebenfalls Erreger, die einen gesunden Fisch normalerweise nicht angreifen (Hamers & Schreckenbach 2002). Besonders in Erbrütungseinrichtungen mit hohen Eidichten ist eine starke Gefährdung in Bezug auf Infektionen zu erkennen (Kallert 2009).

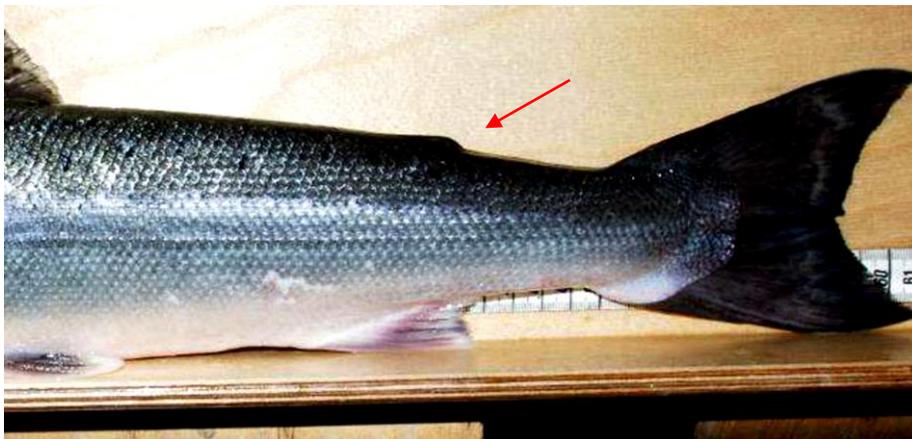
#### **1.4. Fin-clipping und Schmerzempfinden**

Flossenschnitte dienen oft als Basis für molekularbiologische Analysen. Traditionell werden ca. 20-50 mm<sup>2</sup> Gewebe des Flossensaums mit einem scharfen Messer entnommen (Müller-Belecke 2008, 2011). Alternativ wird die Adipose zu Markierungszwecken amputiert (Buckland-Nicks et al. 2011). Die Schnitte werden meist an der Adipose, der pektoralen oder ventralen Flosse gesetzt (BUWAL 2002), (**Abb. 9**). Die pektorale oder ventrale Flosse wird teilweise oder vollständig amputiert. Die von Flossenstrahlen aufgespannten Flossen können sich regenerieren, bleiben allerdings verkrüppelt. Bei Salmoniden wird oft die, zwischen der dorsalen und kaudalen Flosse gelegene, bindegewebsartige Adipose abgeschnitten (**Abb. 10**), die sich jedoch nicht mehr regenerieren kann (Dumont et al. 2012).

Der Adipose wird eine sensorische Innervation zugesprochen (Van der Haegen et al. 2005). Sie wird von einem neuronalen Netzwerk durchzogen, das eine hydrodynamische Funktion hat (Reimchen & Temple 2004, Buckland-Nicks et al. 2011). Zusätzlich konnte eine eindeutige Verbindung zwischen dem Vorkommen der Adipose und den Strömungsverhältnissen nachgewiesen werden (Temple & Reimchen 2008). Das Amputieren der Flosse stellt daher eine massive Beeinträchtigung des Fisches dar.



**Abb. 9:** *S. salar* mit Adipose (Internetquelle 9). Sie wird von einem neuronalen Netzwerk durchzogen, das eine hydrodynamische Funktion hat. Ihr Verlust stellt somit eine massive Beeinträchtigung dar.



**Abb. 10:** *S. salar* mit amputierter Adipose (Adam et al. 2013). Die Abb. zeigt den für Salmoniden charakteristischen Adiposenschnitt, bei dem diese komplett entfernt wird und sich nicht mehr regenerieren kann. Dadurch wird eine lebenslange Markierung bzw. Wiedererkennung gewährleistet.

Durch Flossenschnitt markierten Setzlinge von *O. nerka* konnten im Vergleich zu unmarkierten Tieren nach 3 bis 4 Jahren eine Sterblichkeitsrate von 39 % attribuiert werden (Weber & Wahle 1969). Nicola & Cordone (1973) zeigten in ihren Untersuchungen, dass das Entfernen der Adipose das Überleben um 50 %, das Entfernen der ventralen Flosse das Überleben sogar um 60-70 % reduzierte, während sich das Entfernen der pectoralen oder dorsalen Flosse um 70-80 % negativ auf die Überlebensrate auswirkte.

Hormonausschüttungen während der Geschlechtsreife führen zu einer vergrößerten Adipose bei Milchneuren (Beacham & Murray 1986). Die Adipose spielt bei der Reproduktion als sekundäres Geschlechtsmerkmal offensichtlich eine wichtige Rolle. Bei einigen

Salmonidenarten konnte gezeigt werden, dass die Rogner die Milchner in Abhängigkeit der Größe ihrer Adipose wählen. Die Rogner von *S. trutta* zeigten gegenüber Milchnern mit kleiner Adipose ein aggressives Verhalten. Aus welchem Grund Rogner Milchner mit großer Adipose präferieren ist bislang nicht bekannt (Petersson et al. 1999).

Nozizeptoren, die für das Schmerzempfinden bei Säugetieren verantwortlich sind, kommen bei Teleostei selten vor oder fehlen sogar (Rose et al. 2012). Das Gehirn der Fische besitzt weder einen zerebralen Cortex, der für das Schmerzempfinden bei Menschen verantwortlich ist, noch einen Neocortex (Rose 2002). Sie haben daher nicht das gleiche Schmerzempfinden wie Menschen. Behavioristische, physiologische und neurobiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Reaktionen von Fischen auf nozizeptive Stimuli limitiert sind (Rose et al. 2012). Ob und in welchem Umfang Fische Schmerzen empfinden können ist bis heute nicht abschließend geklärt. Durch ungünstige Hälterungsbedingungen oder falsches Handling werden Fischen jedoch erheblicher Stress und oft nachhaltige Schäden zugefügt, die von tierschutzrechtlicher Relevanz sind (Tierschutzbericht 2003).

### **1.5. Probenentnahme bei Fischen und die Novellierung des Tierschutzgesetzes**

Schon die ursprüngliche Fassung des Tierschutzgesetzes manifestiert in § 1: „Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen (TierSchG 1972).

Sowohl die Erneuerung des Tierschutzgesetzes im Jahr 2013 (TierSchG 1972) als auch die Verordnung zur Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU (2013) verlangen, dass jeder Eingriff an einem Tier angezeigt werden muss. § 8 des novellierten Tierschutzgesetzes von 2016 besagt: „Wer Versuche an Wirbeltieren oder Kopffüßern durchführen will, bedarf der Genehmigung des Versuchsvorhabens durch die zuständige Behörde“ (TierSchG 1972). In Anlehnung an die Novellierung des Tierschutzgesetzes wurden Mukusproben von *S. trutta* und *T. thymallus* für die molekularbiologischen Analysen der vorliegenden Untersuchung genommen, die als Alternative zu Gewebeproben dienen und Rückschlüsse auf die Entwicklung und den Gesundheitszustand der Salmoniden geben sollen.

### **1.5.1. Mukusbeschaffenheit: Alternative zum fin-clipping**

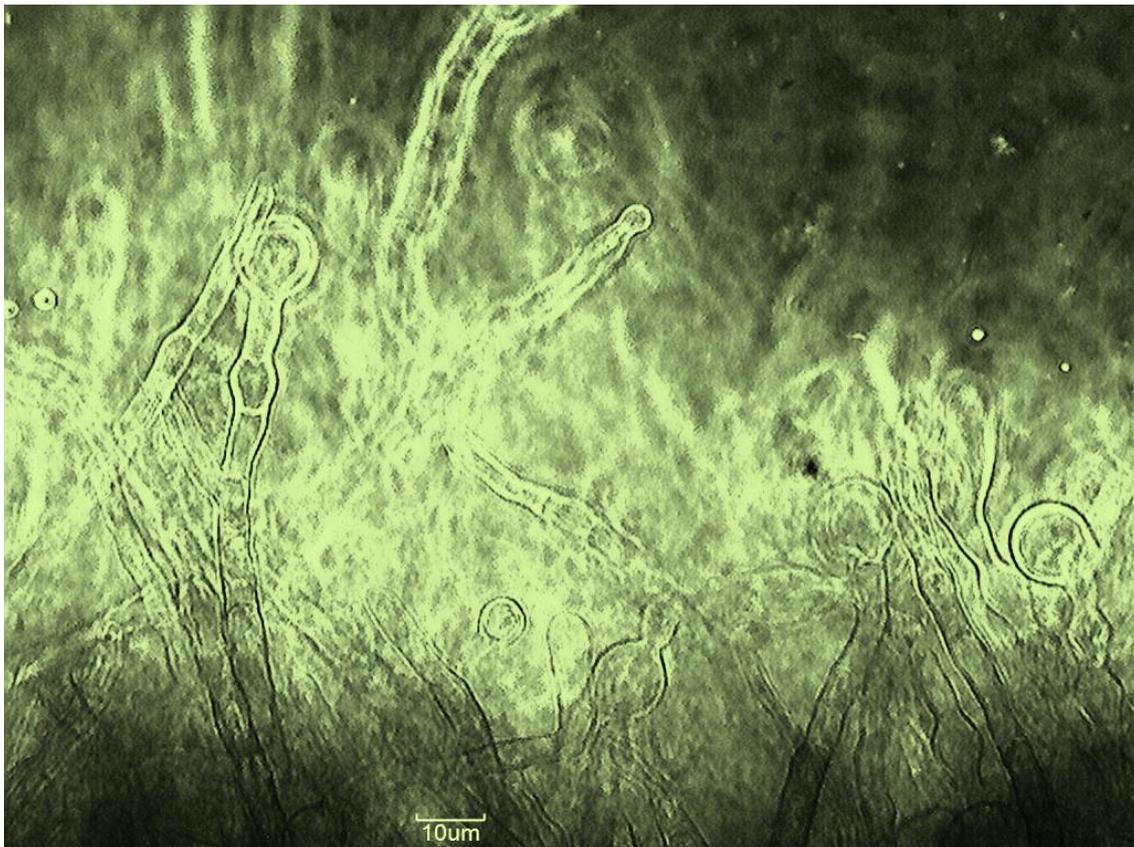
Mucus besitzt eine charakteristische Multifunktionalität: Die Epidermis der Teleostei und die assoziierte Mukusschicht, die sich über die gesamte Körperoberfläche erstreckt und kontinuierlich erneuert wird, bilden eine unmittelbare Barriere gegenüber möglichen Bakterien, Pilzen, Parasiten und Pathogenen in der Umwelt (Pickering 1974, Pickering & Macey 1977, Eddy & Fraser 1982). Auf der Mukusschicht kommen die Pathogene in Kontakt mit ihrem Wirt (Wood et al. 1988). Fletcher & Grant (1969) sprechen ihm eine immunologische Rolle zu. Er ist ein wichtiger Abwehrmechanismus gegenüber *Saprolegnia* spp. (Cross & Willoughby 1989), da er antimikrobielle Komponenten (Immunoglobuline oder Antikörper, Lysozyme, oder proteolytische Enzyme) besitzt, die invadierende Zoosporen abtöten (Durborow et al. 2003).

Shephard (1994) konnte in seinen Untersuchungen zeigen, dass der Mucus für die Respiration sowie die ionische und osmotische Regulation verantwortlich ist. Sollte es durch belastende Wirkstoffe in der Umwelt eines Fisches zu Verlusten von Mucus kommen, kann er sich regenerieren (Eddy & Fraser 1982). Stress und Krankheiten führen zu vermehrter Mucusproduktion und zur Bildung einer dickeren Mukusschicht (Shephard 1993). Wood et al. (1988) konnten bestätigen, dass eine beträchtliche Beseitigung der Sporen auf der Oberfläche des Fisches stattfindet. Somit kann vermutet werden, dass Pilzsporen zunächst aufgenommen und anschließend sezerniert werden (Willoughby et al. 1983). Der Verlust von Mucus oder eine verringerte Mucusproduktion sind für die höhere Anfälligkeit gegenüber mykotischen Erkrankungen verantwortlich (Pickering & Macey 1977, Richards & Pickering 1979, Pickering & Christie 1980) und bieten eine geeignete Angriffsfläche für die Sporen von *Saprolegnia* spp. (Durborow et al. 2003).

### **1.6. Biologie von *Saprolegnia* spp.**

Die Saprolegniales gehören zu den Oomyceten (Eipilze) innerhalb der Stramenopila. Zu diesen gehören neben den Braunalgen und Diatomeen auch verschiedene andere eukaryotische Protisten (Baldauf et al. 2000). Richards et al. (2006) konnten in ihren phylogenetischen Untersuchungen Hinweise dafür finden, dass mehrfach ein horizontaler Gentransfer (Transfer von Genen von einem Organismus in einen anderen) zwischen den filamentösen Ascomyceten (Schlauchpilze) und den weit entfernt verwandten Oomyceten stattgefunden hat.

Oomyceten unterscheiden sich von Echten Pilzen z. B. dadurch, dass sie anstelle von Chitin Zellulose in ihre Zellwände einlagern (Phillips et al. 2008). Oomyceten sind Echten Pilzen in folgenden Aspekten sehr ähnlich: Sie bilden ein fadenförmiges Myzel aus Hyphen (**Abb. 11**), (Berkeley 1846, Neish & Hughes 1980). Dabei treten baumwollähnliche Strukturen zunächst am Kopf, der Adipose oder der Kaudalen auf (Hatai & Hoshiai 1992). Das Myzel breitet sich anschließend von der ursprünglichen Stelle der Infektion über den Körper aus (Bruno & Wood 1999). Wie Echte Pilze haben Oomyceten eine ähnliche fakultativ nekrotrophe oder saprotrophe Ernährungsweise (Neish & Hughes 1980, Pickering & Willoughby 1982).



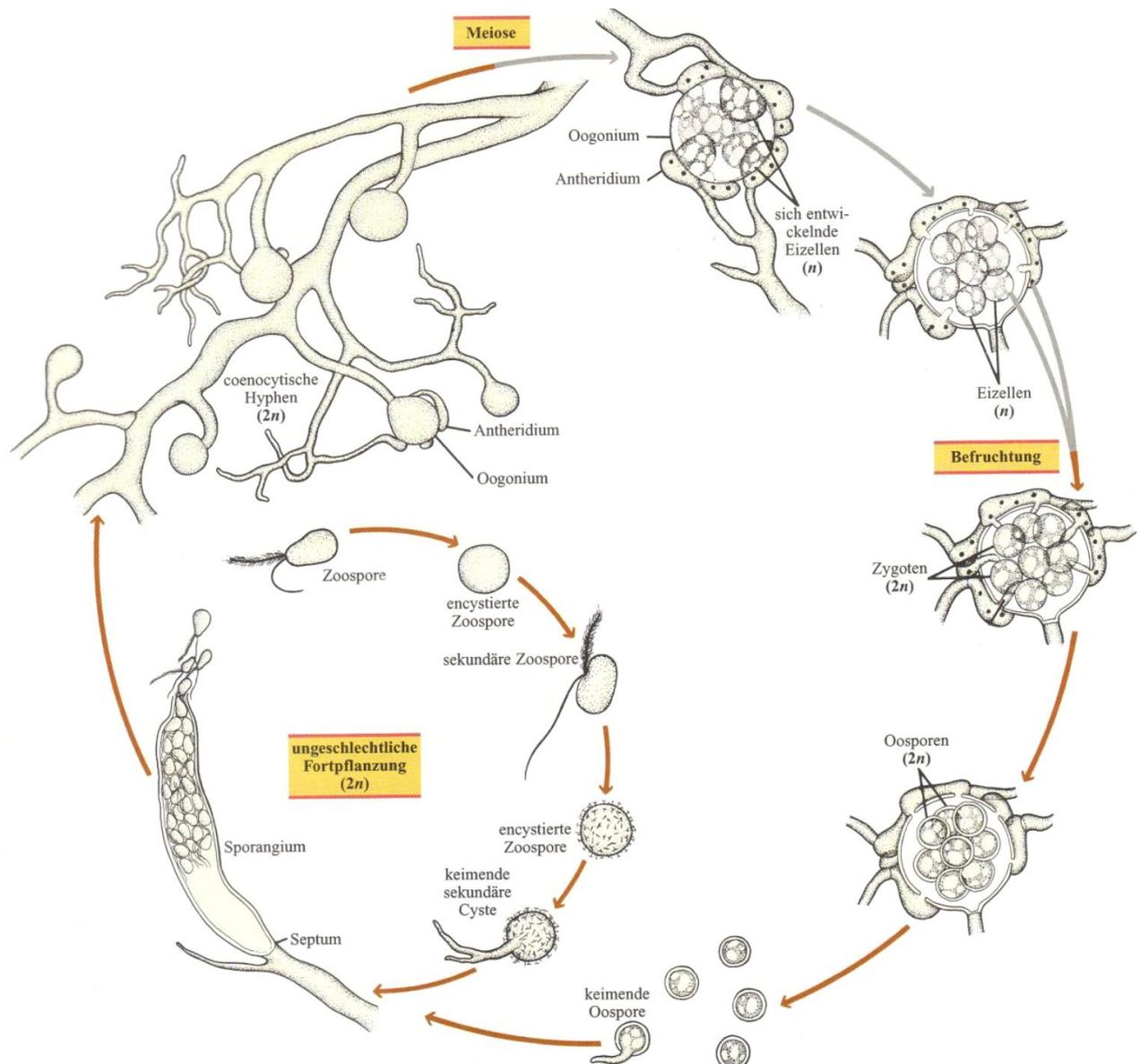
**Abb.11:** Myzel von *Saprolegnia ferax*. Die Abb. zeigt das ausgebildete Myzel von *Saprolegnia ferax* auf einer V8-Gemüsesaft-Petrischale (Foto: Berger 2016).

Ungeachtet der Gattung oder Art werden alle Saprolegniaceae als potentielle Fischpathogene gesehen (Pickering & Willoughby 1982, Willoughby 1994), die für signifikante Pilzinfektionen an Fischen und ihren Ova verantwortlich sind (Mayer 2000).

*Saprolegnia* spp. kommen ubiquitär vor (Pickering & Willoughby 1982). Die Sporen sind im Süß- und Brackwasser, sowie feuchteren Böden zu finden. *Saprolegnia* spp. können große Temperaturschwankungen zwischen 3-33 °C tolerieren (Koeypudsa et al. 2005).

*Saprolegnia* spp. können sich sexuell oder asexuell reproduzieren (**Abb. 12**). Bei der sexuellen Reproduktion (Oogamie) werden im meiotischen Zyklus die Oogonien und Antheridien erzeugt. Innerhalb des Oogoniums findet eine Befruchtung der Eizellen statt, in dem die beiden Gametangien miteinander verschmelzen: Es entstehen die Zygoten (diploide Oosporen). Diploide Oosporen können schlechte Umweltbedingungen gut überdauern, da sie dicke Zellwände besitzen. Ein neues Geflecht aus Hyphen entsteht erst dann, wenn ausreichend Nährstoffe zur Verfügung stehen (Seymour 1970, Pickering & Willoughby 1982, Whisler 1996).

Bei der asexuellen Reproduktion werden bewegliche primäre Zoosporen erzeugt (Willoughby 1994, Bruno & Wood 1999), die nur für eine kurze Zeit aktiv sind und sich während dieser Zeit mit Hilfe der Wasserströmung von der Elternkolonie entfernen (Robertson et al. 2009). In diesem Entwicklungsstadium verbleiben sie allerdings nur sehr kurze Zeit. Die primäre Zoospore enzystiert sich, keimt und entlässt sekundäre Zoosporen (Willoughby 1994). Unter dem Begriff „Polyplanetismus“ wird die Wiederholung des Zyklus (Enzystierung und Freisetzung der Zoosporen) verstanden (Diéguez-Uribeondo et al. 2007). Die sekundären Zoosporen sind für eine längere Zeit beweglich und schwimmfähig (Willoughby 1994). Sie stellen somit die Hauptverbreitungsphase von *Saprolegnia* spp. dar (Pickering & Willoughby 1982, Beakes et al. 1994, Walker & van West 2007). In dieser Zeit sind die Sporen besonders infektiös (Mayer 2000): Sie suchen aktiv nach einem potentiellen Wirt, den sie mit Hilfe von Chemotaxis finden (El-Feki et al. 2003). Dabei werden die Sporen durch ihre natürlichen Substrate (z. B. Fischlaich) angelockt, die Duftstoffe in Form einer Kombination aus Salzen und Aminosäuren freilassen. Bei einem geeigneten Nährstoffgradienten werden die Sporen mit Hilfe von Hakenstrukturen fixiert, und beginnen sich zu enzystieren (Fischer & Werner 1958, Fregeneda-Grandes et al. 2000, Walker & van West 2007). Die haarähnlichen Strukturen auf der Oberfläche der sekundären Zysten von *Saprolegnia* spp. ermöglichen die Penetration in die Epidermis (Håstein & Lindstad 1991).



**Abb. 12:** Lebenszyklus *Saprolegnia* spp. (Raven et al. 2006). In der Abb. wird die asexuelle und sexuelle Reproduktion von *Saprolegnia* spp. dargestellt. Die sekundären Zoosporen stellen die Hauptverbreitungsphase dar und sind besonders infektiös.

### 1.6.1. *Saprolegnia* spp. als Fischpathogen

Die Umwelt, in der ein Fisch natürlicherweise lebt, birgt eine variierende Mikroflora, zu der Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten zählen, die möglicherweise ernstzunehmende Infektionen in freilebenden Populationen und Fischfarmen verursachen (Håstein & Lindstad 1991). Beispiel für eine häufig auftretende Pilzinfektion ist die Saprolegniose, die natürliche Populationen der Salmoniden in Fließgewässern und Seen reduzieren kann (Pickering & Duston 1983, Bruno & Wood 1999). *Saprolegnia* spp. bilden eine ubiquitäre Komponente in

der Umwelt der Salmoniden und sind in der Lage sich unabhängig von der Jahreszeit zu vermehren und zu wachsen (Neish 1977). Saprolegniasis tritt vorwiegend im Winter während der Laichzeit bei Wild- und Zuchtfischen auf. *Saprolegnia parasitica*, *Saprolegnia diclina* und *Saprolegnia ferax*, Nees 1823 (Wasserschimmel), sind Pathogene von Kaltwasserfischen (Koeypudsa et al. 2005) und besonders bei Salmoniden sehr verbreitet (Neish & Hughes 1980). Sobald es zu physikalischen oder chemischen Veränderungen der Umwelt kommt, besteht die Gefahr, dass die Häufigkeit und Virulenz pathogener Organismen zunimmt (Pickering & Duston 1983). Bei einem geschwächten Immunsystem der Fische ist davon auszugehen, dass eine Infektion mit *Saprolegnia* spp. mit erhöhter Wahrscheinlichkeit ausgelöst wird (Pickering 1989, Bruno & Wood 1999).

Die Wechselbeziehungen zwischen einem Pathogen, seinem Wirt und den Umweltbedingungen sind sehr komplex. Es ist davon auszugehen, dass offensichtliche Erkrankungen nur dann auftreten, wenn ein anfälliger Wirt einem virulenten Pathogen unter verschlechterten Umweltbedingungen ausgesetzt ist. Daher müssen diese drei Komponenten immer berücksichtigt werden, wenn Möglichkeiten gefunden werden sollen, den Ausbruch einer Krankheit zu kontrollieren (Pickering & Willoughby 1982).

Das Vorkommen von *Saprolegnia* spp. ist abhängig von der präferierten Temperatur des Lebensraums des Wirtes (Pickering & Willoughby 1982). Plötzliche Temperaturschwankungen, gekoppelt mit physiologischem Stress, machen den Fisch anfällig. Die Temperatur kann somit einen deutlichen Einfluss auf den Beginn und die daraus resultierende Entwicklung von Verletzungen haben (Willoughby 1994). *Saprolegnia* spp. kann entweder als primäres oder sekundäres Pathogen auf verletztem oder krankhaftem Gewebe vorkommen (Pickering 1994):

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass *Saprolegnia* spp. als primäres Pathogen agieren kann (Tiffney 1939, Neish 1977, Richards & Pickering 1978) und dabei prädisponierender Faktor für Fischkrankheiten ist. Der Wirt lebt mit *Saprolegnia* spp. im Gleichgewicht, das von Umwelteinflüssen reguliert wird. Bei einer Störung kann der daraus resultierende Stress die physiologischen Fähigkeiten reduzieren, die eine geringere Resistenz und somit den Ausbruch von Krankheiten verursachen (Wilson 1976).

Eine Infektion wird als sekundär bezeichnet, wenn sie mit voran gegangenen Primärinfektionen assoziiert ist, die durch Pathogene oder Parasiten ausgelöst wurden (Richards & Pickering 1978, Pickering & Christie 1980, Van den Berg et al. 2013). Der Pilz

ist nur dann überlebensfähig, wenn das Fischgewebe bereits durch primäre Infektionen oder mechanische Einwirkungen beschädigt ist (Wilson 1976, Hatai & Hoshiai 1994). Zu den prädisponierenden Faktoren zählen Fische mit schlechter Konstitution oder kutanen Verletzungen (z. B. großflächiger Verlust von Schuppen und Mukus) oder das Eintreten der Geschlechtsreife (Neish & Hughes 1980, Pickering & Willoughby 1982, Hansen & Jonsson 1988, Pickering 1989, Noga 1993). Sobald ihre Körperoberfläche in Folge von Verletzungen angegriffen ist, werden Fische mit *Saprolegnia* spp. infiziert, da sie gegenüber Pilzen und ihren Sporen anfälliger sind (Willoughby 1994). In diesen Fällen beginnt *Saprolegnia* spp. Kolonien zu bilden (Oláh & Farkas 1978).

Doch auch eine unzureichende Wasserqualität in Form von mangelnder O<sub>2</sub>-Versorgung oder suboptimaler Wassertemperatur, hohe Besatzdichten, falsche Futtermittelgabe und unsachgemäße Hälterung sowie bakterielle und/ oder parasitäre Infektionen zählen zu den Stressfaktoren bei Fischen, die den Ausbruch von *Saprolegnia* spp. begünstigen können (Neish & Hughes 1980, Pickering 1989, Noga 1993, Hamers & Schreckenbach 2002). Sobald eine Infektion ausgebrochen ist, kann sich der Fisch meist nicht rekonvaleszieren (Pickering & Willoughby 1982).

Bei einer ungeschützten Epidermis bilden Pilzsporen Hyphen, die sich bis ins Muskelgewebe ausbreiten können (Durborow et al. 2003). Die Sporen, die einen verletzten Fisch befallen, entwickeln sich und wachsen in Kolonien (Oláh & Farkas 1978). *Saprolegnia* spp. penetriert nur selten das tiefere Körpergewebe und ist meist auf Epidermis, Dermis sowie gelegentlich die subkutane Muskulatur limitiert (Pickering & Willoughby 1982). Er verursacht zelluläre Nekrose (Torto-Alalibo et al. 2005) durch eine rapide Zerstörung der Epidermis, bei der zuvor die schützende Mukusschicht zerstört wird (Neish & Hughes 1980). In Folge der Veränderungen der Osmoregulation können Ödeme entstehen (Richards & Pickering 1979, Noga 1993), die die primäre Folge einer Saprolegniose durch ein osmotisches Ungleichgewicht innerhalb des Gewebes sind. Sie ist durch Verluste der Epithelschichten und Gewebszerstörung bedingt und wird durch die Penetration der Hyphen ausgelöst (Noga 1993, Copland & Willoughby 1982). Die Beschädigung der Epidermis und des darunter liegenden Gewebes führen zu lethargischem Verhalten, das die Infektion begünstigt (Van den Berg et al. 2013).

Das Versagen des Respirationssystems ist das Ergebnis großflächiger Infektionen der Kiemen. In einigen Fällen kann es auch zu Organversagen kommen - meist sind Darm, Leber und Nieren befallen (Pickering & Willoughby 1982, Fregeneda-Grandes et al. 2001, Van den

Berg et al. 2013). Bei größeren Fischen sind die Verletzungen auf das Integument und die Oberflächenmuskulatur restringiert. Die Schädigungen des Gewebes lassen sich auf lytische Enzyme zurückführen, die der Pilz ins umliegende Gewebe sezerniert (Pickering 1994).

Bei Salmoniden gibt es keine Lebensphase, in der sie nicht anfällig für eine Infektion mit *Saprolegnia* spp. sind (Pickering 1994). Infektionen können sowohl bei den Ova als auch den adulten Fischen auftreten. Auf der Oberfläche der Ova ist ein übermäßiges Wachstum des Myzels bereits mit bloßem Auge erkennbar, das zu schnellem Absterben führt (Willoughby 1994). Allerdings konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass der Grad der Anfälligkeit unter bestimmten Umständen zunehmen kann (Pickering 1994). Bei Milchneern kann während der Laichzeit eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber vielen Parasiten nachgewiesen werden, die sich durch eine Veränderung der Mukusstruktur erklären lässt. Zusätzlich ist bei ihnen ein deutlicher Verlust der Mukuszellen gegen Ende der Laichperiode zu erkennen (Pickering & Macey 1977). Bei einem Vergleich der Geschlechter fällt auf, dass sexuell reife Milchneer wesentlich öfter und schwerer von *Saprolegnia* spp. befallen sind als unreife Tiere beider Geschlechter oder reife Rogner (Pickering & Christie 1980). Dies betrifft sowohl im Fließgewässer lebende Populationen als auch in der Aquazucht lebende Tiere (Pickering 1994). Infektionen mit *Saprolegnia* spp. haben besonders auf Wildfische eine deletäre Wirkung (Håstein & Lindstad 1991). Gesunde Fische, die weder verletzt noch von Parasiten befallen sind, haben ein wesentlich geringeres Risiko an einer Infektion mit *Saprolegnia* spp. zu erkranken, denn eine undurchdringbare Epidermis und das adaptive Immunsystem stärken die Immunität eines gesunden Fisches (Van den Berg et al. 2013).

### **1.6.2. Ansätze zur Etablierung einer alternativen Behandlungsmethode**

Antimykotika, Pestizide, Desinfektionsmittel und andere Chemikalien werden oft in der Aquazucht zur Behandlung von Krankheiten eingesetzt (Rico et al. 2013). Sie sollen entweder das Wachstum einer Population von pathogenen Organismen verlangsamen oder diese abtöten (Weston 2000). Allerdings können sie negative Effekte auf die aquatische Umwelt haben (Rico & Van den Brink 2014).

Traditionell wurden Infektionen mit *Saprolegnia* spp. bei Salmoniden mit dem Desinfektionsmittel Malachitgrün behandelt, da es als effektivste Methode zur Bekämpfung galt (Willoughby & Roberts 1994, Bruno & Wood 1999). Malachitgrün ist ein basischer Triphenylmethanfarbstoff der in Wasser gut löslich ist und sich im Gewebe von Tieren

akkumuliert. Dadurch bestand für Menschen beim Verzehr von behandelten Speisefischen eine akute Gesundheitsgefahr. Malachitgrün wurde auf Grund seiner karzinogenen, teratogenen und mutagenen Wirkung 2002 weltweit verboten (van West 2006, Sudova et al. 2007). Aus dem Verbot von Malachitgrün und dem Mangel an einem adäquaten Ersatz resultierte eine dramatische Rekrudescenz von *Saprolegnia*-Infektionen in der Aquazucht (van West 2006). Die akute Toxizität von Malachitgrün hat zu einem gesteigerten Interesse bei der Suche nach Ersatzstoffen geführt. Allerdings konnte bis heute kein adäquates Substitut gefunden werden (Sudova et al. 2007).

Seit dem Verbot von Malachitgrün wird Formalin (Formaldehyd-Lösung 36 % ad us. vet.) eingesetzt, das z. Z. das einzige zugelassene Fungizid für Süß- und Salzwasserfische ist (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2013). Bei einer Infektion mit *Saprolegnia* spp. kann es bei Adulten und Ova erfolgreich angewandt werden (Marking et al. 1994, Gieseke et al. 2006, Lamour & Kamoun 2009). Auch wenn Desinfektionsmittel ein geringes Potenzial zur Bioakkumulation in der Umwelt und bei aquatischen Organismen haben, besteht immer noch ein gesundheitsschädliches Risiko durch den direkten Kontakt mit dem Produkt. Auf Grund dieses Risikos wurde Formaldehyd von der World Health Organization (WHO) als „karzinogen bei Menschen“ eingestuft (WHO 2006), so dass Unsicherheit darüber besteht, ob es als Desinfektionsmittel weiterhin in der Aquakultur eingesetzt werden darf (Fitzpatrick et al. 1995, Picón-Camacho et al. 2012, Gozlan et al. 2014).

Eine hohe Besatzdichte in der Aquazucht kann oft zu Erkrankungen bei Fischen führen (Snieszko 1974), da sie unter naturfernen Bedingungen gehalten werden, die den Gesundheitszustand nachhaltig beeinflussen. Besonders die anspruchsvollen Salmoniden sind davon betroffen (Willoughby 1977, 1978).

Zur routinemäßigen Prophylaxe werden oft antimykotische Mittel während der Inkubationszeit der Ova im Bruthaus eingesetzt (Fregeneda-Grandes et al. 2007). Der kontinuierliche Gebrauch von antimikrobiellen Wirkstoffen in der Aquakultur findet prophylaktisch statt und hat dazu geführt, dass vermehrt resistente Bakterien nachgewiesen werden konnten (Cabello 2006, Sharma et al. 2012, Baskaralingam & Rajagopalan 2014). Veterinärmedizinische Medikamente werden zunehmend restringiert, seitdem zahlreiche Nebeneffekte bekannt geworden sind (Reverter et al. 2014). Es bedarf weiterer Forschung, um eine adäquate Alternative zu finden, die unbedenklich, präventiv und nachhaltig ist (Picón-Camacho et al. 2012, Reverter et al. 2014). Zielführend wäre es, den Einsatz von Antibiotika

durch alternative Methoden zu ersetzen, mit denen die Fische behandelt werden können (Vieira dos Fernandes et al. 2001, Sharma et al. 2012). Eine mögliche Alternative zu traditionell eingesetzten Chemikalien bei der Behandlung von Fischkrankheiten stellen pharmakologisch wirksame Pflanzen bzw. ihre Bestandteile dar, die antibakterielle Eigenschaften besitzen. Phytotherapie wird schon seit vielen Jahrhunderten bei Menschen angewandt. Daher wird überprüft, ob sie ebenfalls erfolgreich bei der Behandlung von Fischkrankheiten eingesetzt werden können, die z. B. durch Pilze verursacht werden (Valladão et al. 2014). Diese Alternative findet immer größeren Zuspruch beim Management von Fischerkrankungen, da sie nicht nur kosteneffektiv und umweltfreundlich ist, sondern kaum Nebenwirkungen hat (Sharma et al. 2012). Samad et al. (2014) und Baskaralingam & Rajagopalan (2014) konnten zeigen, dass viele Pflanzenextrakte eine Schlüsselrolle bei der Immunität von Fischen spielen und zur Abwehr von mikrobiellen Erkrankungen eingesetzt werden können.

Verschiedene Studien haben nachgewiesen, dass Pflanzenextrakte sowohl bei *in vitro*- als auch bei *in vivo*-Experimenten Eigenschaften besitzen, die bei der Behandlung von bakteriellen, mykotischen oder parasitären Erkrankungen eingesetzt werden (Silva & Fernandes-Junior 2010): prophylaktisch, kurativ oder palliativ (Brazil 2011, Sharma et al. 2012, Reverter et al. 2014). Die nützlichen Eigenschaften und die Effizienz der pflanzlichen Produkte gegenüber der Gesundheit von kultivierten Fischen hängen von der Pflanze, dem Extraktionsverfahren und der gemessenen Konzentration ab (Reverter et al. 2014).

Xue-Gang et al. (2013) testeten 40 Pflanzen der traditionellen chinesischen Medizin und konnten feststellen, dass insgesamt 10 dieser Pflanzen (z. B. *Cnidium monnier*, (L.) Cusson 1782 (Brenndolde)) bei einem Befall mit *Saprolegnia* spp. eine starke Inhibition zeigen. Allerdings gibt es nur wenige Studien, die die Langzeit-Effekte auf die Fische untersucht haben.

Caruana et al. (2012) untersuchten u. a. die Wirkung von *Chrysanthemum* spp., Linnaeus (Chrysatheme) und *Yucca* spp., Linnaeus (Palmlilie), bei Infektionen mit *Saprolegnia australis*, deren Extrakte das Wachstum von *S. australis* hemmen konnten.

Ein weiteres Beispiel für einen phytotherapeutischen Ansatz stellen die Untersuchungen von Cao et al. (2011) dar, die *Pseudolarix kaempferi*, (Nelson) Rehder (Goldlärche), bei einer Infektion mit *Saprolegnia* spp. bei Siluriformes (Welsartige) getestet haben. In ihren Untersuchungen konnte *P. kaempferi* das Wachstum des Myzels vollständig inhibieren, so

dass diese Pflanze ein vielversprechendes Mittel bei der Behandlung von *Saprolegnia* spp. sein könnte.

#### **1.6.2.1. *Carica papaya***

*Carica papaya*, Linnaeus 1753 (Papaya), zählt zur Familie der Caricaceae und ist eine baumähnliche, krautartige Pflanze (Canini et al. 2007). Es handelt sich um eine monosexuelle Pflanze mit zentralamerikanischem Ursprung, die weltweit zu therapeutischen Zwecken eingesetzt wird. Neben den essbaren Früchten haben besonders die Wurzeln und Blätter einen medizinischen Wert (Doughari et al. 2007, Krishna et al. 2008). Biologisch aktive Komponenten sind z. B. Tannine, Alkaloide und Papain (Ekanem et al. 2004, Citarasu 2010, Adejuwon et al. 2011). Die bioaktiven Substanzen von *C. papaya* können bei Resistenzen gegenüber Bakterien, Pilzen und Schädlingen wirken (Srinivasan et al. 2001, Aravind et al. 2013). Besonders die Wirkstoffe der Wurzeln inhibieren das Wachstum von Pilzen (Giordani & Siepai 1991).

#### **1.6.2.2. *Mucuna pruriens***

*Mucuna pruriens*, (Linnaeus) de Candolle 1825 (Juckbohne), gehört zur Familie der Fabaceae und wird vorwiegend in Indien kultiviert. Die Gattung *Mucuna* enthält bioaktive Substanzen wie z. B. freie Phenole und Tannine (Arulmozhi & Janardhanan 1992). In früheren Studien wurden antimykotische Aktivitäten bei den Extrakten von unreifen Pflanzenteilen nachgewiesen (Misra & Sahu 1977), allerdings konnten die chemischen Zusammensetzungen der aktiven Komponenten bislang nicht bestimmt werden (Nidiry & Lokesha 2011). Für die Anwendung in der traditionellen Medizin werden die Samen, Blätter und Wurzeln verwendet (Sathiyarayanan & Arulmozhi 2007).

### **1.7. Ziele der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, einen Einblick in die Verteilung der unterschiedlichen Fischarten im Rahmen der durchgeführten Monitorings zu bekommen. Dadurch sollte festgestellt werden, ob sich der Bestand der ursprünglich heimischen Salmoniden wieder in der Wupper ansiedelt oder Cypriniden das Gewässer dominieren.

Um dies zu prüfen wurden die erhobenen physikochemischen Parameter O<sub>2</sub>-Gehalt, Temperatur und pH-Wert der Jahre 2009 bis 2015 ausgewertet und miteinander verglichen. Ziel dieser Analyse war es, zu untersuchen, ob und an welchen KM sich die Temperatur im Jahresvergleich verändert hat.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich Mukusproben der Salmoniden an Stelle des traditionellen fin-clipping für molekularbiologische Analysen eignen. Dabei wurde der Fragestellung nachgegangen, ob mit Hilfe von Mukusproben das Fischpathogen *Saprolegnia* spp. nachgewiesen werden kann. Ziel der Analysen war es, zu untersuchen, an welchen Probestellen ein Befall mit *Saprolegnia* spp. vorlag und ob es Auffälligkeiten bei den unterschiedlichen Salmonidenarten gab. Parallel dazu wurde erforscht, ob die vorherrschenden Temperaturbedingungen an den einzelnen Probestellen einen Einfluss auf die Verbreitung von *Saprolegnia* spp. haben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mögliche Ansätze entwickelt werden, die den Eintrag von Fischpathogenen in ein Fließgewässer vermeiden. Ziel war es, an Hand von *in vitro*-Versuchen Alternativen zur traditionellen Behandlung des Fischpathogens *Saprolegnia* spp. zu finden. Dabei wurde untersucht, ob phytotherapeutische Extrakte als alternative Behandlungsmöglichkeit eingesetzt werden können, da sie für den Fisch, den Anwender, den Verbraucher aber auch weitere aquatische Organismen verträglich sind. Darüber hinaus sollte die Frage der Anwendbarkeit der phytotherapeutischen Mittel bezüglich Praktikabilität und Wirtschaftlichkeit geprüft werden.

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand waren die Schuppenproben der Salmoniden. Ziel dieser Analysen war die Berechnung des Alters und der Längenzuwächse in den einzelnen Jahren. Hierbei erfolgte ein Vergleich der unterschiedlichen Probestellen. Im Fokus standen die Auffälligkeiten bzgl. der Altersverteilung und des Längenzuwachses in den einzelnen Jahren.

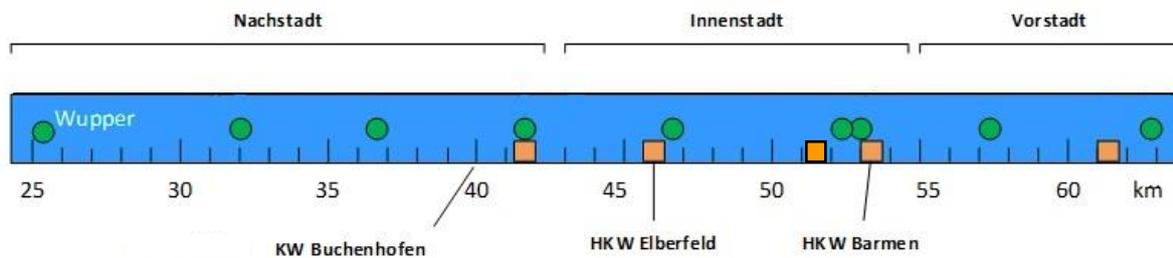
## 2. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die für die molekularbiologischen und morphologischen Untersuchungen notwendigen unterschiedlichen Materialien und Methoden dargestellt.

### 2.1. Messung der physikochemischen Parameter Sauerstoff, Temperatur und pH-Wert

Regelmäßig wurden im Jahresverlauf an unterschiedlichen KM entlang der Wupper die physikochemischen Parameter (Temperatur, O<sub>2</sub>-Gehalt, pH-Wert) direkt vor Ort vom Wupperverband gemessen. Die ermittelten Daten wurden anschließend mit den Entnahmestellen der Mukus- und Schuppenproben verglichen und ausgewertet.

**Abb. 13** zeigt die Messstellen der physikochemischen Parameter, sowie die wichtigsten Entnahmestellen der Jahre 2012, 2013 und 2015 für die Schuppen- und Mukusproben.



Legende

- Messstellen physikochemische Parameter
- Entnahmestelle für Schuppen- und Mukusproben

**KW:** Klärwerk

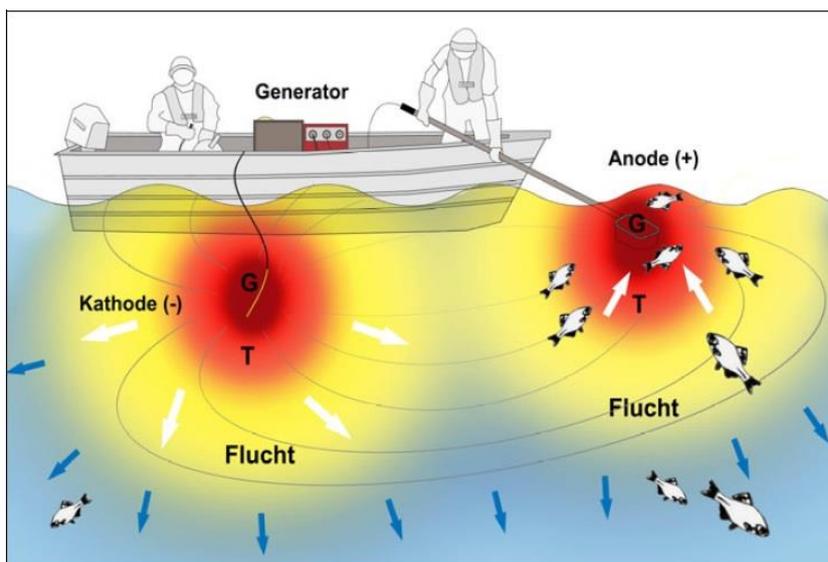
**HKW:** Heizkraftwerk

**Abb. 13:** Probestellen für die unterschiedlichen Parameter (verändert nach Damrow 2014). Die Abb. zeigt die Messstellen für die physikochemischen Parameter sowie die Entnahmestellen für die Schuppen- und Mukusproben im Wupperverlauf, die in allen Jahren beprobt wurden. Im Anschluss an den Nachstadtbereich (KM 25) fließt die Wupper in den Rhein. Vor dem Vorstadtbereich (KM 65) befindet sich die Beyenburger Talsperre.

Im Jahr 2014 lagen zwar die Auswertungen der physikochemischen Parameter vor, die Probenentnahme von Mukus- und Schuppenproben konnte nicht erfolgen, da es seitens des Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) zu Bearbeitungsverzögerungen bzgl. des gestellten Tierversuchsantrages kam.

## 2.2. Elektrofischung

Bei der Elektrofischerei handelt es sich um eine aktive, fischschonende Fangmethode, die eine quantitative und qualitative Erfassung des Fischbestands ermöglicht (Gerster 2006). Sie wird bei Hege- und Schutzmaßnahmen des Fischbestandes und bei wissenschaftlichen Untersuchungen eingesetzt (Amt für Umweltschutz 1975). Die Mortalitäten sind sehr gering, da die Fische kaum Stress ausgesetzt sind. In der Regel treten keine nachhaltigen Schädigungen auf (Rümmler et al. 2004). Bei einer Befischung sollte grundsätzlich darauf geachtet werden, dass die Population groß genug ist und Vertreter verschiedener Größenklassen und Altersgruppen repräsentiert werden (Bagenal 1978). Vor einer Elektrofischung müssen Breite, Tiefe und Fließgeschwindigkeit des Gewässers ermittelt werden. Zusätzlich spielen die Beschaffenheit des Ufers und Grundes, sowie die Leitfähigkeit des Wassers und die Temperatur eine wichtige Rolle, die vor der Durchführung gemessen werden, um die richtige Stromstärke zu ermitteln (Veröffentlichungen des Eidgenössischen Amtes für Umweltschutz und der Fischereiinspektion 1975). **Abb. 14** zeigt eine Elektrofischung in einem tieferen Gewässer vom Boot aus. Diese Art der Elektrofischung wurde, wenn nicht watend möglich, in der Wupper praktiziert.



**Abb. 14:** Prinzip der Wirkung elektrischer Felder. Dargestellt wird das Verhalten der Fische im Bereich der Kathode - (G=Galvanonarkose) sowie der Anode + (T=Taxis), verändert nach (Adam et al. 2013).

Sobald sich die Fische zwischen den mit Gleich- oder Impulsstrom gespeisten Elektroden befinden, positionieren sie sich parallel zu den Feldlinien des elektrischen Feldes. Der Kopf ist dabei auf die Anode gerichtet. Bedingt durch die bessere Leitfähigkeit der Fische zum

Wasser, drängen sich die Feldlinien in ihren Körper, so dass er elektrisch durchströmt wird. Der Fisch greift mit seiner Körperlänge eine Teilstrecke des Spannungsgefälles zwischen Kathode und Anode ab. Sobald der Schwellenwert, die reizauslösende Gestaltspannung überschritten wird, reagiert der Fisch mit aktiven Schwimmbewegungen und strebt der Anode zu. Je weiter er sich dieser nähert, desto mehr wird er durchströmt. Bei der Anode kann der Fisch in einen Starrezustand verfallen, der als Galvanonarkose bezeichnet wird. Durch die richtige Wahl einer angepassten Ausgangsspannung sowie das rechtzeitige Keschern der Fische sollte dieser Zustand vermieden werden (Gerster 2006). Durch den elektrischen Strom wird der Stoffwechsel des Fisches intensiviert: Der O<sub>2</sub>-Verbrauch wird erhöht und die Atembewegung beschleunigt. Diese Auswirkungen sind reversibel und nur vorübergehend (Veröffentlichungen des Eidgenössischen Amtes für Umweltschutz und der Fischereiinspektion 1975). Die Fische wurden nach dem Herauskeschern in einem großen Plastikbecken gehalten. Eine O<sub>2</sub>-Pumpe gewährleistete eine kontinuierliche O<sub>2</sub>-Zufuhr. Die Probenentnahme von Schuppen und Mukus sowie die Vermessung der Fischlänge wurden schnellstmöglich durchgeführt, um die Fische so wenig Stress wie möglich auszusetzen.

### **2.3. Sedierung der Salmoniden**

Für die Sedierung der Salmoniden wurde Nelkenöl verwendet. Es wird aus dem Stamm, den Blättern und den Knospen von *Syzygium aromaticum*, (L.) Merr & Perry (Gewürznelke), gewonnen (Isaacs 1983). Nach Hernani & Tangendjaja (1988) besteht Nelkenöl zu ca. 70-90 % aus Eugenol, ca. 17 % Eugenolacetat und ca. 12 % Caryophyllin. Gerade die anästhetische Wirkung des Eugenols und seine Wirkung auf Fische haben in den letzten Jahren zunehmend an Interesse gewonnen (Keene et al. 1998).

Nach Marking et al. (1985) kann Eugenol aus folgenden Gründen als ideales Anästhetikum für Fische gesehen werden:

- es hat eine kurze Einleitungs- und Erholungsphase ( $\leq 5$  min.)
- es ist atoxisch und hat eine einfache Handhabung
- es hat keine persistierende Wirkung auf die Physiologie und das Verhalten der Fische
- Nelkenöl wird schnell ausgeschieden oder metabolisiert, so dass es keine Rückstände bildet

- es erzeugt keine kumulativen Effekte oder wiederholte gesundheitliche Belastungen
- Nelkenöl ist preisgünstig.

Bei den in der Wupper durchgeführten Probeentnahmen wurde die Dosierung den Fischarten und der Größenklasse angepasst.

### 2.3.1. Entnahme und Lagerung von Mukusproben

Die Mukusentnahme bei den Salmoniden erfolgte mit einem sterilen, aufgerauten Wangenabstrichtupfer zwischen der pektoralen und kaudalen Flosse, entweder unterhalb oder oberhalb des Seitenlinienorgans (**Abb. 15**). Der Wangenabstrichtupfer wurde mehrmals vorsichtig für ca. 1 min. in beide Richtungen bewegt, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen. Hierbei wurde sich an den Herstellerangaben sowie dem Verfahren von Eddy & Fraser (1982) orientiert. Die Stelle, an der Mukusproben entnommen wurden, eignet sich für die spätere Entnahme von Schuppenproben. Dies hatte den Vorteil, dass beide Verfahren miteinander kombiniert werden konnten und der Fisch nicht zusätzlich gestresst und geschädigt wurde. Locker aufliegende Schuppen wurden nicht mit dem Mukus aufgenommen, sondern für die spätere Schuppenentnahme in ein separates Eppendorfgefäß überführt. Die Mukusprobe wurde in einem sterilen Eppendorfgefäß für den Transport auf Eis gelagert, um DNaseaktivitäten zu unterbinden. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.



**Abb. 15:** Probenentnahme bei *S. trutta*. Das Foto zeigt die Mukusentnahme bei einer mit Nelkenöl betäubten *trutta*. Dafür wurde ein Wangenabstrichtupfer zwischen der pektoralen und kaudalen Flosse vorsichtig hin- und her bewegt (Foto: Scherdin 2013).

### 2.3.2. Entnahme und Lagerung von Schuppenproben

Das Entnahmeprotokoll von Klein et al. (2012) diente bei der Schuppenprobenentnahme von *T. thymallus* als Orientierung: Mit einer Pinzette wurden ca. 3-6 Schuppen vorsichtig in Wuchsrichtung unterhalb des Seitenlinienorgans zwischen der ventralen und kaudalen Flosse entnommen. Im Vergleich dazu erfolgte die Probenentnahme bei *S. trutta* nach der Anleitung von Shearer (1992) - zwar an der gleichen Stelle, jedoch wurden auf Grund der geringeren Schuppengröße ca. 15-20 Schuppen entnommen (**Abb. 16**). Die geringe Anzahl der entnommenen Schuppenproben lässt sich dadurch erklären, dass bei der Probenentnahme die Epidermis beschädigt werden kann und die Fische für Infektionen anfälliger sein können (Adam et al. 2013).



**Abb. 16:** Schuppenprobenentnahme bei *S. trutta*. Bei der Schuppenprobenentnahme wird ein scharfes Messer im stumpfen Winkel angesetzt und entgegen der Schuppenwuchsrichtung bewegt. Dabei werden die Schuppen vorsichtig gelöst und mit einer sterilen Pinzette in ein autoklaviertes Eppendorfgefäß überführt, das mit 70 % EtOH gefüllt ist (Foto: Berger 2012)

Allgemein eignet sich die Stelle unterhalb des Seitenlinienorgans gut für die Probenentnahme, da sich hier die meisten Primärschuppen („Ursprungsschuppen“) befinden: Je weiter eine Schuppe vom Seitenlinienorgan entfernt ist, desto später wurde sie ausgebildet (Shearer 1992). Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass es sich an dieser Stelle um Sekundärschuppen (Regenerate) handelt: Natürliche Schuppenverluste werden kompensiert. Die Sekundärschuppen sind vorwiegend am Schwanzende, an den Seiten und im vorderen Körperviertel zu finden. An diesen Stellen wird der Fisch am leichtesten und häufigsten beschädigt (Wunder 1943). Für die Entnahme wurde ein Messer im spitzen Winkel angesetzt

und vorsichtig, bei der kaudalen Flosse beginnend, bis zur ventralen Flosse, bewegt. Die Schuppenproben wurden in mit 70 % igem vergälltem Ethanol gefüllten 1,5 mL Eppendorfgefäßen aufbewahrt und konserviert. Diese Lagerungsmethode gewährleistet, dass die Proben bis zur Präparation nicht an Größe verlieren. Dadurch werden Messfehler vermieden. Nach jeder Probenentnahme wurden die verwendeten Werkzeuge gereinigt, um eine DNA-Verschleppung zu vermeiden. Zusätzlich wurde die Länge des Fisches notiert, die für die Längenrückrechnung der vorherigen Jahre erforderlich ist. Bei den durchgeführten Befischungen wurden ausschließlich Tiere beprobt, die  $\geq 20$  cm waren, da Schuppen ab dieser Fischgröße gut lesbar und auswertbar sind. Die meisten gefangenen Fische ließen sich in eine Größenklasse von ca. 20-50 cm einordnen.

## **2.4. Molekularbiologische Untersuchungen**

Für die molekularbiologischen Analysen erfolgte zunächst die Kultivierung einer *Saprolegnia ferax*-Kultur. Die DNA aus dieser Stammkultur wurde extrahiert und als Positivkontrolle verwendet. Zusätzlich wurde DNA aus Mukusproben von *S. trutta* und *T. thymallus* isoliert. Die Mukusproben bildeten die Grundlage für ein Screening auf mit *Saprolegnia* spp. infizierte Salmoniden in der Wupper. Nach der DNA-Isolierung der Mukusproben wurde das Template zusammen mit spezifischen *Saprolegnia*-Primern in die PCR eingesetzt und amplifiziert. Für weitere Analysen wurden gelelektrophoretische Auftrennungen durchgeführt, bei der die PCR-Produkte im Vergleich zu einer Positivkontrolle und einem Marker als Größenstandard auf ein Agarosegel aufgetragen wurden, um zu überprüfen, ob *Saprolegnia* spp. bei den Salmoniden der Wupper nachweisbar war. Anschließend wurden exemplarisch einige PCR-Produkte aufgereinigt und sequenziert (Eurofins MWG), um abzusichern, dass es sich um das erwartete Genprodukt handelt.

### **2.4.1. Kultivierung von *Saprolegnia ferax***

Über das Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, wurde eine *Saprolegnia ferax*-Kultur bezogen.

Herstellung der Medien

Zur Kultivierung wurden zwei unterschiedliche Medien benötigt.

Für die Ausbildung des Myzels wurde der V8-Gemüsesaft-Agar gewählt:

**Tab. 1:** V8-Gemüsesaft-Agar 1 L Ansatz

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
V8-Gemüsesaft	200 mL
CaCO <sub>3</sub>	3 g
Agar	15 g
Aqua dest.	auffüllen
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>1 L</b>

Der Agar wurde autoklaviert und anschließend in Petrischalen gegossen. Nach dem Aushärten des Agars wurde von der Original-Kultur mit einem scharfen Skalpell ein Stück herausgeschnitten und mit dem Myzel nach unten auf das frische V8-Gemüsesaft-Agar gesetzt.

Für die Ausbildung des Fruchtkörpers, der für die spätere DNA-Extraktion erforderlich war, wurde das PDB-Medium angesetzt (**Tab. 2**), aliquotiert (50 mL im Erlenmeyerkolben) und autoklaviert. Mit einer sterilen Impföse wurde dem abgefüllten PDB-Medium Myzel des V8-Gemüsesaft-Agar angeimpft und leicht geschwenkt.

**Tab. 2:** PDB-Agar 1 L Ansatz

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Kartoffel-Extrakt	6,5 g/ L
Glucose	20 g/ L
pH-Wert	5,6±0,2
Aqua dest.	auffüllen
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>1 L</b>

### Ermittlung der optimalen Wachstumsbedingungen

Um die optimale Wachstumstemperatur für die Kultivierung von *S. ferax* zu finden, wurden in Anlehnung an die vorhandenen Vorgaben folgende Temperaturen getestet: 20, 25, 30 °C und RT. Ein optimales Wachstum beider Kulturen konnte bei 20 °C beobachtet werden. Jeweils nach drei Wochen wurden die Kulturen neu überimpft.

### **2.4.2. Isolierung der DNA**

Für die Isolierung der DNA von *S. ferax* wurden traditionelle Verfahren sowie unterschiedliche Kits jeweils in teilweise modifizierter Form getestet und miteinander verglichen.

#### 1) CHELEX-Extraktion

Die Extraktion mit Chelex erfolgte in Anlehnung an das Protokoll DNA Isolation Procedures (Protocol 7: Plucked feathers using CHELEX®, Nishiguchi et al. 2002):

- Pilz abwiegen, ca. 0,12 g einsetzen
- Ansatz teilen
  - Pilz+ N<sub>2</sub> + mörsern
  - Pilz + mörsern
- zu jedem Ansatz 250 µL Chelex (5 %) hinzu pipettieren
- 15 min. bei 100 °C inkubieren, währenddessen 3x vortexen (1 min.)
- auf RT abkühlen
- Ansatz zentrifugieren: 30 s max. speed
- Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen und bei -20°C lagern

## 2) DNA-Isolierung mit CTAB

- 50-200 mg Pilzmaterial in einem Eppendorfgefäß homogenisieren (oder in N<sub>2</sub> mörsern)
- + 500 µL CTAB (20 g/ L CTAB; 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris/ HCl pH 8), 60 min. bei 65 °C schütteln und invertieren
- + 500 µL Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1), vorsichtig invertieren
- 3 min. bei max. speed zentrifugieren
- obere Phase abnehmen, in neues Eppendorfgefäß überführen
- + 500 µL Chloroform: Isoamylalkohol (24:1)
- 3 min. bei max. speed zentrifugieren
- obere Phase abnehmen + 1 Vol. Isopropanol
- 15 min. bei max. speed zentrifugieren
- Flüssigkeit abschütten
- + 500 µL 70 % EtOH (-20 °C )
- 5 min. bei max. speed zentrifugieren
- Flüssigkeit abschütten, restl. Flüssigkeit mit Pipettenspitze entfernen
- Pellet bei 65 °C 5 min. trocknen lassen
- in 100 µL 10 mM Tris pH 8 lösen (5 min. bei 65 °C inkubieren, dabei vorsichtig mischen)

## 3) DNeasy Plant Mini Kit

Es wurde vergleichend mit dem Maxi- als auch mit dem Mini-Protokoll laut Herstellerangaben gearbeitet.

4) Fungal DNA Mini Kit, peqGOLD

Das Protokoll B wurde laut Herstellerangaben verwendet.

5) E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini Kit

und

6) E.Z.N.A.® HP Fungal DNA Kit

Bei beiden Kits wurden folgende Änderungen vorgenommen: Die Lysezeit wurde in Abhängigkeit des eingesetzten Probematerials variiert (30-45 min.).

7) E.Z.N.A.® SP Fungal DNA Mini Kit

Das Protokoll wurde folgendermaßen modifiziert:

Zum tiefgefrorenen, abgewogenen Pellet wurden Lysepuffer (LP) und RNase (100 mg/ mL) hinzugegeben und zusammen aufgetaut. Statt der vom Hersteller vorgegebenen 100 µL wurde mit 50 µL Elutionspuffer (EP) eluiert, um die Konzentration der DNA zu erhöhen. Anschließend wurde für 5 min. bei RT inkubiert.

Bei allen weiteren Extraktionen wurde mit dem Fungal DNA Mini Kit die DNA isoliert. Es eignet sich in vielerlei Hinsicht für die DNA-Extraktion von *S. ferax* und als Ersatz zur traditionellen DNA-Isolierung mit CTAB:

- es handelt sich um eine schnelle und einfache Methode zur Isolierung genomischer DNA aus frischen, gefrorenen oder getrockneten filamentösen Pilzen
- sekundäre Metabolite wie Polysaccharide oder Phenole kommen nicht zum Einsatz
- die DNA-Isolierung ist bzgl. ihrer Reinheit und Konzentration reproduzierbar

### 2.4.3. Primerauswahl

Es wurden verschiedene Primer für unterschiedliche Genabschnitten getestet und miteinander verglichen: 5.8S, 18S, COX, LSU, rns und ITS.

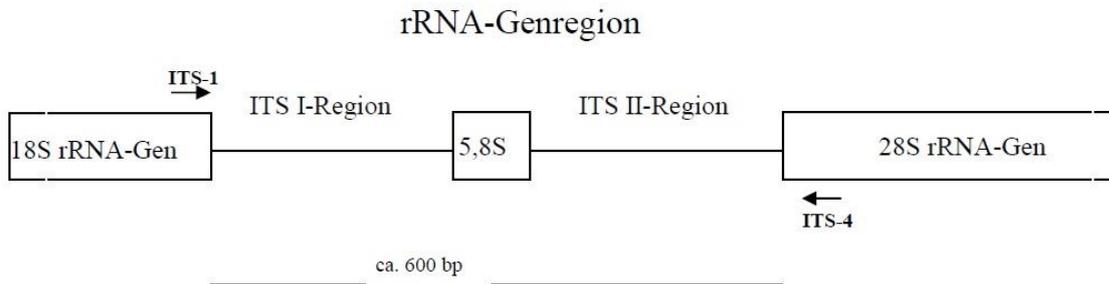
**Tab. 3:** Verwendete Primer. In der Tab. werden alle getesteten Primerpaare dargestellt.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
Sapro 5.8S for	ATGTCTAGGCTCGCACACC
Sapro 5.8S rev	ACAAACATACTCCCAGG CTAAC
Saprox1for	TCATCTAGATGGCTTTTTTCAAC
Saprox1rev	AAACCATACCTAAATAACCAAAAACCT
UNup18S42	CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC
UNlo281220	GTTGTTACACACTCCTTAGCGGAT
rns1for	GATCCTGGCTCAGAATAAATG
rns1rev	GCTCGCTCCTCTCGTATTA
ITS1 forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS 4 reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS1 forwardneu	GTAGGTGAACCTGCGGAA
ITS5 reverseA	TGTCGTTAAACAACAGACTCG
ITS5 reverseB	TGTRCTTWYACAACAGACTCG

Die Primer UNup18S42 und UNlo281220 basieren auf den Untersuchungen von Robideau et al. (2011). Die Primer ITS 1 forward und ITS 4 reverse wurden von White et al. (1990) eingesetzt.

Für die weiteren durchgeführten PCRs wurde ein hochkonservierter Bereich der ITS (Internal Transcribed Spacer) der DNA-Sequenz gewählt, da bei den Primerpaaren 5.8S, 18S, COX, LSU und rns nicht zuverlässig PCR-Produkte generiert werden konnten: Auf den UV-Bildern war entweder keine Bande oder eine Bande im falschen Bereich zu sehen, so dass eigene Primer generiert wurden. Das Primerdesign erfolgte mit dem Programm Primer 3, das Alignment mit Clustal X (Thompson et al. 1997).

Der ITS-Bereich befindet sich zwischen der 18S und 28S rDNA und schließt die 5.8S rDNA mit ein (Abb. 17).



**Abb. 17:** Schematische Darstellung der ITS-Region bei Pilzen (Unterausschuss Methodenentwicklung 2011). Die ITS-Region umfasst ca. 600 bp und liegt zwischen der 18S und 28S rDNA.

Die Nukleotidsequenz dieser Region umfasst ca. 600-700 bp. Die hier ausgewählten Primer sind für diese Genombereiche bei Pilzen spezifisch (Diéguez-Uribeondo et al. 2007, Gozlan et al. 2014). Es wurden spezifische Primer designt, die einen Nachweis für folgende Saprolegnia-Arten erlauben: *S. ferax*, *S. diclina*, *S. parasitica* und *S. oliviae*. Auf Grund der ähnlichen Abfolge der Basenpaare im ITS-Bereich ist ein spezifisches Primerdesign nur für *S. parasitica* möglich. Daher wurden für das Design Arten gewählt, die besondere Auffälligkeiten in vorherigen Studien gezeigt haben. *S. ferax* und *S. parasitica* können beispw. häufig bei Salmoniden nachgewiesen werden (Richards & Pickering 1978, Beakes et al. 1994, Yuasa & Hatai 1996, Kitancharoen & Hatai 1998). *S. ferax* wurde weiterhin gewählt, da diese Art als Stammkultur dient und als Positivkontrolle bei jeder durchgeführten Gelelektrophorese aufgetragen wurde.

#### 2.4.4. PCR-Bedingungen

Bei der PCR handelt es sich um eine Standardmethode zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten (Mullis et al. 1987).

**Tab. 4:** Pipettierschema für einen Standard-PCR Ansatz

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [<math>\mu\text{L}</math>]</b>	<b>Endkonzentration</b>
ddH <sub>2</sub> O	12,5	
10 x Green Buffer	2,5	1 x
Primer forward	2,0	10 pmol/ $\mu\text{L}$
Primer reverse	2,0	10 pmol/ $\mu\text{L}$
DNA Template	3,0	ca. 50 ng/ $\mu\text{L}$
dNTP	2,5	0,2 mM
Dream Taq Polymerase	0,5	2,5 U
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 <math>\mu\text{L}</math></b>	

Für den PCR-Ansatz wurde die Dream-Taq-Polymerase mit einer Prozessivität von 1000 bp/ min. verwendet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH bezogen. Die PCR-Reaktion wurde in Thermocyclern der Fa. Eppendorf durchgeführt.

Die geeignete Annealing-Temperatur wurde mit Hilfe einer Gradienten-PCR (**Tab. 5**) ermittelt. Es wurden folgende Primer eingesetzt:

**ITS1 forward:** 5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA-3'

**ITS5 reverseB:** 5'-TGT RCT TWY ACA ACA GAC TCG-3'

**Tab. 5:** Ansatz Gradienten-PCR

<b>Phase</b>	<b>Temperatur [<math>^{\circ}\text{C}</math>]</b>	<b>Dauer [min.]</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	95	15
Denaturierung	95	0,5
Annealing	55 $\pm$ 4	1,5
Elongation	72	1
Finale Elongation	72	10
<b>Schluss</b>	4	10- $\infty$

Es wurden 39 Amplifikationszyklen durchgeführt und folgende Temperaturen gewählt:

54,2 °C, 55,3 °C, 56,5 °C, 57,5 °C, 58,4 °C, 59,4 °C.

Alle weiteren PCRs wurden mit einer Annealing-Temperatur von 58,4 °C durchgeführt. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese überprüft und anschließend sequenziert.

#### **2.4.5. Elektrophoretische Auftrennung der DNA**

Zur Ermittlung und Trennung der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Eine DNA-Leiter, die DNA-Fragmente definierter Größe beinhaltet, diente als Referenz für die amplifizierten PCR-Fragmente. Die Konzentration des Agarosegels wurde in Abhängigkeit der zu erwartenden Fragmentgröße gewählt. In die Agarose wurde unmittelbar nach dem Aufkochen DNA Stain Clear G hinzu pipettiert. Die Dokumentation der Gele erfolgte direkt im Anschluss an die Elektrophorese mit Hilfe eines UV-Illuminators. Durch die Verwendung eines vorgefärbten Puffers (Green Buffer), mussten die PCR-Produkte nicht mehr angefärbt werden. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA wurde ebenfalls bei allen PCR-Produkten der Mukus- und Schuppenproben durchgeführt.

#### **2.4.6. Aufreinigung der PCR-Produkte und Überprüfung der DNA-Sequenzierung**

Die PCR-Produkte wurden mit dem my-budget Double Pure Kit gemäß Protokoll 1 aufgereinigt. Folgende Modifizierungen wurden vorgenommen:

500 µL Bindepuffer (BP) wurden zum 20 µL PCR-Produkt gegeben und außerhalb der Zentrifugationssäule in einem separaten Reaktionsgefäß durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren sorgfältig gemischt. Die Lösung wurde anschließend auf die Zentrifugationssäule gegeben und bei 12000 rpm für 2 min. zentrifugiert. Es wurde mit 30 µL vorgewärmten EP (50 °C) eluiert. Die Probe wurde 5 min. bei RT inkubiert und bei 12000 rpm für 1 min. zentrifugiert.

Nach der Aufreinigung wurde der DNA-Gehalt der Proben mit einem Nanodrop gemessen. Die Reinheit der gemessenen DNA lag zwischen 1,6-2,0 A260/ 280 und damit im Optimalbereich für dsDNA. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden sequenziert (Eurofins

MWG Synthesis GmbH) und die Ergebnisse mit BLAST (NCBI Standard Nucleotide Blast) überprüft.

#### **2.4.7. Mukusproben der Salmoniden**

Im Folgenden wird beschrieben, wie mit den entnommenen Mukusproben der Salmoniden verfahren wurde.

Die DNA der Mukusproben wurde mit dem DNA Mini Kit extrahiert. Das Herstellerprotokoll wurde folgendermaßen modifiziert:

Die Mukusproben wurden auf Eis gestellt und nach der Zugabe von Lysepuffer (LP) und Proteinase K zusammen aufgetaut. Die Proben wurden bei 50 °C inkubiert und kontinuierlich 15 min. geschüttelt. Nach diesem Zeitpunkt waren sie vollständig lysiert.

Die Extraktion mit dem DNA Mini Kit wurde für alle weiteren Proben angewandt.

Um den Befall mit *Saprolegnia* spp. bei den Salmoniden in der Wupper nachweisen zu können, wurden zunächst die spezifischen Primer in die PCR (**Kap. 2.4.4.**) eingesetzt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proben (**Kap. 2.4.5.**) und ihrer Dokumentation mit Hilfe eines UV-Illuminators erfolgte die Aufreinigung der PCR-Produkte, die exemplarisch zum Sequenzieren eingeschickt wurden (**Kap. 2.4.6.**). Bei jeder eingeschickten Probe konnte *Saprolegnia* spp. nachgewiesen werden - sowohl bei *S. trutta* als auch bei *T. thymallus*.

#### **2.5. Morphologische Untersuchungen**

Bei den morphologischen Untersuchungen wurde die Wirkung von Pflanzenextrakten auf das Wachstum von *S. ferax* untersucht.

In weiteren Analysen wurden an Hand von Schuppenproben Altersbestimmungen durchgeführt und die Längenzuwächse in den einzelnen Jahren bei den Salmoniden berechnet.

### **2.5.1. *In vitro*-Versuche zur Behandlung von *Saprolegnia ferax***

Für die *in vitro*-Versuche wurde *S. ferax* mit Extrakten von *C. papaya* und *M. pruriens* inkubiert, um eine Methode zu entwickeln, die möglicherweise als alternative Behandlungsmöglichkeit anstelle der traditionellen Behandlung mit Malachitgrün und Formalin zur Behandlung von *Saprolegnia* spp. eingesetzt werden kann.

#### **2.5.1.1. Verdünnungsreihen und Tauchbäder zur Inkubation von *Saprolegnia ferax* mit Extrakten aus *Carica papaya* und *Mucuna pruriens***

Unter der sterilen Werkbank wurden ca. 20 mL der in Wasser gelösten Extrakte von *M. pruriens* und *C. papaya* auf die V8-Gemüsesaft-Platten mit der überimpften Originalkultur von *S. ferax* pipettiert. Die Pflanzenextrakte wurden einzeln oder in Kombination miteinander in einer 1 % igen bzw. 2 % igen Lösung (w/v) auf die Petrischalen pipettiert, bis das Myzel vollständig bedeckt war. Nach der zuvor definierten Einwirkzeit (15-60 min.) wurde der Überstand abgossen, die Platten wurden bei 20 °C inkubiert. Die Extrakte wurden eingesetzt, um zu untersuchen, ob sie bei den durchgeführten *in vitro*-Versuchen das Wachstum von *S. ferax* inhibieren konnten. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich mit einer Negativ- und Positivkontrolle. Dadurch konnte die Effizienz jeder Behandlung festgestellt werden. Als Negativkontrolle wurde das V8-Gemüsesaft-Medium mit dem zuvor überimpften Pilz eingesetzt, als Positivkontrolle das autoklavierte V8-Gemüsesaft-Medium. In **Tab. 6** werden die gewählten Verdünnungsreihen sowie die Anzahl und Länge der Tauchbäder dargestellt. Die Ergebnisse wurden durch Wiederholungen der Behandlungen auf Reproduzierbarkeit geprüft.

**Tab. 6:** Verdünnungsreihen und Einwirkzeiten. Es werden die beiden Wirkstoffe (*C. papaya* und *M. pruriens*) mit ihrer unterschiedlichen Einwirkzeit (15-60 min.) sowie die Anzahl der Anwendungen (1 bzw. 2) dargestellt. Die Lösungen für *C. papaya* und *M. pruriens* wurden jeweils getrennt angesetzt. Bei den Versuchsreihen M+P erfolgte die Mischung der beiden Lösungen (getrennt angesetzt), um die gewünschte Konzentration zu erhalten.

Wirkstoff	Lösung % (w/v)	Lösung % (w/v)	Zeit (min.)	Anwendung
<b>P</b>	1	2	15	1
<b>P</b>	1	2	15	2
<b>P</b>	1	2	30	1
<b>P</b>	1	2	30	2
<b>P</b>	1	2	45	1
<b>P</b>	1	2	45	2
<b>P</b>	1	2	60	1
<b>P</b>	1	2	60	2
<b>M</b>	1	2	15	1
<b>M</b>	1	2	15	2
<b>M</b>	1	2	30	1
<b>M</b>	1	2	30	2
<b>M</b>	1	2	45	1
<b>M</b>	1	2	45	2
<b>M</b>	1	2	60	1
<b>M</b>	1	2	60	2
<b>M+P</b>	1	2	15	1
<b>M+P</b>	1	2	15	2
<b>M+P</b>	1	2	30	1
<b>M+P</b>	1	2	30	2
<b>M+P</b>	1	2	45	1
<b>M+P</b>	1	2	45	2
<b>M+P</b>	1	2	60	1
<b>M+P</b>	1	2	60	2

#### Legende

**P:** *C. papaya*

**M:** *M. pruriens*

**M+P:** *M. pruriens* + *C. papaya*

## 2.5.2. Untersuchung der Schuppenproben

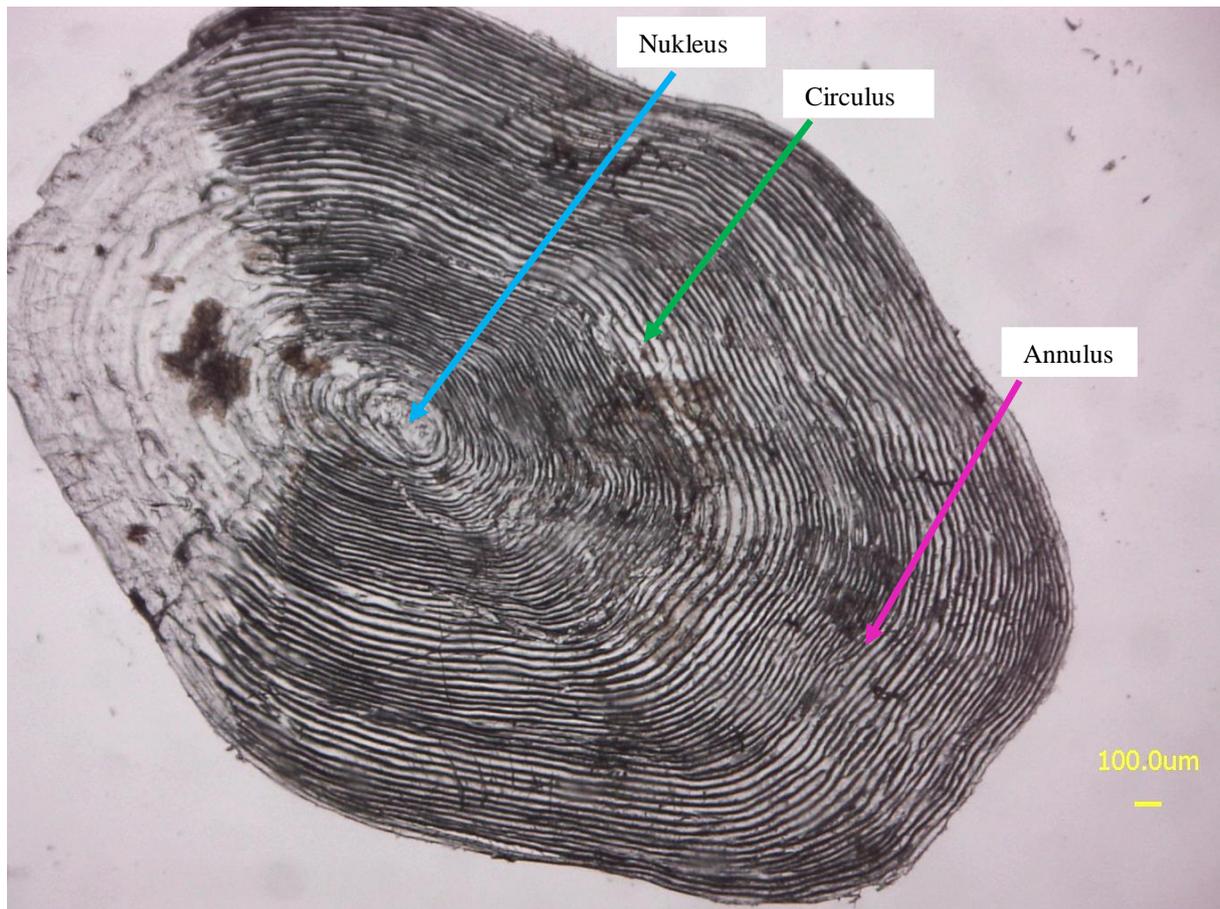
Altersbestimmungen und die Berechnungen des Längenzuwachses von Fischen können mit Hilfe von Hartstrukturen durchgeführt werden. Besonders gut eignen sich hierfür die knöchernen Zuwachsringe von Schuppen (Campana 2001, Quist et al. 2012). *S. trutta* und *T. thymallus* besitzen als Vertreter der Teleostei Elasmoidschuppen, die zur häufigsten Art von Schuppen zählen (Sire & Akimenko 2004).

### 2.5.2.1. Präparation und Digitalisierung

Für die Altersbestimmung der Salmoniden wurden je drei Schuppen eines Individuums unter dem Binokular (2 x oder 4 x Vergrößerung, abhängig von der Fischart und der Größe der Schuppe) ausgewählt. Die Schuppen wurden aus dem Eppendorfgefäß vorsichtig in eine mit Wasser gefüllte Petrischale überführt. Durch leichtes Hin- und Herschwenken lösen sich die zusammenhaftenden Schuppen i. d. R. voneinander. Andernfalls wurden die Proben vorsichtig mit einer Präpariernadel voneinander gelöst. Für die Berechnungen wurden ausschließlich Primärschuppen gewählt. Diese eignen sich für die Berechnung des Längenwachstums und die Bestimmung des Alters, da sie gut erkennbare Annuli (Jahresringe) und Circuli (Zuwachsstreifen) aufweisen (Berger 2011), (**Abb. 18**). Zu den Kriterien, die für die Altersbestimmung erforderlich sind, zählen die Lesbarkeit der Strukturen, die Unverwechselbarkeit der Schuppe sowie die Regelmäßigkeit der Wachstumsringe (Chilton & Beamish 1982, Panfili & Loubens 1992, Panfili et al. 2002). Eine Sekundärschuppe besitzt weniger Circuli, hat einen auffällig großen Nukleus (Kern) und ist im Vergleich zu den anderen Schuppen kleiner (Shearer 1992). Daher sind sie für die Altersbestimmungen nicht geeignet.

Gewebereste wurden entweder mit Hilfe eines dünnen Pinsels oder mit einer Präpariernadel entfernt. Die Schuppen wurden anschließend auf einem Objektträger platziert. Für das Präparat wurde jede Schuppe mit einem Tropfen Wasser benetzt und mit einem weiteren Objektträger bedeckt. Bis zur vollständigen Trocknung wurden die Objektträger mit Klammern fixiert und danach mit Tesafilm umwickelt.

Die Schuppenproben wurden mit dem Mikroskop bei 4 x Vergrößerung digitalisiert und vermessen, die als Original- und Vermessungsbild archiviert werden.



**Abb. 18:** Schuppenprobe von *S. trutta*. Dargestellt werden die für eine Schuppe typischen Charakteristika. Dazu zählen: der Nukleus (Mittelpunkt), die Circuli (Zuwachsstreifen) sowie die einzelnen Annuli (Jahresringe).

### 2.5.2.2. Berechnungen des Längenzuwachses und Altersbestimmungen

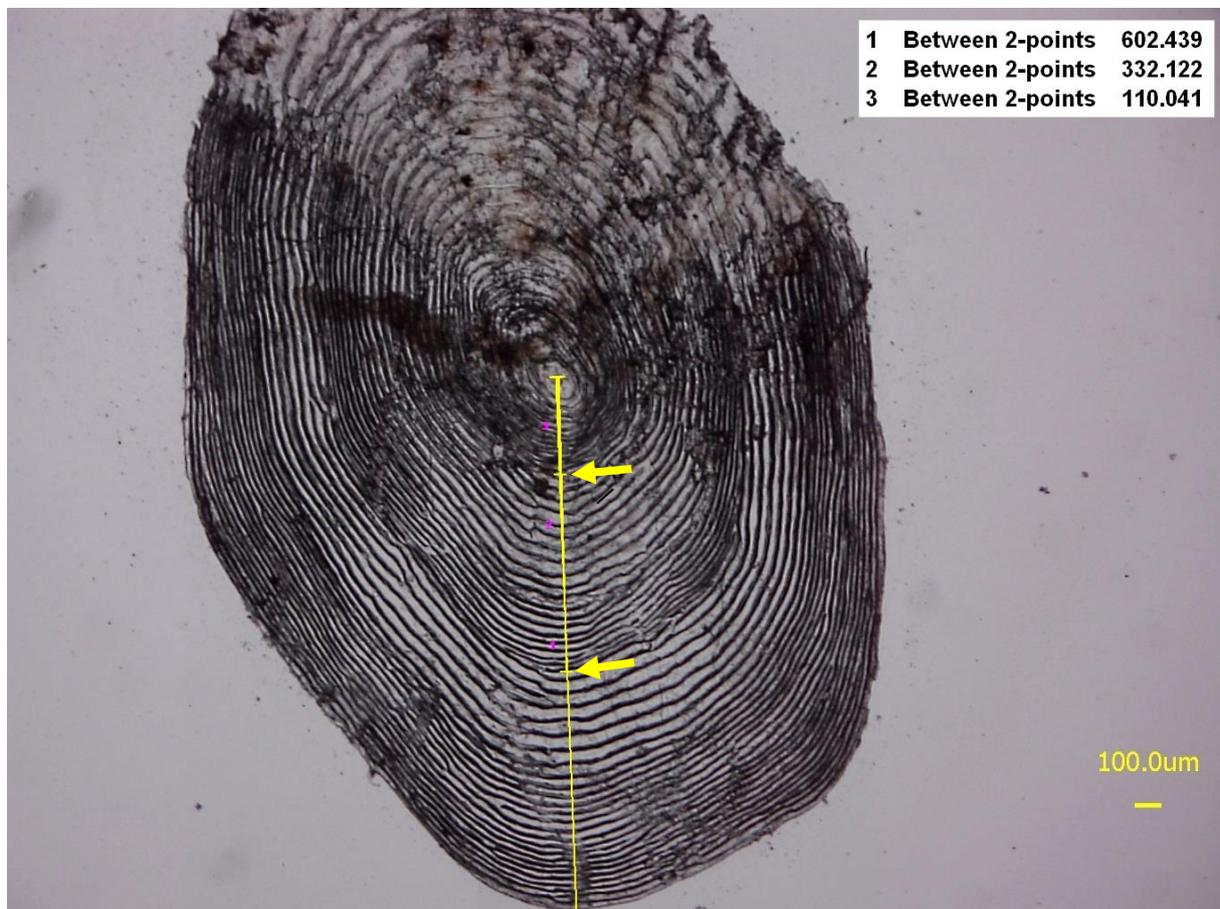
Die Schuppenstruktur gibt Aufschluss über das Alter von Salmoniden (Shearer 1992) und das Längenzuwachstum. Die Längenzurückrechnung an Hand von Schuppenproben ist eine Methode für die Berechnung des individuellen somatischen Wachstums (Fukuwaka & Kaeriyama 1996). Sie wird angewandt, um die Fischlänge der vorherigen Jahre zu berechnen (Francis 1990, Ogle 2010) und basiert auf der Korrelation zwischen der Gesamtlänge eines Fisches sowie dem Schuppenradius (Francis 1990). Die Schuppen entwickeln sich mit dem Wachstum des Fisches (Dahl 1910). Veränderungen des Körperwachstums korrelieren nicht nur mit der Größe einer Schuppe, sondern auch mit der Anzahl der Circuli (Cheung et al. 2007). Die Beziehung zwischen der individuellen Schuppengröße und der individuellen Körpergröße variiert sehr stark (Fukuwaka & Kaeriyama 1996). Zwischen dem absoluten Wachstum eines Fisches und dem Zuwachs des Schuppenradius konnte eine direkte Verbindung hergestellt werden, ebenso zwischen dem Zuwachs der Schuppen und der Anzahl der Circuli. Die direkte Auswirkung des absoluten Wachstums auf die Anzahl der Circuli zeigt, dass das absolute

Wachstum ebenfalls das Verhältnis zwischen dem Zuwachs des Schuppenradius und der Anzahl der Circuli beeinflusst. Das somatische Wachstum wirkt sich direkt auf den Abstand zwischen den Circuli aus. Es wird durch physikochemische Umweltbedingungen beeinflusst, die sich indirekt auf den Abstand zwischen den Circuli auswirken. Vermutlich stehen die Anzahl der Circuli und ihr Abstand voneinander in Zusammenhang mit dem somatischen Wachstum und den Umweltbedingungen (Fukuwaka & Kaeriyama 1996).

Das Verfahren der Längenrückberechnung ermöglicht

- die Feststellung der Gesamtlänge eines Fisches zur Zeit der Bildung seiner Annuli,
- die Bestimmung der jährlichen Zuwachsraten anhand der Mittelwerte der für die einzelnen Jahresmarken rückberechneten Fischlängen und einen unmittelbaren Vergleich mit dem Längenwachstum anderer Individuen (Schmieds 1981).

**Abb. 19** zeigt die Vermessung einer Probe mit zwei Annuli am Beispiel von *S. trutta*.



**Abb. 19:** Vermessung einer Schuppenprobe von *S. trutta*. Bei einer Messung vom Nukleus aus bis zur längsten Kammseite (Gesamtlänge: 702, 29  $\mu\text{m}$ ) können zwei Annuli gesehen werden. Der 1. Annulus befindet sich bei 378,38  $\mu\text{m}$ , der zweite bei 540,28  $\mu\text{m}$ . *S. trutta* wurde im 3. Lebensjahr gefangen und beprobt.

Der jährliche Längenzuwachs wurde mit der Dahl-Lea-Formel berechnet:

$$x = \frac{L_G \times L_2}{L_1}$$

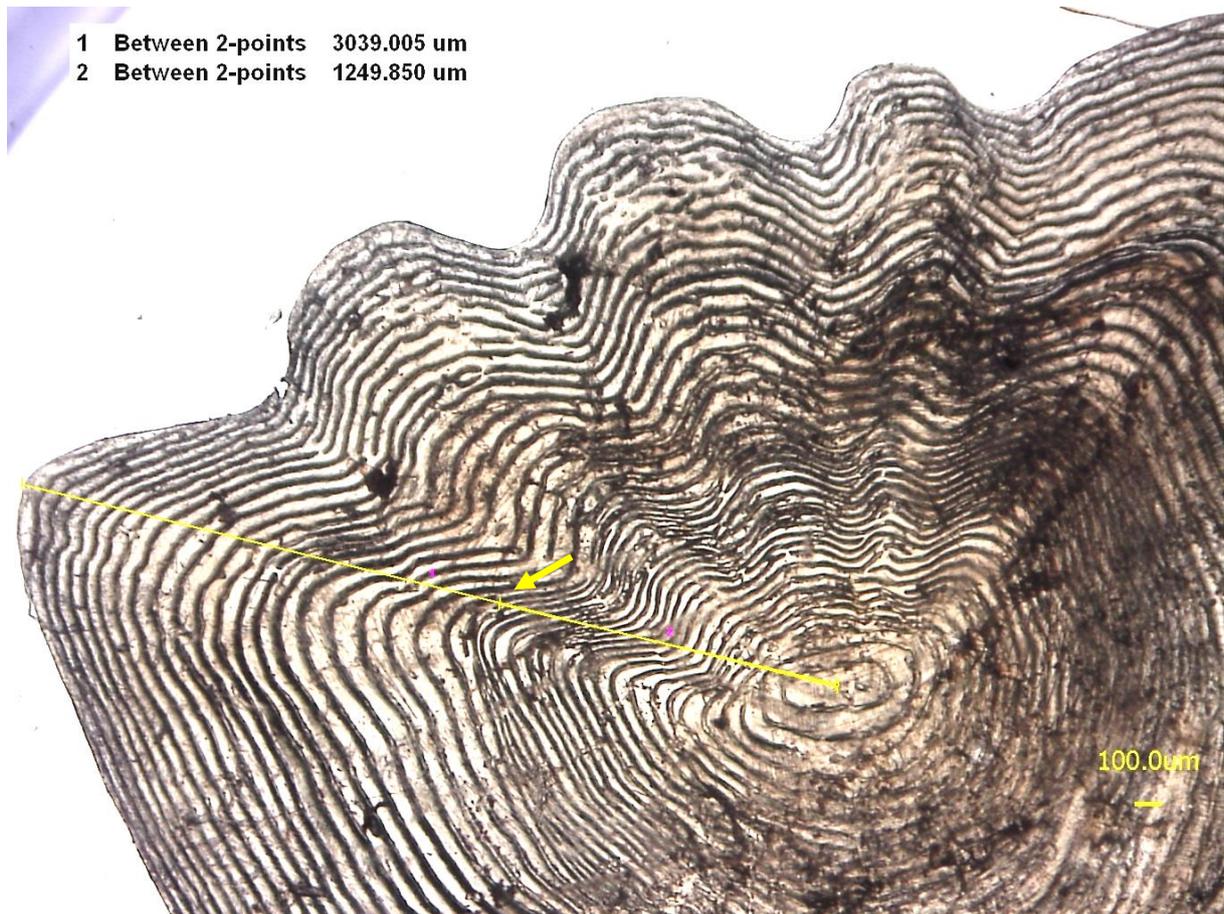
$L_G$ : Gesamtlänge des Fisches beim Fang

$L_1$ : Schuppenlänge

$L_2$ : Annulus

Die Berechnungen der Längenzuwächse einer Schuppe wurden in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, in dem vom Nukleus aus bis zur längsten Seite (**Abb. 19** und **20**) mit einem digitalen Lineal gemessen wurde (Dahl 1910). Diese Methode wird als Radialvermessungen bezeichnet und ist für die Rückrechnung erforderlich (Ogle 2010). Danach wurde die Probe auf ihre Annuli untersucht. Die jährlichen Zonen auf einer Fischschuppe werden durch die Abfolge der Abschnitte von weit auseinanderliegenden und nah beieinander liegenden Circuli bestimmt. Ein Jahresring befindet sich dort, wo Übergänge eindeutig zu erkennen sind. Ein Übergang von einem Jahresring zum nächsten lässt sich an der Veränderung der Größe und Breite der Circuli erkennen. Der Übergang vom Sommer zum Winter ist durch den Übergang von breiteren zu schmaleren Circuli charakterisiert (**Abb. 18**), (Shearer 1992). Das Wachstum eines Fisches ist im Winter nicht so prägnant wie im Sommer, da das Nahrungsangebot geringer ist. Daher sind die Circuli schmaler ausgeprägt. Im Herbst und Winter nimmt das Wachstum ab, so dass die Circuli generell schmaler sind. Die breiten Circuli zeigen das Wachstum im Sommer an (Dahl 1910).

Die zweite Messung erfolgte vom Nukleus ausgehend zum ersten Annulus. Anschließend wurde eine weitere Messung zum zweiten Annulus, wieder beginnend im Nukleus durchgeführt. **Abb. 19** zeigt ein Beispiel von *S. trutta*, bei der das dritte Lebensjahr noch nicht abgeschlossen ist. Die letzten Circuli, die kein abgeschlossenes Jahr darstellen, werden als „plus growth“ bezeichnet und stellen den Zuwachs in dem Fangjahr des Fisches dar (Shearer 1992). **Abb. 20** zeigt eine Probe von *T. thymallus* mit ihrer charakteristischen Kammform. Hier erfolgte die Messung jeweils bis zur längsten Kammseite.



**Abb. 20:** Vermessung einer Schuppenprobe von *T. thymallus*. Bei einer Messung vom Nukleus aus bis zur längsten Kammseite (Gesamtlänge: 3039,005  $\mu\text{m}$ ) kann ein Annulus gesehen werden. Er befindet sich bei 1249,850  $\mu\text{m}$ . *T. thymallus* wurde im 2. Lebensjahr gefangen und beprobt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Untersuchungen zu *Saprolegnia* spp.

Bei den durchgeführten Elektrofischungen wurden Salmoniden mit dermalen Auffälligkeiten beobachtet. Daraus resultierte die Fragestellung, ob es sich hierbei um eine Pilzkrankung handelte und an welchen KM diese vermehrt auftrat.

##### 3.1.1. Molekularbiologische Untersuchungen: Auswertung der Mukusproben

Mit Hilfe molekularbiologischer Analysen konnte das Fischpathogen *Saprolegnia* spp. nachgewiesen werden. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, zu überprüfen, an welchen KM ein häufiger Befall zu beobachten war und ob dieser jahreszeitenabhängig auftrat. Zugleich wurde der Nachweis in den unterschiedlichen Jahren sowie zu den Probeentnahmezeiten im Frühjahr und Herbst miteinander verglichen. Alle Mukusproben wurden in den Jahren 2012 bis 2015 genommen und ausgewertet. In **Abb. 21** wird eine auffällige adulte *S. trutta* aus der Wupper gezeigt. Ein wichtiger Fortschritt der aktuellen Forschung ist der molekularbiologische Nachweis von *Saprolegnia* spp. bei *T. thymallus*, der bislang nicht im Fokus vorheriger Studien stand.

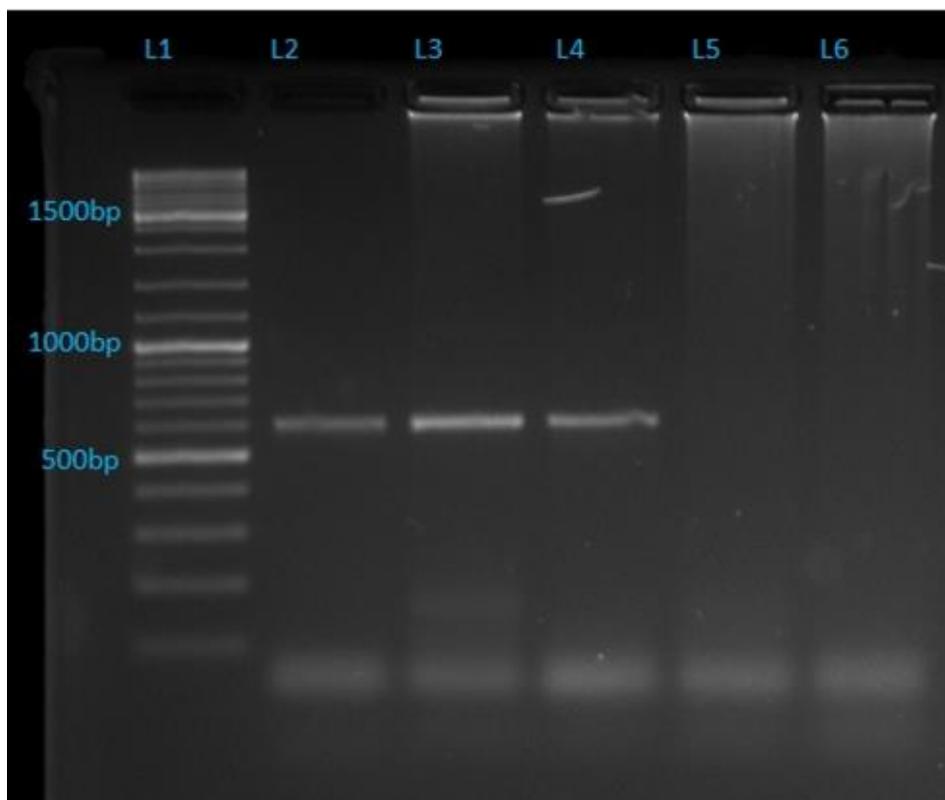


**Abb. 21:** Fisch mit dermalen Auffälligkeit. Das Foto zeigt eine adulte *S. trutta*, die in der Wupper gefangen und beprobt wurde.

### 3.1.1.1. Nachweis von *Saprolegnia* spp. bei den Salmoniden in der Wupper

Insgesamt wurden in drei Jahren von 532 Salmoniden Mukusproben genommen und ausgewertet. Vor jeder Probenentnahme wurden dermale Auffälligkeiten der Fische notiert. Insgesamt konnten diese bei 22 Individuen festgestellt werden. In 17 dieser Fälle wurde *Saprolegnia* spp. molekularbiologisch nachgewiesen. Wahrscheinlich hat es sich bei den anderen dermalen Auffälligkeiten um eine andere Pilzinfektion oder eine Verletzung gehandelt, die jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen waren.

Nach der Isolierung der DNA aus den Mukusproben der Salmoniden erfolgte mittels spezifischer *Saprolegnia* spp.-Primer der PCR-Nachweis (**Kap. 2.4.7.**). In **Abb. 22** wird ein gelelektrophoretischer Nachweis von *Saprolegnia* spp. gezeigt.



**Abb. 22:** Molekulare Identifizierung von *Saprolegnia* spp. bei den Salmoniden. L1: Größenstandard, L2: Positivkontrolle bei 600 bp, L3: positiver Nachweis von *Saprolegnia* spp. bei *S. trutta*, L4: positiver Nachweis von *Saprolegnia* spp. bei *T. thymallus*, L5: negativer Nachweis bei *S. trutta*, L6: negativer Nachweis bei *T. thymallus*

### 3.1.1.2. Vergleich der Probenstellen und Fischarten in Bezug auf den Befall mit *Saprolegnia* spp.

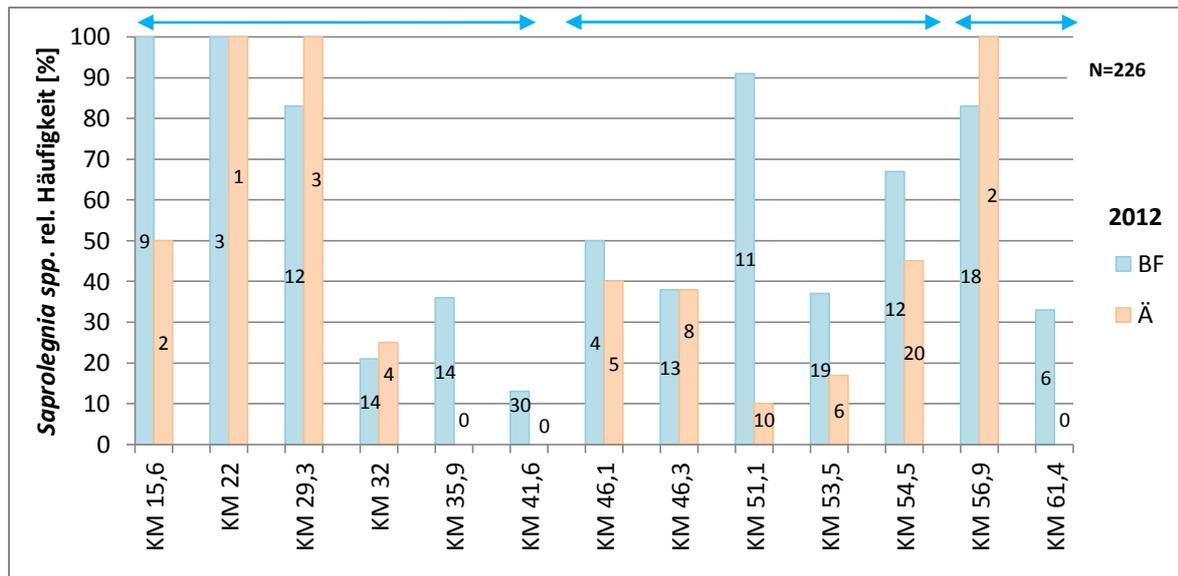
In den **Abb. 23, 25** und **27** wird die relative Häufigkeit von *Saprolegnia* spp. bei *S. trutta* und *T. thymallus* in der Wupper in den Jahren 2012, 2013 und 2015 an den unterschiedlichen KM dargestellt (Anzahl der beprobten Individuen an den jeweiligen KM (s. Anhang, Tab. **16, 17** und **18**). Auf Grund der unterschiedlichen anthropogenen Einflüsse in den einzelnen Stadtbereichen (**Kap 1.1.2.**) differenziert die Abbildung zwischen den Bereichen Vor-, Innen- und Nachstadt.

2012 (**Abb. 23**) konnte *T. thymallus* in allen drei Stadtbereichen an den KM 35,9, KM 41,6 und KM 61,4 entweder nicht gefangen und beprobt werden oder es konnte kein Nachweis mit Hilfe der Mukusproben für *Saprolegnia* spp. erbracht werden.

In der Nachstadt war bei jeweils 3 Probenstellen (KM 15,6, KM 22 und KM 29,3) ein 100 % iger Befall von *Saprolegnia* spp. bei *T. thymallus* und *S. trutta* zu sehen. KM 22 war jedoch der einzige, an dem dies für beide Salmonidenarten zutraf und war damit konträr zu KM 15,6, bei dem der Befall von *T. thymallus* mit 50 % um die Hälfte niedriger war als bei *S. trutta* mit 100 %.

In der Vorstadt waren im Vergleich nur an einer Probenstelle (KM 56,9) alle beprobten *T. thymallus* befallen.

Im Innenstadtbereich (KM 51,1) war bei *S. trutta* ein hoher Befall von ca. 90 % erkennbar. Dem gegenüber stand an diesem KM ein geringer Anteil von befallenen *T. thymallus* mit ca. 10 %. An KM 54,5 herrschten ähnliche Verhältnisse: Auch hier war der Befall bei *S. trutta* wesentlich geringer. Im gesamten Jahr war in der Nachstadt (KM 41,6) der geringste Befall zu erkennen: Während der Befall bei *S. trutta* mit ca. 12 % sehr gering war, war bei *T. thymallus* gar kein Befall zu beobachten.



**Abb. 23:** Relative Häufigkeit von *Saprolegnia* spp. bei *S. trutta* (BF) und *T. thymallus* (Ä) im Jahr 2012. Dargestellt wird die Anzahl aller beprobten Individuen (N) je Probenstelle (KM). Außerdem sind die unterschiedlichen Stadtbereiche gekennzeichnet.

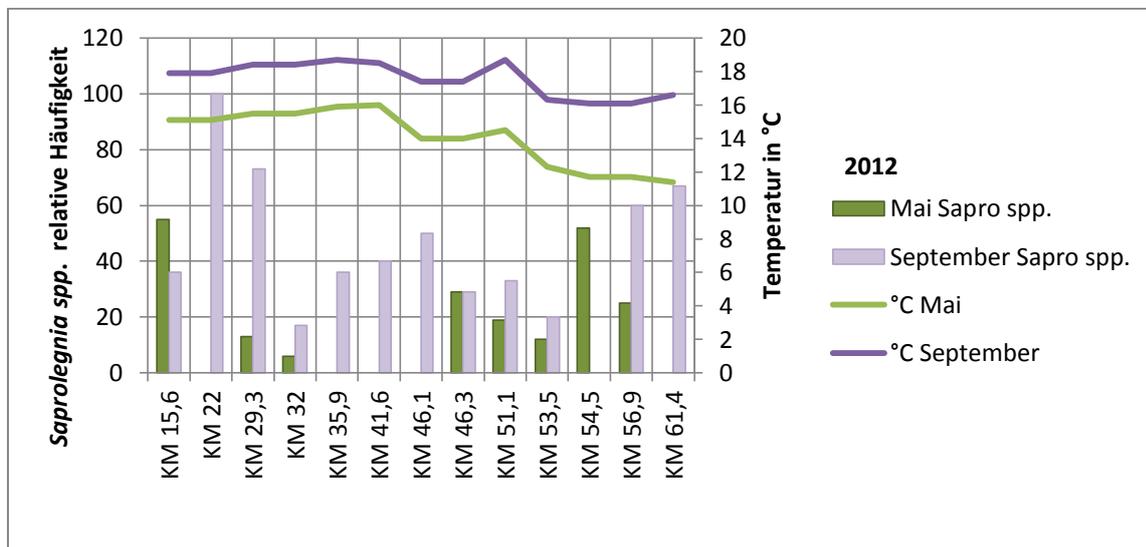
←→ Kennzeichnung der Stadtbereiche. Nachstadt: KM 15,6 - KM 41,6 Innenstadt: KM 46,1 - KM 54,5 Vorstadt KM 56,9 - KM 61,4

Die **Abb. 24, 26** und **28** zeigen die relative Häufigkeit von *Saprolegnia* spp. bei *S. trutta* und *T. thymallus* im Mai und September der Jahre 2012, 2013 und 2015 an den unterschiedlichen KM sowie in Abhängigkeit der gemessenen durchschnittlichen Temperatur in den beiden Monaten. In allen Jahren entstammten die Temperaturmessungen und Mukusprobenentnahmen z. T. unterschiedlichen Probestellen (s. Anhang, **Tab. 19**). Grund dafür war die Kooperation mit verschiedenen Instituten.

2012 war eindeutig (**Abb. 24**) zu erkennen, dass der Nachweis von *Saprolegnia* spp. mit der Jahreszeit korreliert: Im September war der Befall gegenüber Mai an fast allen Probestellen (bis auf KM 54,5 und KM 15,6) wesentlich stärker ausgeprägt. Dies wurde besonders an den KM 22,0, KM 35,9, KM 41,6 und KM 46,1 deutlich, bei denen im Mai bei keinem Individuum ein Nachweis erfolgte, dafür waren aber alle beprobten Tiere im September befallen.

Bei der Betrachtung der relativen Häufigkeit der Nachweise von *Saprolegnia* spp. lassen sich 2012 in Bezug auf die durchschnittliche Flusstemperatur folgende Beobachtungen machen: Generell war die Temperatur an allen KM im Mai um ca. 3 °C niedriger als im September. Die Nachweisrate war an allen beprobten KM im September relativ höher und konnte an jedem KM erfolgen. Neben der Jahreszeit hatte die geografische Lage der Probestellen einen

Einfluss auf die Temperatur (z. B. die Warmwassereinleitungen der Heizkraftwerke). Dabei zeigten sich zwischen den verschiedenen KM Differenzen: Bei KM 54,5 waren im Mai mit der niedrigsten Temperatur von 11 °C am meisten Fische befallen. Hingegen konnte an diesem KM mit einer Durchschnittstemperatur von 16 °C im September kein Befall beobachtet werden. Allerdings erfolgte im September an KM 22 ein 100 % iger Nachweis von *Saprolegnia* spp. bei 17 °C, während im Mai bei 15 °C kein Befall zu erkennen war.



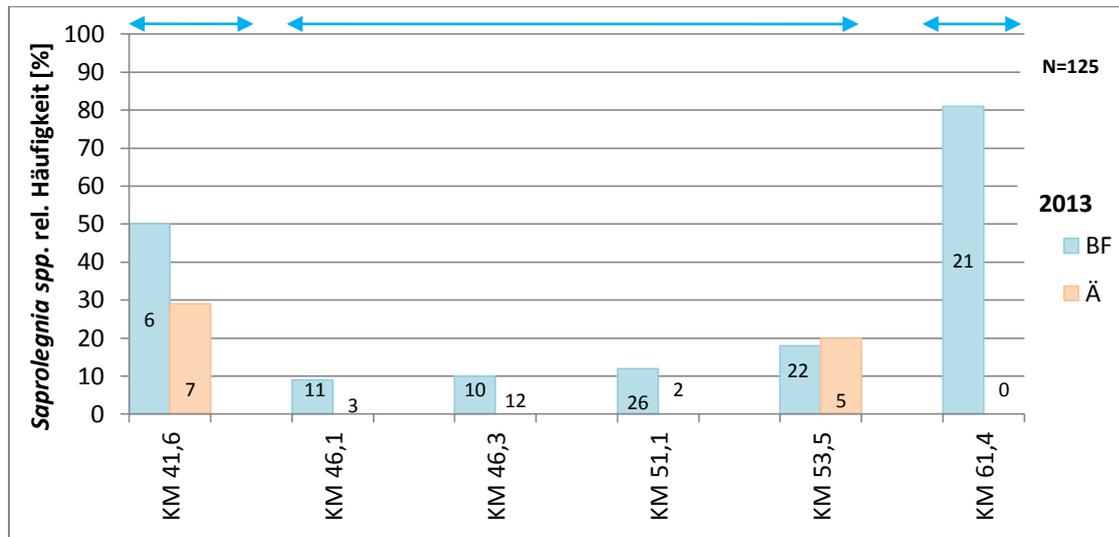
**Abb. 24:** Relative Häufigkeit von *Saprolegnia* spp. bei den Salmoniden. In der Abb. werden die unterschiedlichen Probeentnahmezeiten (Mai und September) sowie die Wassertemperatur [°C] an den unterschiedlichen KM im Jahr 2012 dargestellt. Zusätzlich wird ein Bezug zum Befall mit *Saprolegnia* spp. hergestellt.

2013 (**Abb. 25**) standen insgesamt von weniger KM Proben zur Verfügung als 2012. *T. thymallus* konnte insgesamt nur an zwei Probestellen (KM 41,6 und KM 53,5) gefangen und beprobt werden.

Beim Vergleich des Vorkommens der Salmonidenarten und im Hinblick auf den Befall im Vorstadtbereich (KM 61,4) konnten 2013 und 2012 keine *T. thymallus* gefangen und beprobt werden. Hingegen lag der Befall mit *Saprolegnia* spp. bei *S. trutta* bei ca. 80 %.

Im Innenstadtbereich war 2013 an allen KM bei beiden Fischarten ein deutlich geringerer Befall im Vergleich zu den beiden anderen Stadtbereichen, sowie auch im Vergleich zu 2012 zu erkennen. 2012 fiel gegenüber 2013 auf, dass im Innenstadtbereich die Anzahl der beprobten *T. thymallus* 2012 viel höher war.

Im Nachstadtbereich (KM 41,6) konnten 2013, im Vergleich zu 2012, beide Salmonidenarten beprobt werden, auch wenn der Befall mit *Saprolegnia* spp. bei *T. thymallus* gering war. Im Vergleich zu 2012 war er jedoch an dieser Probenstelle bei *S. trutta* um ca. 40 % höher.

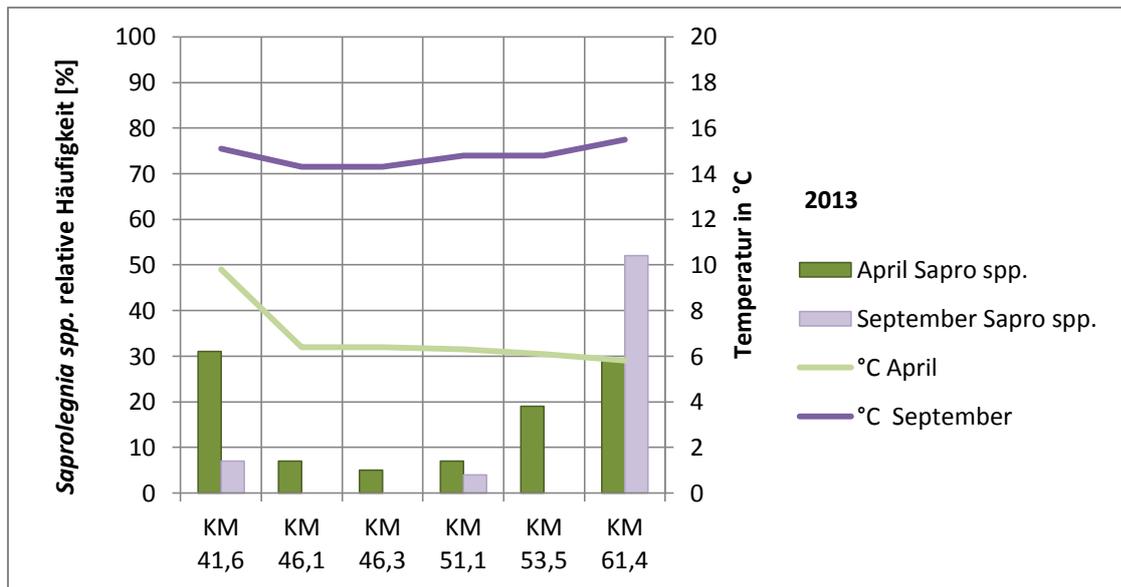


**Abb. 25:** Relative Häufigkeit von *Saprolegnia* spp. bei *S. trutta* (BF) und *T. thymallus* (Ä) im Jahr 2013. Dargestellt wird zusätzlich die Anzahl aller beprobten Individuen (N) je Probenstelle (KM). Außerdem sind die unterschiedlichen Stadtgebiete gekennzeichnet.

←→ Kennzeichnung der Stadtgebiete. Nachstadt: KM 41,6 Innenstadt: KM 46,1 - KM 53,5 Vorstadt KM 61,4

Bei einem Vergleich der einzelnen Probenstellen sowie den Jahren 2012 (**Abb. 24**) und 2013 (**Abb. 26**) konnte sowohl bei KM 41,6 als auch bei KM 61,4 der Nachweis von *Saprolegnia* spp. erstmalig im Frühjahr erfolgen und war höher als im Herbst.

Die Beprobung erfolgte 2013 im April. In diesem Jahr zeigte sich bei KM 41,6 ( $\bar{\theta}$  9 °C) und KM 61,4 ( $\bar{\theta}$  6 °C) ein Befall von ca. 30 %. Je niedriger die Temperatur im April mit steigendem KM war, desto höher war der Befall. Im September wiesen an KM 61,4 ( $\bar{\theta}$  15 °C) ca. 50 % aller Salmoniden einen Befall mit *Saprolegnia* spp. auf.

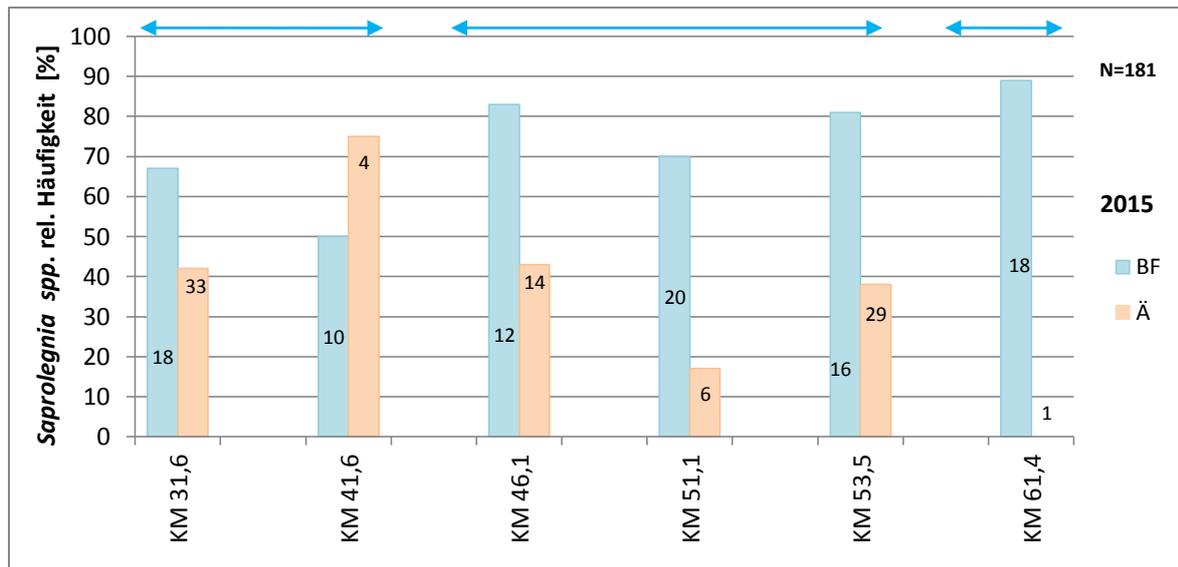


**Abb. 26:** Relative Häufigkeit von *Saprolegnia* spp. bei den Salmoniden. In der Abb. werden die unterschiedlichen Probeentnahmezeiten (April und September) sowie die Wassertemperatur [°C] an den unterschiedlichen KM im Jahr 2013 dargestellt. Zusätzlich wird ein Bezug zum Befall mit *Saprolegnia* spp. hergestellt.

2015 (**Abb. 27**) waren die Probestellen, bis auf KM 31,6, die gleichen wie 2013. An diesem KM konnten im Mai keine Proben genommen werden. Es war das einzige Jahr, in dem an KM 61,4 *T. thymallus* zwar gefangen und beprobt werden konnte, allerdings kein Befall zu erkennen war. Bei einem Vergleich der drei Jahre fällt auf, dass 2012 bei den meisten *T. thymallus* sowohl im Vor- als auch im Innenstadtbereich ein Befall mit *Saprolegnia* spp. zu sehen war.

Im Innenstadtbereich war *S. trutta* 2015 zu einem großen Teil mit *Saprolegnia* spp. befallen, während er bei *T. thymallus* nur bei deutlich weniger als der Hälfte der beprobten Individuen zu erkennen war.

Insgesamt war KM 41,6 die Probenstelle mit dem höchsten Befall von *Saprolegnia* spp. bei *T. thymallus*, während an KM 61,4 sogar bei ca 90 % aller beprobten *S. trutta* *Saprolegnia* spp. nachgewiesen werden konnten.

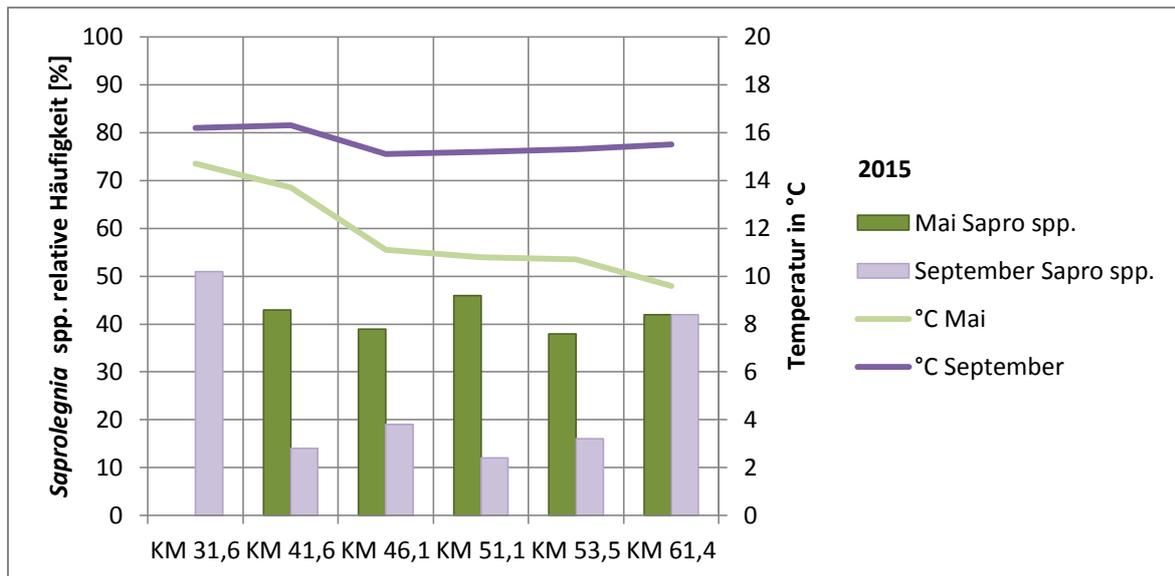


**Abb. 27:** Relative Häufigkeit von *Saprolegnia* spp. bei *S. trutta* (BF) und *T. thymallus* (Ä) im Jahr 2015. Dargestellt wird zusätzlich die Anzahl aller beprobten Individuen (N) je Probenstelle (KM). Außerdem sind die unterschiedlichen Stadtbereiche gekennzeichnet.

↔ Kennzeichnung der Stadtbereiche. Nachstadt: KM 31,6 - KM 41,6 Innenstadt: KM 46,1 - KM 53,5 Vorstadt: KM 61,4)

2015 (**Abb. 28**) konnten (bis auf KM 31,6) bei einem Jahresvergleich zu 2012, an jeder Probenstelle im Mai mehr Nachweise für *Saprolegnia* spp. erbracht werden.

Der Befall mit *Saprolegnia* spp. hat eindeutige Unterschiede zwischen diesen beiden Jahren in Bezug auf die jahreszeitliche Verteilung gezeigt: Im September 2012 (**Abb. 24**) schwankte die Temperatur im Flussverlauf zwischen 16-18 °C. Der Befall lag zwischen 15-100%. Im Vergleich dazu betrug die Temperatur 2015 im September ca. 16 °C (**Abb. 28**) und war damit relativ konstant. Der relative Befall bei lag ca. 10-50 %. 2012 lag der Nachweis von *Saprolegnia* spp. im Mai an allen KM zwischen 5-50 % bei einer Temperatur von 15-11 °C, flussaufwärts betrachtet. Im Vergleich dazu konnte beobachtet werden, dass die relative Häufigkeit des Befalls mit *Saprolegnia* spp. im Mai 2015 angestiegen war. Sie lag nun bei 40-50 % und einer Temperatur zwischen 14-9 °C flussaufwärts.

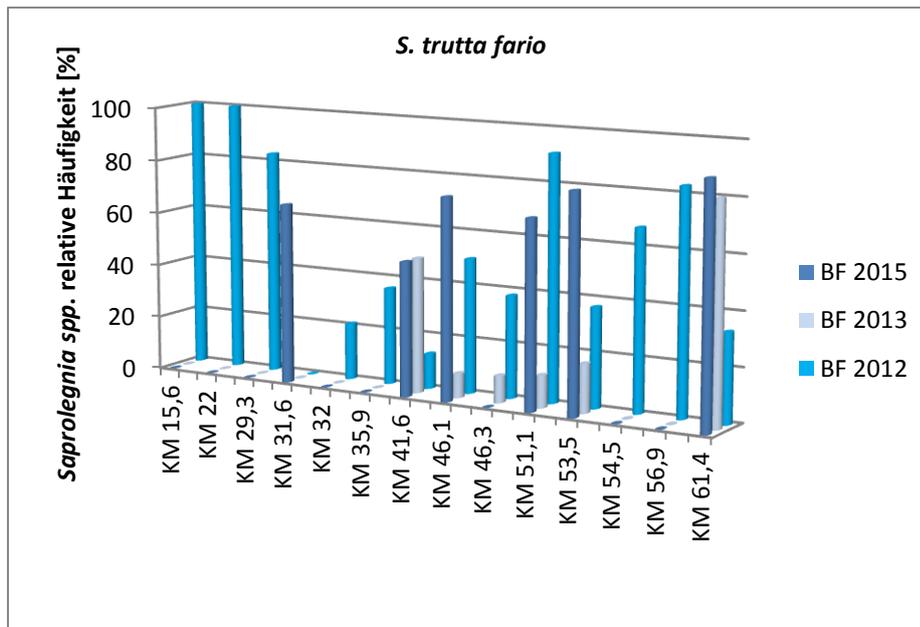


**Abb. 28:** Relative Häufigkeit von *Saprolegnia* spp. bei den Salmoniden. In der Abb. werden die unterschiedlichen Probeentnahmezeiten (Mai und September) sowie die Wassertemperatur [°C] an den unterschiedlichen KM im Jahr 2015 dargestellt. Zusätzlich wird ein Bezug zum Befall mit *Saprolegnia* spp. hergestellt.

Im Vergleich der Jahre 2012, 2013 und 2015 hat sich gezeigt, dass 2012 im September der Befall höher war als 2013 und 2015. Während es bereits 2013 zu einer leichten Verschiebung von September zu April kam, kulminierte die Nachweishöhe 2015 eindeutig im Mai, und zwar an allen beprobten KM. Die prozentuale Verteilung war in den Jahren 2013 und 2015 bei KM 41,6 und KM 61,4 gleich.

Die **Abb. 29** und **30** stellen die relative Häufigkeit von *Saprolegnia* spp. bei *S. trutta* und *T. thymallus* an den unterschiedlichen KM im Dreijahresvergleich dar.

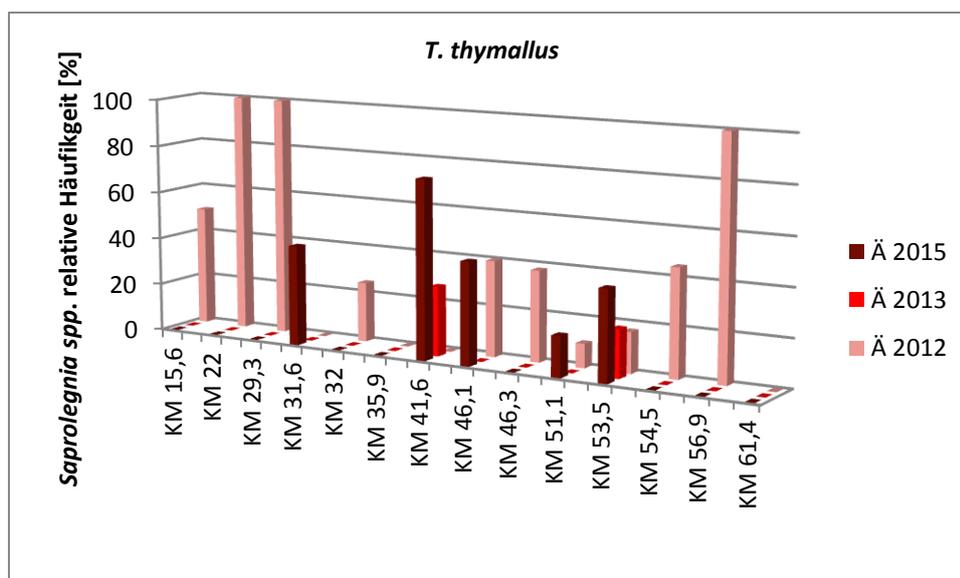
In **Abb. 29** ist zu sehen, dass 2015 im Vergleich zu 2012 der Befall mit *Saprolegnia* spp. an allen gemeinsamen Probestellen (KM 41,6, KM 46,1, KM 53,5 und KM 61,4) zugenommen hatte. Die einzige Ausnahme bildet KM 51,1, an dem der Befall mit *Saprolegnia* spp. im Jahr 2012 höher war. Es war das einzige Jahr, in dem alle beprobten Fische mit *Saprolegnia* spp. befallen waren. Es konnte nicht nur eine Verschiebung zwischen den Jahreszeiten beobachtet werden, sondern auch eine Verschiebung der Häufigkeit von 2012 zu 2015. 2015 war insgesamt das Jahr mit dem höchsten Befall von *Saprolegnia* spp. (**Abb. 28**). Ein Befall mit *Saprolegnia* spp. konnte 2013 im Vergleich zu 2012 und 2015 seltener beobachtet werden. Er lag an fast allen KM bei ca. 10 %. KM 61,4 bildete mit ca. 80 % eine Ausnahme.



**Abb. 29:** Nachweis des Befalls von *Saprolegnia* spp.. In der Abb. ist die relative Häufigkeit des Befalls mit *Saprolegnia* spp. bei *S. trutta* (BF) im Jahresvergleich dargestellt. Zu sehen ist nicht nur ein Vergleich der Jahre 2012, 2013 und 2015, sondern auch zwischen den einzelnen KM, an denen die Proben genommen wurden.

2012 (**Abb. 30**) stachen besonders die KM 22, KM 29,3 und KM 56,9 hervor: Die einzigen, bei denen ein 100 % iger Befall bei *T. thymallus* zu erkennen war - nicht nur in diesem Jahr, sondern auch bei einem Vergleich zum Befall in den Jahren 2013 und 2015.

Wie bei *S. trutta* (**Abb. 29**) war 2013 der geringste Befall von *Saprolegnia* spp. an KM 41,6 und KM 53,5 zu erkennen. 2015 war *T. thymallus* vorwiegend an KM 41,6 mit *Saprolegnia* spp. befallen. Damit wurde eine bedrohliche Entwicklung im Vergleich zu den beiden Vorjahren deutlich. Bei einem Jahresvergleich hatte sich diese Entwicklung ebenso bei KM 53,5 gezeigt: Während 2012 der Befall bei ca. 15 % lag, war er 2015 fast doppelt so hoch. Zusätzlich konnten an KM 41,6 und KM 61,4 folgende Beobachtungen gemacht werden: Während sich bei KM 41,6 eine kontinuierliche Entwicklung im Verlauf der Jahre gezeigt hatte (2012 mit 0 % im Vergleich zu 2015 mit 70 %), war dieser Trend 2015 nicht zu erkennen. Dort konnte in keinem der Jahre ein Befall mit *Saprolegnia* spp. beobachtet werden.



**Abb. 30:** Nachweis des Befalls von *Saprolegnia* spp.. In der Abb. ist die relative Häufigkeit des Befalls mit *Saprolegnia* spp. bei *T. thymallus* (Ä) im Jahresvergleich dargestellt. Zu sehen ist nicht nur ein Vergleich der Jahre 2012, 2013 und 2015, sondern auch zwischen den einzelnen KM, an denen die Proben genommen wurden.

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Gattung *Saprolegnia* spp. an den Salmoniden wurden Primer designt, die für *S. parasitica* spezifisch waren. Dabei handelt es sich um eine aggressive und weit verbreitete Art, die besonders häufig bei Salmoniden nachgewiesen werden kann. Insgesamt wurde eine Stichprobe der bereits isolierten Muksproben aus den unterschiedlichen Jahren gewählt, die zusätzlich auf *S. parasitica* getestet wurden (**Tab. 7**). Die PCR-Produkte wurden sequenziert und mit BLAST überprüft.

**Tab. 7:** Stichprobenumfang für *S. parasitica*. In der Tab. wird die Anzahl der Salmoniden dargestellt, die in den einzelnen Jahren auf *S. parasitica* getestet wurden.

Gesamtzahl	2012	2013	2015
N	109	96	69

### 3.1.2. Morphologische Untersuchungen: Darstellung der *in vitro*-Versuche

Der Befall mit *Saprolegnia* spp. bei den Salmoniden in der Wupper lässt sich möglicherweise durch einen nicht erkannten Eintrag von bereits infizierten Besatzfischen erklären, der durch eine präventive oder kurative Behandlung der Fische in der Aquazucht reduziert werden könnte. Daher wurden in den vorliegenden Untersuchungen zur Simulation phytotherapeutischer Anwendungen Kulturen von *S. ferax* mit Extrakten von *C. papaya* und *M. pruriens* inkubiert. Ziel der Versuche war es, festzustellen, ob der Einsatz von den o. a. phytotherapeutischen Extrakten zu einer Reduktion des Wachstums von *S. ferax* führen kann bzw. bei welcher Einwirkzeit eine Inhibition zu beobachten war. Die Inkubation mit Pflanzenextrakten auf Petrischalen ähnelt der phytotherapeutischen Behandlung von *Saprolegnia* spp. infizierter Fische in einem Tauchbad, das oft in der Aquazucht eingesetzt wird.

#### 3.1.2.1. Inkubation von *Saprolegnia ferax* mit Extrakten von *Carica papaya* und *Mucuna pruriens*

In den **Tab. 8, 9** und **10** wird die Inkubation von *S. ferax* mit einer 1 bzw. 2 % igen Lösung (w/v) der Extrakte von *C. papaya* und *M. pruriens* sowie der unterschiedlichen Wiederholungszahl der Behandlungen mit einer definierten Einwirkzeit (15 bis 60 min.) dargestellt. Bei den Versuchsreihen erfolgte eine Langzeitbeobachtung (max. 14 Tage), um zu überprüfen, ob das Wachstum des Myzels langfristig inhibiert werden konnte.

Folgende Beobachtungen konnten gemacht werden: Sowohl bei der Verwendung einer 1 % igen Lösung (w/v) wie auch bei einer 2 % igen Lösung (w/v), trat eine Inhibition des Myzels ein. Die Ergebnisse waren bei einer 1 % igen Lösung (w/v) zu ca. 50 % reproduzierbar, bei einer 2 % igen Lösung (w/v) traf dies sogar fast auf 75 % aller Ergebnisse zu.

**Tab. 8:** Inkubation von *S. ferax* mit *C. papaya*. In der Tab. werden die Anzahl der wiederholten Behandlungen sowie die unterschiedlichen Lösungen (w/v) dargestellt. Zusätzlich ist das Ergebnis nach 1-14 Tagen zu sehen.

Wirkstoff	Lösung % (w/v)	Zeit (min.)	Anwendung	1 T	2 T	7 T	14 T	G	R
P	1	15	1	--	0	0	+	✓	r
P	1	15	2	--	0	++	-	✗	nr
P	2	15	1	--	0	0	+	✗	nr
P	2	15	2	--	0	++	-	✓	r
P	1	30	1	--	0	0	+	✓	nr
P	1	30	2	--	0	+	0	✗	r
P	2	30	1	--	0	0	+	✗	r
P	2	30	2	--	0	+	0	✗	nr
P	1	45	1	--	0	+	+	✗	nr
P	1	45	2	--	0	0	0	✓	nr
P	2	45	1	--	0	+	+	✗	r
P	2	45	2	--	0	0	0	✗	nr
P	1	60	1	--	+	0	-	✗	r
P	1	60	2	--	0	++	0	✗	nr
P	2	60	1	--	+	0	-	✗	r
P	2	60	2	--	0	++	0	✗	r

#### Legende für die Tab. 8, 9 und 10

- ++ starke Zunahme des Myzels im Vergleich zum Vortag
- + leichte Zunahme des Myzels im Vergleich zum Vortag
- 0 kein Unterschied zum Vortag
- leichter Rückgang des Myzels im Vergleich zum Vortag
- starker Rückgang des Myzels im Vergleich zum Vortag
- G Gesamturteil
- R Reproduzierbarkeit
- ✓ erfolgsversprechend
- ✗ keine Empfehlung für *in vivo*-Versuche
- r reproduzierbar
- nr nicht reproduzierbar

**Tab. 9:** Inkubation von *S. ferax* mit *M. pruriens*. In der Tab. werden die Anzahl der wiederholten Behandlungen sowie die unterschiedlichen Lösungen (w/v) dargestellt. Zusätzlich ist das Ergebnis nach 1-14 Tagen zu sehen.

Wirkstoff	Lösung % (w/v)	Zeit (min.)	Anwendung	1 T	2 T	7 T	14 T	G	R
M	1	15	1	--	+	-	0	✗	r
M	1	15	2	--	0	0	0	✓	nr
M	2	15	1	--	+	-	0	✓	r
M	2	15	2	--	0	0	0	✓	r
M	1	30	1	--	0	0	0	✓	nr
M	1	30	2	--	0	+	0	✗	r
M	2	30	1	--	0	0	0	✓	r
M	2	30	2	--	0	+	0	✓	r
M	1	45	1	--	0	0	0	✓	nr
M	1	45	2	--	0	0	0	✓	r
M	2	45	1	--	0	0	0	✗	r
M	2	45	2	--	0	0	0	✓	nr
M	1	60	1	--	++	--	0	✗	r
M	1	60	2	--	0	0	0	✓	r
M	2	60	1	--	++	--	0	✗	r
M	2	60	2	--	0	0	0	✗	r

**Tab. 10:** Inkubation von *S. ferax* mit *C. papaya* und *M. pruriens*. In der Tab. werden die Anzahl der wiederholten Behandlungen sowie die unterschiedlichen Lösungen (w/v) dargestellt. Zusätzlich ist das Ergebnis nach 1-14 Tagen zu sehen.

Wirkstoff	Lösung % (w/v)	Zeit (min.)	Anwendung	1 T	2 T	7 T	14 T	G	R
M+P	1	15	1	--	+	0	0	✗	nr
M+P	1	15	2	--	0	+	0	✗	nr
M+P	2	15	1	--	+	0	0	✗	r
M+P	2	15	2	--	0	+	0	✗	nr
M+P	1	30	1	--	+	-	0	✗	r
M+P	1	30	2	--	0	0	0	✓	r
M+P	2	30	1	--	+	-	0	✓	r
M+P	2	30	2	--	0	0	0	✗	nr
M+P	1	45	1	--	0	+	0	✗	r
M+P	1	45	2	--	0	0	0	✓	r
M+P	2	45	1	--	0	+	0	✗	r
M+P	2	45	2	--	0	0	0	✗	r
M+P	1	60	1	--	++	0	0	✗	r
M+P	1	60	2	--	0	0	0	✓	nr
M+P	2	60	1	--	++	0	0	✗	nr
M+P	2	60	2	--	0	0	0	✗	nr

Bei einem Vergleich der eingesetzten Extrakte (Tab. 8, 9 und 10) konnte beobachtet werden, dass die meisten erfolgreichen Behandlungen bei einem Einsatz von *M. pruriens* zu erkennen waren. In diesen Fällen war jedoch immer bei einer kurzen Einwirkzeit von 15 oder 30 min.

eine 2 % ige Lösung (w/v) erforderlich, um das Myzel entweder komplett abzutöten oder das erneute Wachstum zu inhibieren. Ein Erfolg war schon bei einer 1 x Anwendung zu erkennen. Nur bei einer längeren Inkubationszeit von 45 oder 60 min. war eine 1 % ige Lösung (w/v) ausreichend. Zusätzlich fiel auf, dass bei der Behandlung mit *C. papaya* die besten Ergebnisse bei einer einmaligen Anwendung (1 x) und der kürzesten Einwirkzeit (15 min.) mit einer 1 % igen Lösung erzielt werden konnten. Bei einer kombinierten Inkubation mit den Extrakten von *M. pruriens* und *C. papaya* war bei der Verwendung einer 1 % igen Lösung immer eine mehrfache Anwendung erforderlich um eine Inhibition zu erreichen, während bei der Inkubation mit einer 2 % igen Lösung eine einfache Anwendung ausreichend war.

In **Tab. 11** werden zusammenfassend die Ergebnisse dargestellt, die das Wachstum des Myzels von *S. ferax* langfristig inhibieren konnten.

**Tab. 11:** Zusammenfassung der erfolgsversprechenden Inkubationen. Die Tab. zeigt, welche der eingesetzten Extrakte bei zukünftigen *in vivo*-Versuchen eingesetzt werden könnten. Zusätzlich wird die erforderliche Lösung sowie die notwendige Einwirkzeit und Wiederholung der Behandlung dargestellt.

Wirkstoff	Lösung % (w/v)	Zeit (min.)	Anwendung
<b>P</b>	1	15	1
<b>P</b>	2	15	2
<b>M</b>	2	15	1
<b>M</b>	2	15	2
<b>M</b>	2	30	1
<b>M</b>	2	30	2
<b>M</b>	1	45	2
<b>M</b>	1	60	2
<b>M+P</b>	1	30	2
<b>M+P</b>	2	30	1
<b>M+P</b>	1	45	2

#### Legende

P: *C. papaya*

M: *M. pruriens*

M+P: *M. pruriens*+*C. papaya*

## 3.2. Ökologische Untersuchungen

Ein weiteres Forschungsgebiet neben den molekularbiologischen Untersuchungen in Bezug auf *Saprolegnia* spp. stellten die ökologischen Untersuchungen dar. Dafür wurden die physikochemischen Parameter und die Schuppenproben ausgewertet und analysiert.

### 3.2.1. Darstellung der physikochemischen Parameter 2009 bis 2015

Im Folgenden werden die Auswertungen der Temperatur, des O<sub>2</sub>-Gehalts und des pH-Wertes in der Wupper von 2009 bis 2015 dargestellt. Ziel war es, zu überprüfen, ob in diesem Zeitraum eine Veränderung der Parameter beobachtet werden konnte. Ein besonderer Fokus lag auf der Entwicklung der Temperatur, da 2013 die Ausschaltung des Heizkraftwerkes in Barmen veranlasst wurde (**Kap. 1.1.2.**).

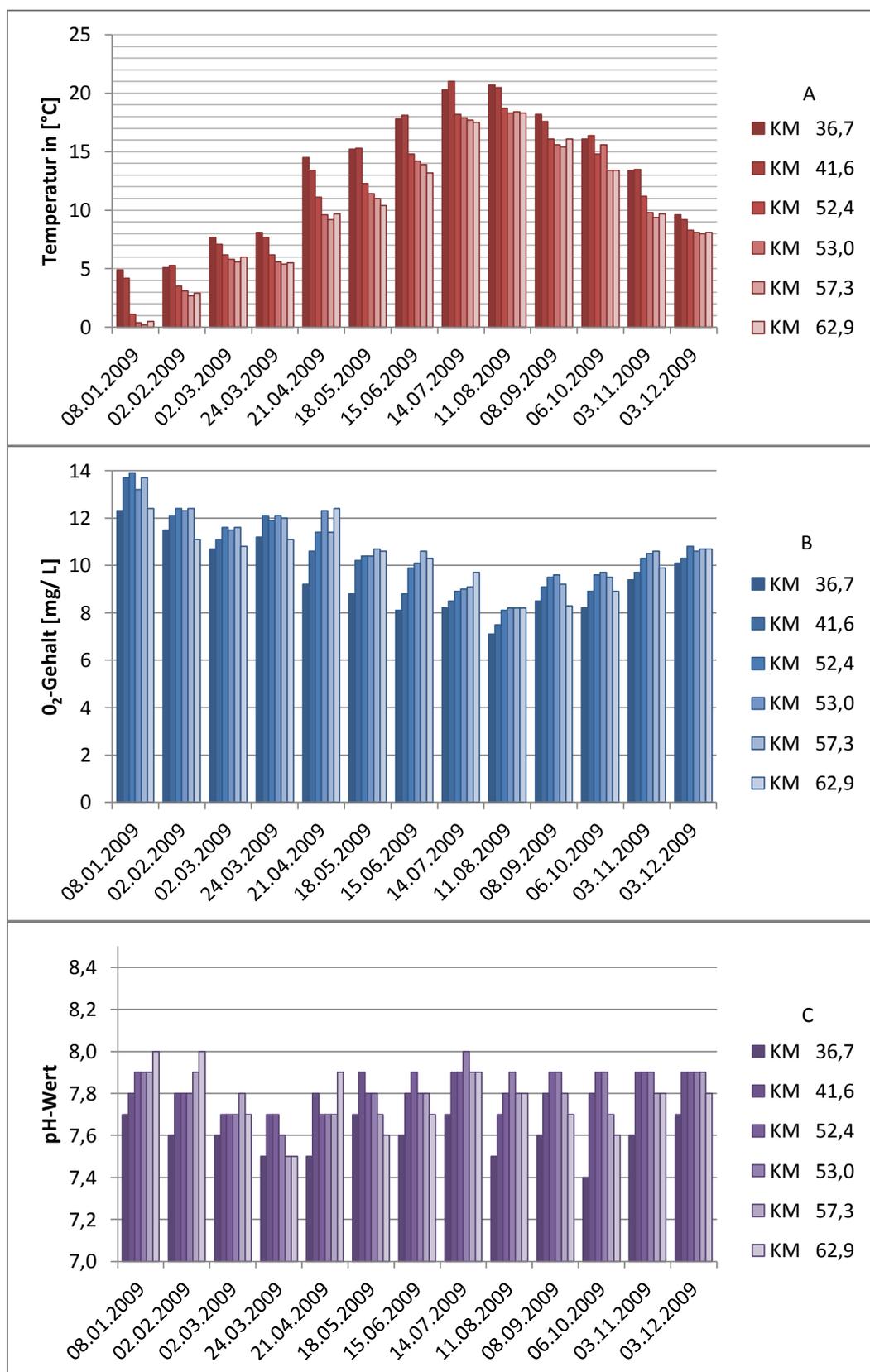
Die Abb. **31 A-C** bis **37 A-C** zeigen die physikochemische Parameter C°, O<sub>2</sub>-Gehalt und pH-Wert an den unterschiedlichen Probestellen (flussaufwärts) an verschiedenen Tagen im Jahresverlauf und an unterschiedlichen KM.

KM 62,9 und KM 57,3 befinden sich im Vorstadtbereich. Die dort gemessenen Parameter können ggf. durch die Kaltwassereinspeisung der Talsperre Beyenburg beeinflusst worden sein.

KM 53,0, KM 52,4 und KM 41,6 befinden sich im Innenstadtbereich und damit in unmittelbarer Nähe der Warmwassereinleitungen der Heizkraftwerke Barmen (KM 52,8) und Elberfeld (KM 46,0).

KM 36,7 und KM 41,6 liegen im Nachstadtbereich, in der Nähe der Kläranlage Buchenhofen (KM 40,4), die die Gewässergüte nachhaltig beeinflusst.

Eine Abweichung der Probestellen gab es in den Jahren 2014 (**Abb. 36 A-C**) und 2015 (**Abb. 37 A-C**): Zusätzlich zu den Probenstellen der Vorjahre wurden bei KM 46,6 im Innenstadtbereich Messungen durchgeführt. Ebenfalls fanden Messungen an KM 52,4 in beiden Jahren statt. Dasselbe gilt für KM 53,0, der 2014 und KM 53,1, der 2015 beprobt wurde. Im Vorstadtbereich wurden 2014 und 2015 Messungen an KM 57,5 durchgeführt.



**Abb. 31:** Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2009. Dargestellt werden folgende Parameter: A: Temperatur [°C], B: O<sub>2</sub>-Gehalt [mg/ L], C: pH-Wert. Die Messungen erfolgten an unterschiedlichen Tagen im Jahresverlauf sowie an unterschiedlichen KM im Flussverlauf und zwar an relevanten Stellen, wie z. B. in der Nähe der HKW bzw. der KA.

### Temperatur

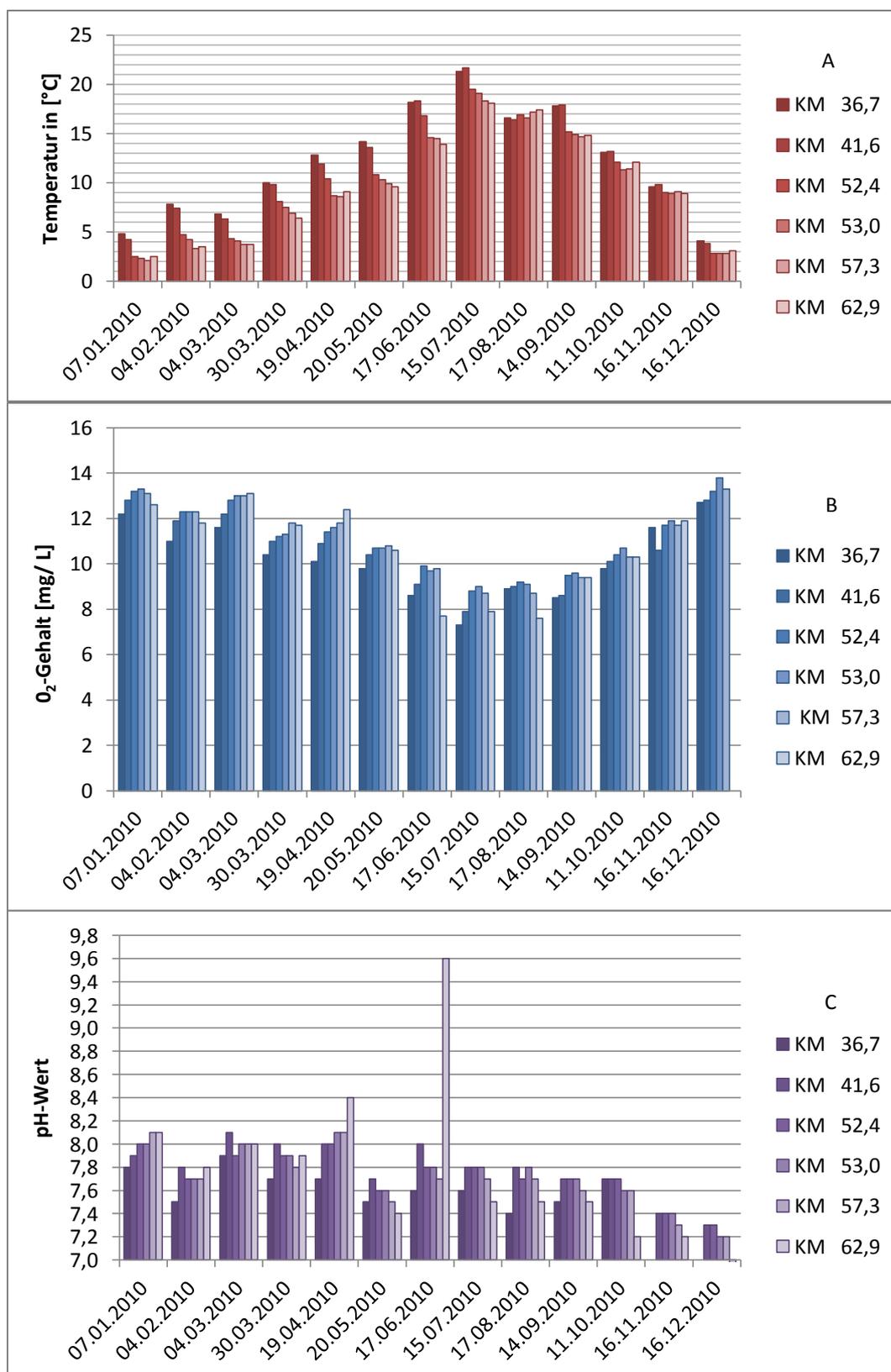
2009 konnten einige Temperaturnotfälle beobachtet werden (**Abb. 31 A**): Im Januar wurde eine sehr geringe Temperatur von ca. 0 °C im Vorstadtbereich (KM 62,9 und KM 57,3) gemessen, die die optimale Entwicklung der Larven beeinflusst. Die Maximaltemperatur für ein Salmonidengewässer von 21,5 °C wurde im Juli (14.07.2009 an KM 41,6) sowie im August (11.08.2009 an KM 36,7 und KM 41,6) für die Adulten erreicht. Zusätzlich wurde im November die Optimaltemperatur für laichbereite Tiere bzw. die Ova mit ca. 15 °C an den KM 36,7 und KM 41,6 überschritten.

### O<sub>2</sub>-Gehalt

Ein niedriger O<sub>2</sub>-Gehalt von 7 mg/ L (**Abb. 31 B**) konnte ausschließlich im August (11.08.2009) an KM 36,7 gemessen werden, der allerdings für ein Salmonidengewässer noch im akzeptablen Bereich lag. Ergänzend konnte festgestellt werden, dass der O<sub>2</sub>-Gehalt bei jeder Messung im Verlauf des Jahres an KM 36,7 im Nachstadtbereich am niedrigsten war. An allen übrigen Tagen wurden an jedem KM gewöhnliche Schwankungen eines Fließgewässers gesehen.

### pH-Wert

Bei den Messungen des pH-Wertes (**Abb. 31 C**) konnten zu keinem Zeitpunkt Auffälligkeiten beobachtet werden. Der pH-Wert schwankte zwischen 7,4 und 8,0 und befand sich im Idealbereich für die Salmoniden.



**Abb. 32:** Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2010. Dargestellt werden folgende Parameter: A: Temperatur [°C], B: O<sub>2</sub>-Gehalt [mg/ L], C: pH-Wert. Die Messungen erfolgten an unterschiedlichen Tagen im Jahresverlauf sowie an unterschiedlichen KM im Flussverlauf und zwar an relevanten Stellen, wie z. B. in der Nähe der HKW bzw. der KA.

### Temperatur

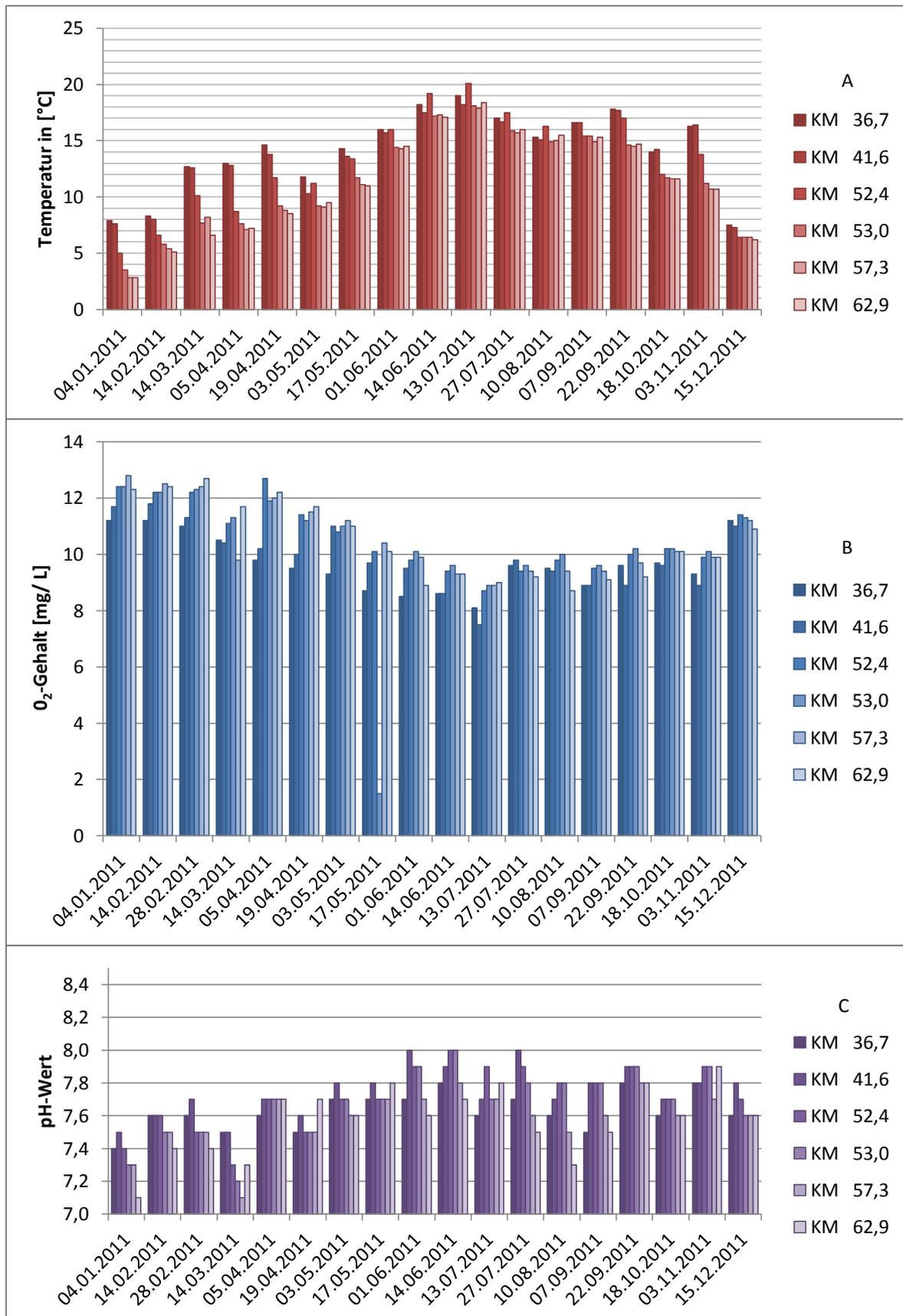
**Abb. 32 A** zeigt, dass 2010 sowohl im Sommer als auch im Winter die Idealtemperaturen an einzelnen Tagen in allen drei Stadtbereichen überschritten wurden. Wie 2009 (**Abb. 31 A**), wurde im Juli (15.07.2010) an KM 36,7 und KM 41,6 eine erhöhte Temperatur von 21,5 °C gemessen und damit der maximale Wert für ein Salmonidengewässer erreicht (Fischgewässerrichtlinie 2006). Besonders im Oktober (11.10.2010), zur Laichzeit von *S. trutta*, lagen die Temperaturen mit ca. 13 °C (KM 36,7 und KM 41,6) und 12 °C (KM 62,9) um 2 bzw. 3 °C über dem Toleranzbereich, so dass keine optimalen Bedingungen für das Laichverhalten gegeben waren. Im November (16.11.2010) lag die Temperatur an den KM 36,7 und KM 41,6 bei ca. 10 °C und damit im Maximalbereich.

### O<sub>2</sub>-Gehalt

Ausschließlich im Juli (15.07.2010) und August (17.08.2010) konnten niedrige O<sub>2</sub>-Werte gemessen werden (**Abb. 32 B**). Während ein niedriger O<sub>2</sub>-Gehalt im Juli im Nachstadtbereich (KM 36,7) gemessen werden konnte, war dies im August im Vorstadtbereich (KM 62,9) möglich. An keinem Tag lag der O<sub>2</sub>-Gehalt bei  $\leq 6$  mg/ L und war, bis auf die zwei Tagesmessungen, in dem für ein Salmonidengewässer vorgeschriebenen Optimalbereich (Fischgewässerrichtlinie 2006).

### pH-Wert

Im Juni (17.06.2010) lag die Messung bei ca. 9,5 im Vorstadtbereich (KM 62,9) (**Abb. 32 C**) und war damit für die Wupper relativ hoch. An allen anderen Tagen und Probestellen betrug der gemessene pH-Wert im Normbereich zwischen 7,0 und 8,0.



**Abb. 33:** Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2011. Dargestellt werden folgende Parameter: A: Temperatur [°C], B: O<sub>2</sub>-Gehalt [mg/ L], C: pH-Wert. Die Messungen erfolgten an unterschiedlichen Tagen im Jahresverlauf sowie an unterschiedlichen KM im Flussverlauf und zwar an relevanten Stellen, wie z. B. in der Nähe der HKW bzw. der KA.

### Temperatur

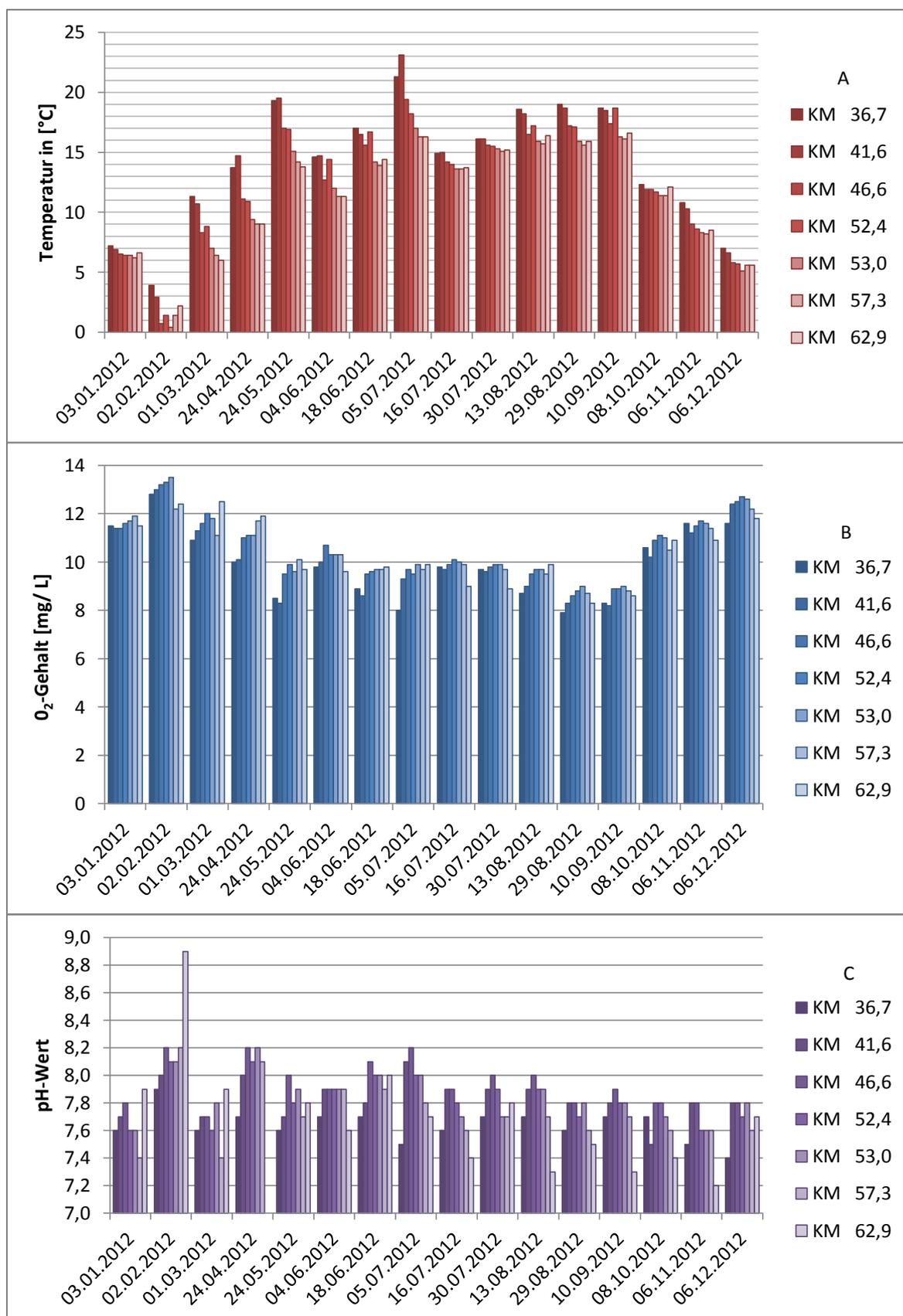
Auch 2011 (**Abb. 33 A**) konnten einige Temperaturnormabweichungen beobachtet werden: Im Juli (13.07.2011) wurden an KM 52,4 ca. 20 °C erreicht. 2011 konnte in den Wintermonaten eine ähnliche Temperatur an einzelnen Tagen wie 2010 (**Abb. 32 A**) gemessen werden. Die Temperatur war im Oktober und November an allen KM fast kontinuierlich warm: Das Maximum wurde am 03.11.2011 an den KM 36,7 und KM 41,6 mit ca. 16 °C erreicht, der deutlich über dem definierten Grenzwert von 10 °C lag.

### O<sub>2</sub>-Gehalt

2011 konnte im Mai (17.05.2011) an KM 53,0 ein sehr geringer Wert von ca. 1,5 mg/ L gemessen werden (**Abb. 33 B**). Im Juli (13.07.2011) wurde ebenfalls nur an einem Tag ein Wert von ca. 7 mg/ L an KM 41,6 ermittelt, während der O<sub>2</sub>-Gehalt an allen übrigen Tagen im vorgeschriebenen Bereich lag.

### pH-Wert

2011 konnten im Januar und März an zwei Tagen im Vorstadtbereich (04.01.2011 an KM 62,9 sowie am 14.03.2011 an KM 57,3) vergleichsweise niedrige pH-Werte von 7,1 und 7,2 gemessen werden (**Abb. 33 C**). Im Juni (01.06.2011) und Juli (27.07.2011) war der pH-Wert von 8,0 an KM 41,6 etwas höher.



**Abb. 34:** Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2012. Dargestellt werden folgende Parameter: A: Temperatur [°C], B: O<sub>2</sub>-Gehalt [mg/ L], C: pH-Wert. Die Messungen erfolgten an unterschiedlichen Tagen im Jahresverlauf sowie an unterschiedlichen KM im Flussverlauf und zwar an relevanten Stellen, wie z. B. in der Nähe der HKW bzw. der KA.

### Temperatur

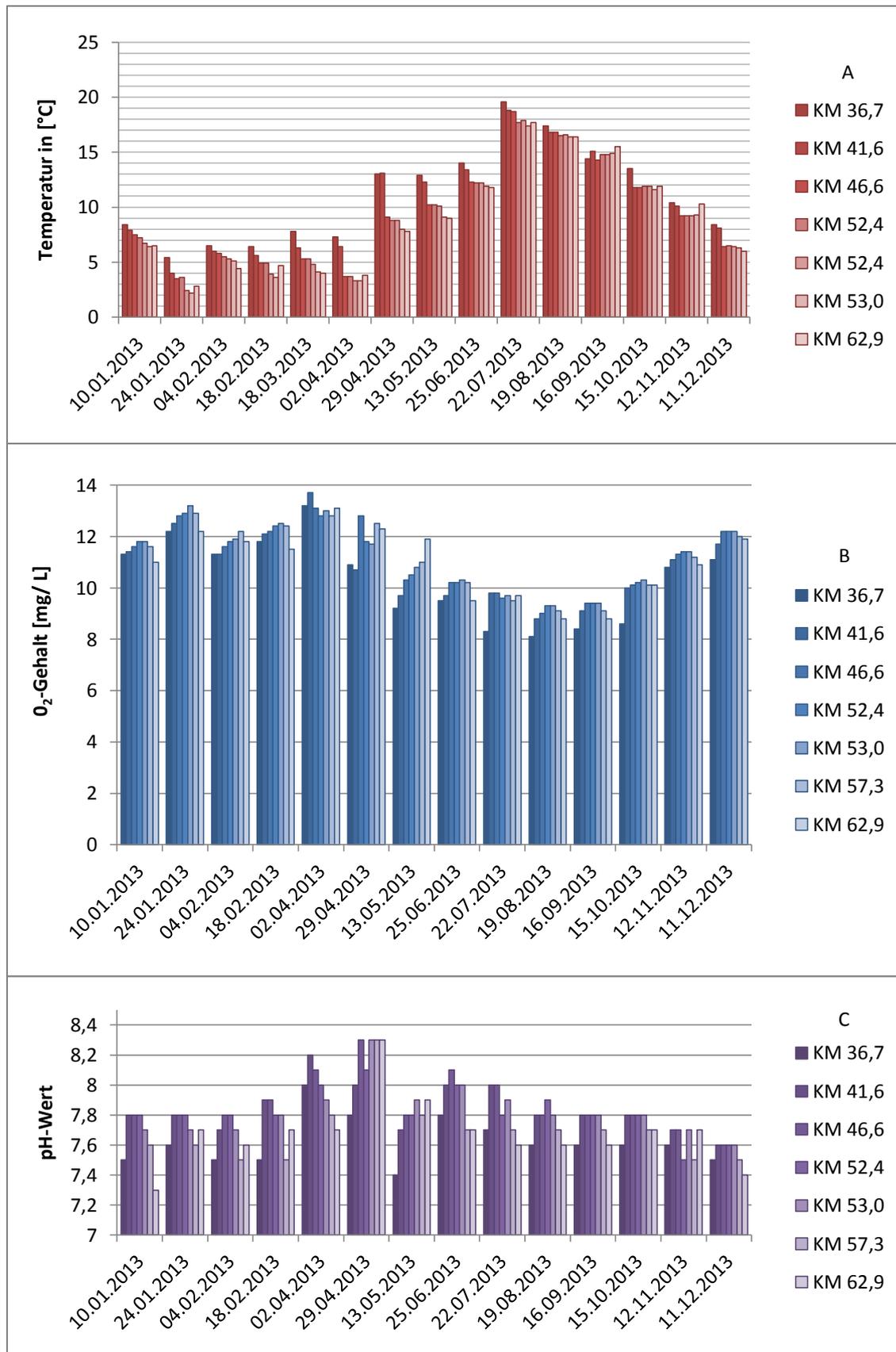
Im Vergleich zu den beiden vorherigen Jahren konnte 2012 (**Abb. 34 A**) nur an zwei Tagen eine Temperaturerhöhung im Jahresverlauf gemessen werden. Im Juli (05.07.2012) wurde die maximale Temperatur von 21,5 °C eines Salmonidengewässers mit ca. 23 °C an den KM 36,7 und KM 41,6 deutlich überschritten. Im Oktober (08.10.2012 an allen KM) waren die Temperaturen mit ca. 12 °C ebenfalls erhöht.

### O<sub>2</sub>-Gehalt

Bei den Messungen des O<sub>2</sub>-Gehalts (**Abb. 34 B**) fielen nur zwei Messungen von ca. 8 mg/ L im Juni (18.06.2012) und August (29.08.2012) auf. Beide Probestellen befinden sich im Nachstadtbereich an KM 36,7, hinter den Warmwassereinleitungen.

### pH-Wert

Es konnte während des Jahresverlaufes nur an einem Tag (02.02.2010) ein für die Wupper relativ hoher pH-Wert von ca. 8,8 im Vorstadtbereich an KM 62,9 gemessen werden (**Abb. 34 C**).



**Abb. 35:** Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2013. Dargestellt werden folgende Parameter: A: Temperatur [°C], B: O<sub>2</sub>-Gehalt [mg/ L], C: pH-Wert. Die Messungen erfolgten an unterschiedlichen Tagen im Jahresverlauf sowie an unterschiedlichen KM im Flussverlauf und zwar an relevanten Stellen, wie z. B. in der Nähe der HKW bzw. der KA (verändert nach Damrow 2014).

### Temperatur

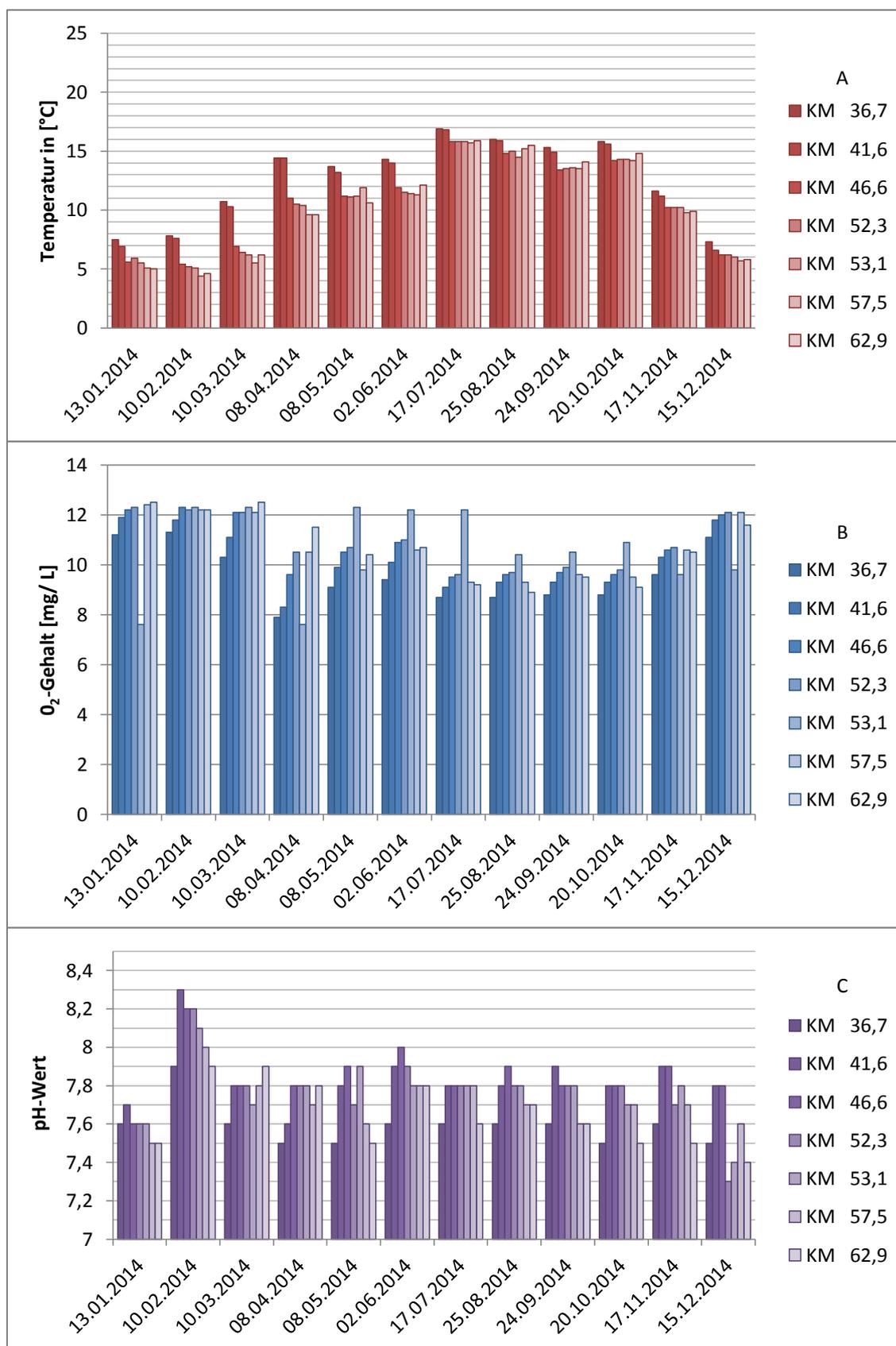
Die Messungen des Jahres 2013 (**Abb. 35 A**) ähnelten denen von 2012 (**Abb. 34 A**). Im Juli und August konnten kaum Auffälligkeiten festgestellt werden, allerdings im Oktober und November: Im Oktober lag die Temperatur zwischen 13-12 °C, flussabwärts betrachtet, im November hingegen an allen Probestellen zwischen 9-11 °C.

### O<sub>2</sub>-Gehalt

Im Juli (22.07.2013) und August (19.08.2013) konnten, wie bereits in den Jahren zuvor, an KM 36,7 O<sub>2</sub>-Werte von ca. 8 mg/ L gemessen werden (**Abb. 35 B**). Beide Werte lagen im gesetzlichen Rahmen (Fischgewässerrichtlinie 2006).

### pH-Wert

2013 konnten an drei Tagen im Jahresverlauf (10.01.2013, 13.05.2013, 11.12.2013) Werte von ca. 7,3 gemessen werden (**Abb. 35 C**). Allerdings waren jeweils im Januar und Dezember die Werte im Vorstadtbereich niedrig. Diese Messungen ähnelten den Monaten und Probestellen aus dem Jahr 2010 (**Abb. 32 C**).



**Abb. 36:** Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2014. Dargestellt werden folgende Parameter: A: Temperatur [°C], B: O<sub>2</sub>-Gehalt [mg/ L], C: pH-Wert. Die Messungen erfolgten an unterschiedlichen Tagen im Jahresverlauf sowie an unterschiedlichen KM im Flussverlauf und zwar an relevanten Stellen, wie z. B. in der Nähe der HKW bzw. der KA.

### Temperatur

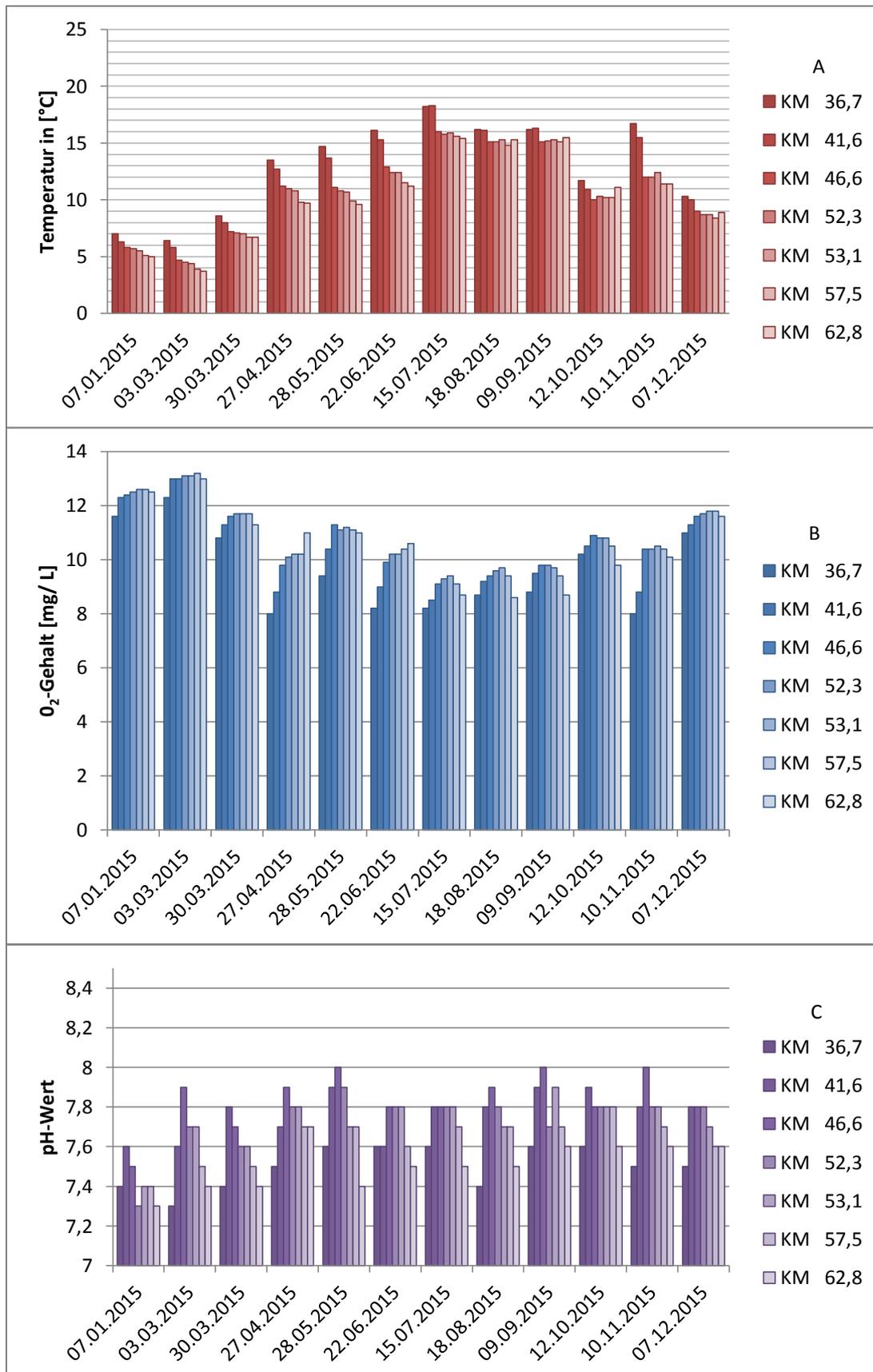
Wie bereits in den Vorjahren (2011 bis 2013) konnten 2014 (**Abb. 36 A**) im Sommer keine auffälligen Werte gemessen werden, die sich für die Adulten als kritisch erweisen. Allerdings war auch in diesem Jahr wieder der Monat Oktober problematisch, an dem tageweise die Temperatur zwischen 17-14 °C flussaufwärts lag (20.10.2014 an den KM 36,7 und KM 41,6). Sie war zwar im November um 4 °C gesunken, lag aber mit 12 °C immer noch über dem festgesetzten Richtwert zur Laichzeit (**Kap. 1.1.2**).

### O<sub>2</sub>-Gehalt

2014 (**Abb. 36 B**) konnte nur an zwei Tagen im Jahr (13.01.2014 und 08.04.2014) ein niedriger Wert von 7,5 mg/ L gemessen werden - und nicht, wie in den Vorjahren im Juli und August. Ein weiterer Unterschied bei den Messungen im Vergleich zu den Vorjahren konnte nicht nur in den Monaten gesehen werden, sondern auch bei den KM: Erstmals wurde ein niedriger Wert im Innenstadtbereich an KM 53,1 in der Nähe des Heizkraftwerks Barmen gemessen.

### pH-Wert

2014 (**Abb. 36 C**) konnte ausschließlich im Dezember ein niedriger pH-Wert von ca. 7,3 an KM 52,3 gemessen werden (15.12.2014). An allen anderen Tagen lagen die Messungen zwischen 7,4 und 7,8. Die Werte im Februar von ca. 8,3 lagen im Normbereich.



**Abb. 37:** Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2015. Dargestellt werden folgende Parameter: A: Temperatur [°C], B: O<sub>2</sub>-Gehalt [mg/ L], C: pH-Wert. Die Messungen erfolgten an unterschiedlichen Tagen im Jahresverlauf sowie an unterschiedlichen KM im Flussverlauf und zwar an relevanten Stellen, wie z. B. in der Nähe der HKW bzw. der KA.

### Temperatur

Auch 2015 (**Abb. 37 A**) konnten im Juli und August keine Überschreitungen des Grenzwertes beobachtet werden. Wie in den Jahren zuvor, wurden im Oktober und November stellenweise deutliche Temperaturerhöhungen im Nachstadtbereich gemessen. Während die Temperatur im Oktober am 12.10.15 an KM 36,7 bei 12 °C lag, konnte im November im Vergleich zu allen vorherigen Jahren die höchste Temperatur von ca. 17 °C an KM 36,7 gemessen werden. Die Temperatur nahm zwar flussaufwärts ab, lag aber an allen anderen Probestellen immer noch im erhöhten Bereich, z. B. in der Vorstadt (KM 62,8) bei ca. 11 °C.

### O<sub>2</sub>-Gehalt

2015 (**Abb. 37 B**) war das einzige Jahr, in dem an drei Tagen niedrige O<sub>2</sub>-Werte von 8 mg/ L gemessen werden konnten (27.04.2015, 22.06.2015 und 15.07.2015), die jeweils im Nachstadtbereich an KM 36,7 lagen, sich allerdings noch im Grenzbereich befanden (Fischgewässerrichtlinie 2006).

### pH-Wert

2015 konnte keine Auffälligkeit bei den Messungen des pH-Wertes beobachtet werden (**Abb. 37 C**). Die Werte lagen im gesamten Jahresverlauf an allen Probestellen kontinuierlich zwischen 7,3 und 8,0. Im Jahresvergleich lagen die pH-Werte im vorgeschriebenen Bereich (Fischgewässerrichtlinie 2006).

### 3.2.2. Auswertung der Schuppenproben

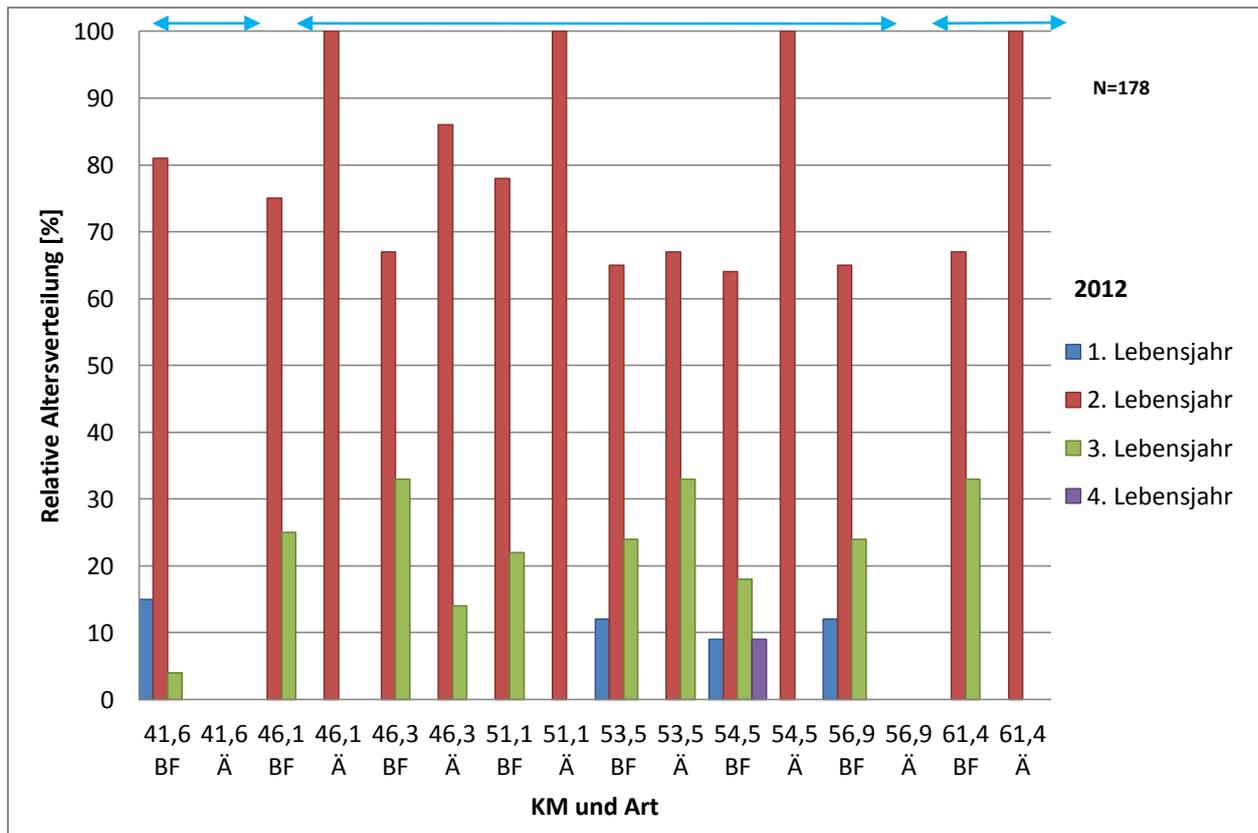
Im Folgenden werden zunächst die Altersbestimmungen von *S. trutta* und *T. thymallus* beschrieben. Anschließend erfolgt die Darstellung der Berechnung des Längenzuwachses in den einzelnen Jahren. Beide Aspekte wurden hinsichtlich der Auffälligkeiten in den unterschiedlichen Stadtbereichen untersucht. Insgesamt wurden die Schuppenproben von 397 Salmoniden analysiert und ausgewertet.

#### 3.2.2.1. Altersbestimmung der Salmoniden an den unterschiedlichen KM und im Jahresvergleich

Die **Abb. 38, 39** und **40** stellen das Alter von *S. trutta* und *T. thymallus* in den Jahren 2012, 2013 und 2015 dar. Neben dem Vergleich der beiden Arten erfolgte zusätzlich ein Vergleich der einzelnen KM in den einzelnen Stadtbereichen. Grundsätzlich handelte es sich um eine Stichprobe. Einziges Ausschlusskriterium war eine Körperlänge von  $\geq 20$  cm (**Kap. 2.3.2.**).

Auffällig war, dass 2012 (**Abb. 38**) in allen Stadtbereichen vorwiegend Fische beprobt wurden, die sich im zweiten Lebensjahr befanden. KM 54,5 war der einzige, an dem alle Altersklassen vertreten waren. Von *T. thymallus* konnten jeweils nur an insgesamt 3 Stellen (KM 61,4, KM 51,1 und KM 46,3) Proben genommen werden, die sich im zweiten Lebensjahr befanden. An KM 56,9 und KM 41,6 konnte *T. thymallus* nicht gefangen und beprobt werden. In

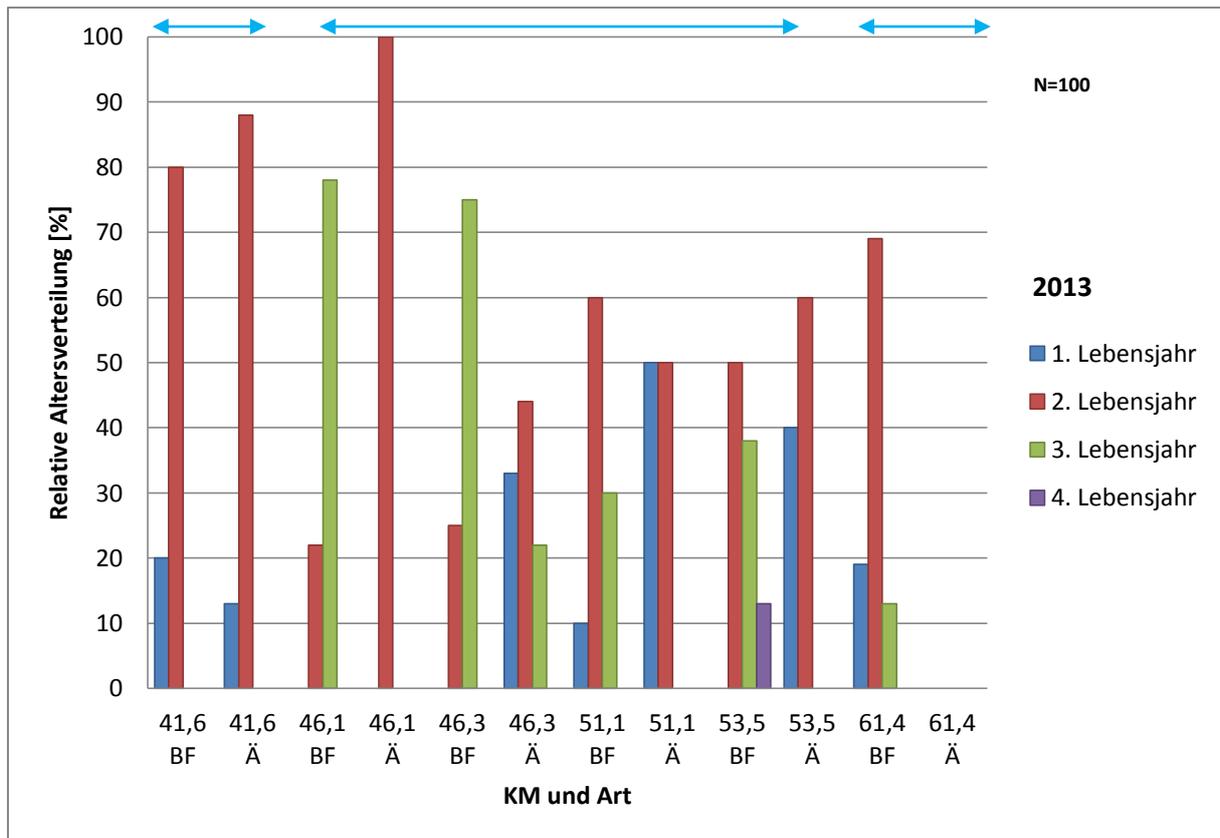
**Tab. 13** (s. Anhang) wird die Gesamtzahl der beprobten Salmoniden in Bezug auf die Altersverteilung im Jahr 2012 an den einzelnen KM dargestellt.



**Abb. 38:** Altersverteilung von *S. trutta* (BF) und *T. thymallus* (Ä). In der Abb. werden die erreichten Lebensjahre beim Zeitpunkt der Probenentnahme (2012) an den unterschiedlichen KM dargestellt.

←→ Kennzeichnung der Stadtbereiche (Nachstadt: KM 41,6 Innenstadt: KM 46,1 - KM 54,5 Vorstadt KM 56,9 - KM 61,4)

2013 (**Abb. 39**) wurden im Vergleich zu 2012 mehr Fische beprobt, die sich im ersten Lebensjahr befanden - und zwar in allen Stadtbereichen. Dabei war der Anteil von *T. thymallus* und *S. trutta* gleich verteilt. Bei den beprobten Fischen, die sich 2013 im dritten oder vierten Lebensjahr befanden, handelt es sich fast ausschließlich (bis auf eine Ausnahme an KM 46,3) um *S. trutta*. Im Innenstadtbereich war KM 53,5, die einzige Probenstelle, an der Salmoniden gefangen wurden, die sich im vierten Lebensjahr befanden. Sie liegt unterhalb KM 54,5, die 2012 die einzige Probenstellen war, an der Fische der gleichen Altersklasse gefangen wurden. 2013 wurden im Vergleich zu 2012 ausschließlich an einer einzigen Probenstelle (KM 46,1) *T. thymallus* gefangen, die sich im zweiten Lebensjahr befanden. In **Tab. 14** (s. Anhang) wird die Gesamtzahl der beprobten Salmoniden in Bezug auf die Altersverteilung im Jahr 2013 an den einzelnen KM dargestellt.



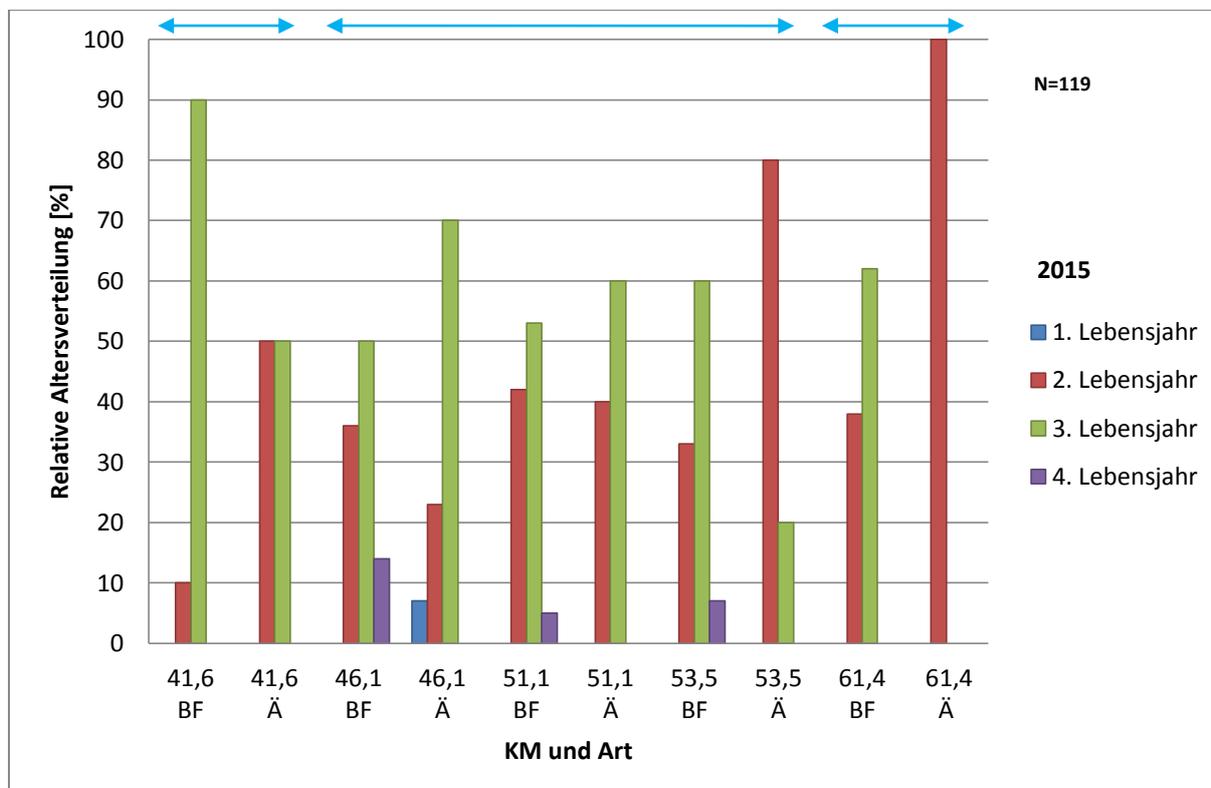
**Abb. 39:** Altersverteilung von *S. trutta* (BF) und *T. thymallus* (Ä). In der Abb. werden die erreichten Lebensjahre beim Zeitpunkt der Probenentnahme (2013) an den unterschiedlichen KM dargestellt (verändert nach Damrow 2014).

←→ Kennzeichnung der Stadtbereiche (Nachstadt: KM 41,6 Innenstadt: KM 46,1 - KM 53,5 Vorstadt KM 61,4)

In allen drei Jahren waren an den unterschiedlichen KM alle Altersklassen vertreten. Am auffälligsten war der Innenstadtbereich. Im Jahresvergleich wurden 2015 (Abb. 40) hier die meisten Fische beprobt, die sich im vierten Lebensjahr befanden (KM 46,1, KM 51,1 und KM 53,5). 2015 konnten, wie auch 2012, von *T. thymallus* im Vorstadtbereich an KM 61,4 ausschließlich Fische beprobt werden, die sich im zweiten Lebensjahr befanden. Wie bereits in den Vorjahren, befanden sich die meisten Fische im zweiten oder dritten Lebensjahr. Im Jahresvergleich waren Schwankungen im Nachstadtbereich an KM 41,6 zu beobachten: 2012 konnte keine *T. thymallus* gefangen und beprobt werden, *S. trutta* befand sich im dritten Lebensjahr. Während 2013 beide Salmonidenarten zum Zeitpunkt der Probenentnahme im ersten oder zweiten Lebensjahr waren, wurde 2015 für beide Arten das zweite oder dritte Lebensjahr berechnet.

Bei einem Vergleich zwischen dem Vor- und Nachstadtbereich fiel auf, dass im Vorstadtbereich *T. thymallus* entweder nicht gefangen und beprobt werden konnte (2013),

oder sich die Fische im zweiten Lebensjahr befanden (2012 und 2015). Im Vergleich zu den Vorjahren ließ sich besonders an KM 41,6 bei der Altersverteilung von *T. thymallus* eine Veränderung beobachten. Während 2012 (Abb. 38) keine Tiere gefangen werden konnten, wurde hingegen 2013 (Abb. 39) das Alter der beprobten Tiere auf max. 2 Jahre berechnet. 2015 (Abb. 40) konnten sogar Tiere beprobt werden, die sich im dritten Lebensjahr befanden. In Tab. 15 (s. Anhang) wird die Gesamtzahl der beprobten Salmoniden in Bezug auf die Altersverteilung im Jahr 2015 an den einzelnen KM dargestellt.



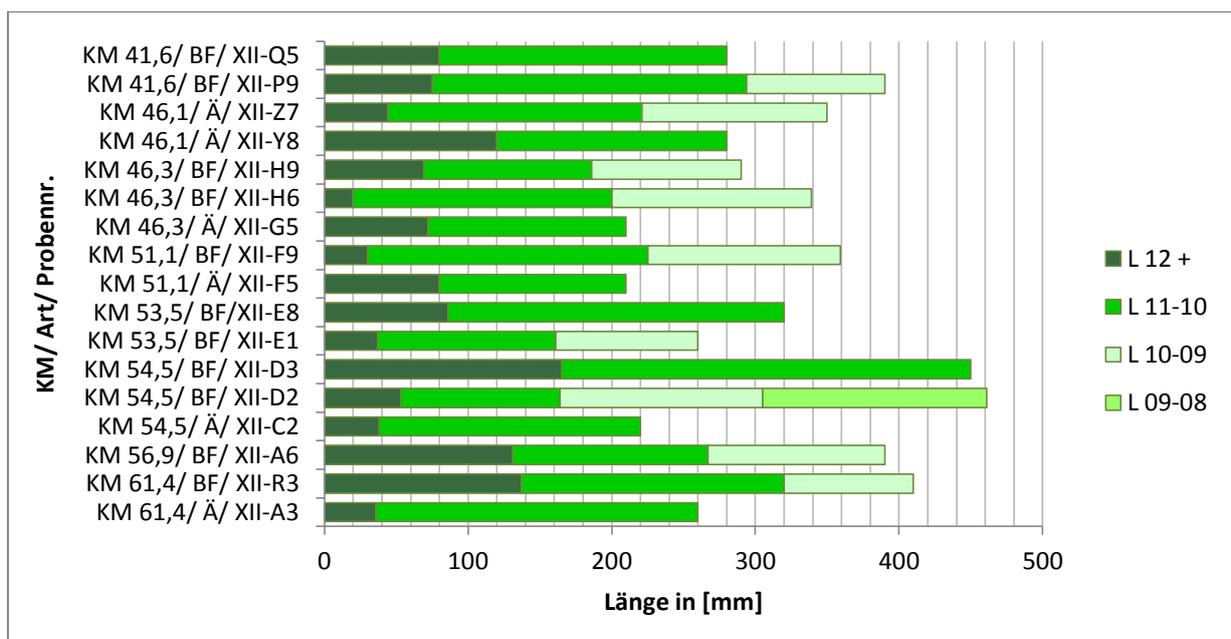
**Abb. 40:** Altersverteilung von *S. trutta* (BF) und *T. thymallus* (Ä). In der Abb. werden die erreichten Lebensjahre beim Zeitpunkt der Probenentnahme (2015) an den unterschiedlichen KM dargestellt.

←→ Kennzeichnung der Stadtbereiche (Nachstadt: KM 41,6 Innenstadt: KM 46,1 - KM 53,5 Vorstadt KM 61,4)

### 3.2.2.2. Berechnungen des Längenzuwachses an den unterschiedlichen KM

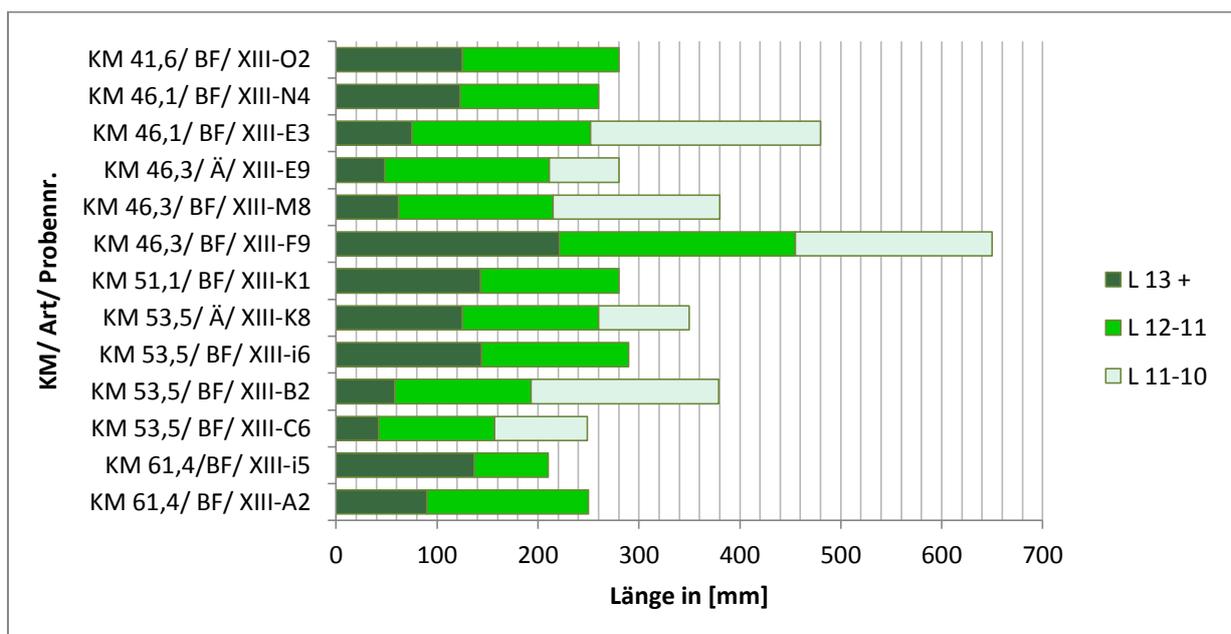
Die **Abb. 41, 42** und **43** stellen den Längenzuwachs ausgewählter Salmoniden in den einzelnen Jahren, basierend auf dem Rückrechnungsmodell von Dahl-Lea (**Kap. 2.5.2.2.**), dar. Die Bezeichnungen L12 +, L13 + und L15 + bedeuten, dass das Wachstum des Fangjahres noch nicht abgeschlossen ist. Die Längentrückrechnungen der Vorjahre basieren auf der jeweiligen Fanglänge des im Diagramm angegebenen Jahres.

Bei einem Vergleich des Längenzuwachses ausgewählter Salmoniden (**Abb. 41**), jeweils beginnend im Jahr 2012 und auf Rückrechnungen basierend bis zum Jahr 2008 (s. Anhang, **Tab. 20**), fiel auf, dass die ausgewählten Exemplare von 2010 bis 2011 an allen Probenstellen den größten Zuwachs hatten. Bis auf einige Ausnahmen konnte in den einzelnen Jahren über die Probestellen verteilt beobachtet werden, dass das Längenwachstum relativ gleichmäßig verlief. Bzgl. des Längenwachstums gab es folgende Ausnahmen: XII-F9 hatte, bei einem Vergleich zu den anderen Zuwächsen in L12 + einen sehr geringen Zuwachs, der allerdings für das Jahr noch nicht abgeschlossen war. Die gleiche Beobachtung konnte für XII-C2 und XII-A3 gemacht werden. Im Vergleich dazu hatte XII-D3 von allen exemplarisch ausgewählten Individuen den größten Zuwachs für diesen Zeitraum. Bei den zwei größten Fischen (XII-D3 und XII-D2) handelte es sich jeweils um *S. trutta*.



**Abb. 41:** Längenzuwachs ausgewählter Salmoniden. Dargestellt wird der Längenzuwachs von *S. trutta* und *T. thymallus* an den unterschiedlichen KM.

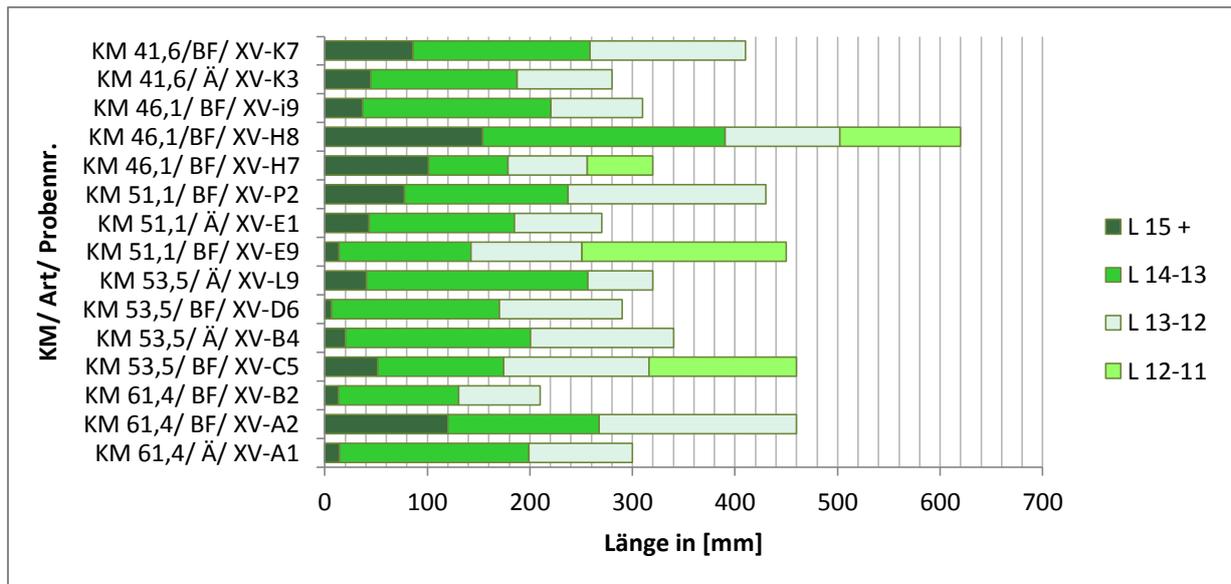
Bei einem Vergleich der berechneten Zuwächse ausgewählter Salmoniden (**Abb. 42**), jeweils beginnend im Jahr 2013 und auf Rückrechnungen basierend bis zum Jahr 2010 (s. Anhang, **Tab. 20**), fiel auf, dass der größte Längenzuwachs von 2011 bis 2012 stattgefunden hatte. Dies traf auf alle hier dargestellten Exemplare zu. Bis auf wenige Ausnahmen war der Zuwachs in den einzelnen Jahren gleichmäßig verteilt, auch an allen unterschiedlichen KM. Eine Ausnahme bildete XIII-F9. Hierbei handelte es sich um eine *S. trutta*, die in allen Jahren den gleichen Zuwachs gezeigt hat. Obwohl die Gesamtgröße bei ca. 650 mm lag, befand sie sich erst im dritten Lebensjahr. Zwei weitere Ausnahmen bildeten XIII-E9 und XIII-C6: Beide Fische hatten in L13 + einen relativ geringen Zuwachs von ca. 40 mm. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das Wachstum für dieses Jahr noch nicht abgeschlossen war.



**Abb. 42:** Längenzuwachs ausgewählter Salmoniden. Dargestellt wird der Längenzuwachs von *S. trutta* und *T. thymallus* an den unterschiedlichen KM

Die Zuwächse der in **Abb. 43** dargestellten Fische waren von 2014 bis 2013 am größten. Sie basieren auf Rückrechnungen, beginnend im Jahr 2015 bis zum Jahr 2011 (s. Anhang, **Tab. 20**). Die beobachtete Größe entspricht den Darstellungen aus den zuvor beschriebenen Abbildungen. Vergleichend konnte festgestellt werden, dass jeweils das Jahr vor dem „plus growth“ das am stärksten ausgeprägt war. Wie auch in den vorherigen Abbildungen sichtbar, kann auch in **Abb. 43** gesehen werden, dass die Zuwächse bis auf einige Ausnahmen in den unterschiedlichen Jahren und Probenstellen relativ konstant waren. Im Vergleich zu 2013 waren 2015 allgemein die kürzesten Zuwächse zu sehen. Die markantesten Beispiele stellen die Proben XV-D6 (ca. 5 mm) und XV-B2 (ca. 10 mm) in L15 + dar. Der größte Fisch (XV-

H8) hatte jedoch keine besonderen Merkmale bzgl. des Längenwachses in den unterschiedlichen Jahren.



**Abb. 43:** Längenzuwachs ausgewählter Salmoniden. Dargestellt wird der Längenzuwachs von *S. trutta* und *T. thymallus* an den unterschiedlichen KM.

## 4. Diskussion

### 4.1. Mukusproben als Nachweismöglichkeit von *Saprolegnia* spp. bei *Salmo trutta* und *Thymallus thymallus* an den unterschiedlichen KM im Jahresvergleich

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Veränderungen der Fischhaut haben dazu geführt, dass Mukusproben genommen und auf Pilzbefall getestet wurden. Die durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen zur Detektion des Pilzes zeigten einen Befall von ca. 52 % bei *S. trutta* und von ca. 43 % bei *T. thymallus*. Im folgenden Abschnitt werden Einflussfaktoren und Lebensbedingungen von Salmoniden anhand der erhobenen Ergebnisse diskutiert. Die von den Salmoniden entnommenen Mukusproben stammten ausschließlich von adulten Tieren. Es konnten nicht nur Unterschiede zwischen den einzelnen Arten, sondern auch in den einzelnen Jahren und bei den unterschiedlichen KM festgestellt werden.

#### *Saprolegnia* spp. und die saisonale Verbreitung in Abhängigkeit der Temperatur

Zur saisonalen Verbreitung von *Saprolegnia* spp. gibt es, allgemein betrachtet, zahlreiche widersprüchliche Untersuchungen. Die Saprolegniaceae zeigen in Abhängigkeit der Temperatur eine saisonale Periodizität in ihrem Auftreten und ihrer Abundanz (Hughes 1962). In der Wupper konnten ebenfalls im Jahresvergleich unterschiedliche Beobachtungen bzgl. des saisonalen Vorkommens gemacht werden:

2012 (**Abb. 24**) konnte im September ein höherer Befall bei den Salmoniden der Wupper festgestellt werden als im Mai. Die Temperatur lag zu diesem Zeitpunkt bei ca. 18 °C und war damit vergleichsweise hoch. Im Mai konnten an deutlich weniger Probenstellen infizierte Fische nachgewiesen werden, bei einer viel niedrigeren Temperatur flussaufwärts zwischen 9 °C (KM 15,6) und 4 °C (KM 56,9). Eine Erklärung für den akkumulierten Nachweis im Herbst 2012 könnte eine Verschiebung der Laichzeit bzw. eine Veränderung des Laichverhaltens sein. 2012 lagen die Temperaturen zwischen 23 °C im Juli und ca. 19 °C im September (**Abb. 34 A**). Dadurch könnte die Laichreife evtl. verfrüht eingesetzt haben. Zu dieser Zeit kommt es bei Salmoniden zu Veränderungen im endokrinen System (Pickering & Willoughby 1982): Bei Milchneuren werden dann viele Androgene nachgewiesen. Dazu zählt ein erhöhter Level steroider Hormone (z. B. Cortisol und gonadale Steroide). Doch auch morphologische Veränderungen der Epidermis (Pickering & Macey 1977), wie z. B. die Abnahme der mukus-sekretierenden Globet-Zellen (Cross & Willoughby 1989), können

nachgewiesen werden. Beim Kampf um Laichbetten entstehen oft kutane Verletzungen: Bei Rognern ist die schützende Mukusschicht durch Kämpfe um Laichbetten angegriffen. Diese physiologischen Veränderungen sind die Hauptursache für eine hohe Anfälligkeit gegenüber Infektionen (Willoughby 1994), da sie zu einer Schwächung des Immunsystems führen (Hamers & Schreckenbach 2002, Valladão et al. 2014).

Das Jahr 2013 (**Abb. 26**) hat eine komplette Veränderung bzgl. der saisonalen Verbreitung von *Saprolegnia* spp. gezeigt: Im April war an allen Probestellen ein wesentlich höherer Befall erkennbar als 2012. Allerdings waren die Temperaturbedingungen mit durchschnittlich ca. 5 °C im Flussverlauf ähnlich. Obwohl der September mit 15 °C eine vergleichbare Temperatur hatte wie 2012, konnte bei weniger Fischen ein Befall festgestellt werden.

Die Beobachtungen des Jahres 2013 setzten sich 2015 (**Abb. 28**) fort. Wie 2013 war der Befall im Mai am höchsten, allerdings konnte eine Abnahme der Temperatur flussaufwärts (15 °C bei KM 41,6 und 7 °C bei KM 61,4) gemessen werden. An beiden Probestellen waren ca. 50 % aller beprobten Fische mit *Saprolegnia* spp. befallen.

Die Saisonalität einiger Arten der Saprolegniaceae wurde als erstes von Coker (1923) beschrieben. Seitdem wird untersucht, welche ökologischen Bedingungen die Verteilung in natürlichen Systemen beeinflussen. Coker (1923) und Samutsevits (1931) konnten zeigen, dass die unterschiedlichen Arten im Frühjahr ihr Maximum erreichen. Im Unterschied dazu konnten Naumov (1954) und Dudka (1965) zeigen, dass eine maximale Verbreitung ebenfalls im späten Herbst stattfinden kann. Diese kontroversen Beobachtungen wurden auch in der Wupper gesehen. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass es bei der Häufigkeit des Befalls zu einer Verschiebung von Herbst zu Frühjahr gekommen war. Die Befischungen wurden im Frühjahr und Herbst durchgeführt, so dass ein Zusammenhang zwischen dem hohen Befall mit *Saprolegnia* spp. und der Jahreszeit hergestellt werden kann. Generell nimmt die Konzentration der Sporen im Jahresverlauf besonders im frühen Herbst und Frühling zu (Langvad 1994). Daher sind Salmoniden meist zu diesen Jahreszeiten von einer Infektion betroffen (Lehnen & Powell 1993). Allerdings schien der Befall bei den Wppersalmoniden nicht eindeutig im Zusammenhang mit der Temperatur zu stehen. Ein Nachweis war sowohl bei niedrigen Temperaturen von ca. 5 °C als auch bei relativ hohen Temperaturen von ca. 18 °C an den unterschiedlichen Probestellen möglich.

Diese Ergebnisse unterschieden sich eindeutig von vorherigen Untersuchungen: Kales (2001) konnte einen Zusammenhang zwischen tieferen Wassertemperaturen und dem Befall mit

*Saprolegnia* spp. zeigen. Besonders bei niedrigen Wassertemperaturen waren Verluste bei *S. trutta* durch *Saprolegnia* spp. zu verzeichnen (Shahbazian et al. 2010). Oláh & Farkas (1978) und Czczuga et al. (2005) konnten in ihren Untersuchungen ebenfalls zeigen, dass Saprolegniaceae niedrige Wassertemperaturen präferieren, die zwischen 0-5 °C liegen. Hohe Temperaturen beeinträchtigen normalerweise den Lebenszyklus von *Saprolegnia* spp., da die Anzahl der beweglichen Zoosporen, die wesentlich beim Parasitieren beteiligt sind und der Zeitraum der Produktion von Zoosporen, abnimmt (Kitancharoen et al. 1997).

### Der Nachweis von *Saprolegnia* spp. an den unterschiedlichen Probestellen

Sowohl im Vor- als auch im Nachstadtbereich konnte 2012 (**Abb. 23**) bei *T. thymallus* ein 100 % iger Befall mit *Saprolegnia* spp. beobachtet werden, der im Vorstadtbereich allerdings nur bei KM 56,9 zu sehen war. *T. thymallus* findet in diesen Bereichen keine geeigneten Lebensbedingungen. In keinem Jahr konnten Mukusproben von *T. thymallus* an KM 61,4 genommen werden oder die Fische waren nicht mit *Saprolegnia* spp. befallen. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich vermuten, dass sich die Lebensbedingungen in der Vorstadt für *T. thymallus* durch die Einspeisung von kaltem Tiefenwasser der Talsperre negativ verändert haben (**Kap. 1.1.2.**). Dieser Bereich befindet sich in der ausgewiesenen Äschenregion, so dass ein hohes Vorkommen nachweisbar sein müsste (**Abb. 1**). In der Nachstadt führen akkumulierte Einleitungen der Heizkraftwerke sowie des Klärwerks, eine, besonders in den Wintermonaten, erhöhte Temperatur nach sich. Hier war nicht nur bei *T. thymallus* ein 100 % iger Befall zu sehen, sondern auch bei *S. trutta*. Im Vergleich dazu war der Befall in der Innenstadt bei beiden Arten verhältnismäßig gering. An KM 41,6 konnte kein Befall bei *T. thymallus* beobachtet werden, da die Populationsdichte auf Grund der Einleitungen des Klärwerks gering und *T. thymallus* schwer zu beproben war.

2013 (**Abb. 25**) war der geringste Befall mit *Saprolegnia* spp. zu sehen, obwohl in allen Jahren der Stichprobenumfang ähnlich war. Wie bereits im Vorjahr, konnten auch 2013 die meisten Nachweise im Vor- und Nachstadtbereich erbracht werden. An allen Probenstellen überwog der Anteil der befallenen *S. trutta*. Von *T. thymallus* konnten vergleichsweise weniger Proben genommen werden bzw. waren die Tiere nicht infiziert.

Im Jahr 2015 (**Abb. 27**) wurde eine eindeutige Zunahme des Befalls mit *Saprolegnia* spp. bei beiden Arten beobachtet. Während der Befall bei *S. trutta* zwischen ca. 50 % - 90 %, verteilt an allen Probenstellen lag, waren ca. 15 % - 75 % aller *T. thymallus* infiziert. Besonders

auffällig war der höchste Nachweis im Innenstadtbereich an KM 53,5 bei *S. trutta*. Diese Probenstelle befindet sich in der Nähe des Heizkraftwerks Barmen, das allerdings seit Oktober 2013 nur sporadisch für wenige Wochen im Jahr in Betrieb genommen wird (**Abb. 35 bis 37**).

Die meisten Fische waren 2012 (**Abb. 23**) und 2015 (**Abb. 27**) mit *Saprolegnia* spp. infiziert, auch der Anteil von *T. thymallus* war hoch. Bezogen auf die relative Häufigkeit und die absolute Zahl ließ sich in diesen beiden Jahren kaum ein Unterschied bei dem Befall mit *Saprolegnia* spp. feststellen - trotz identischer Fangmethode und DNA-Extraktion, so dass diesbzgl. Fehler ausgeschlossen werden konnten.

#### *S. trutta* und *T. thymallus*: Vergleich der Arten in Bezug auf den Befall

In allen Jahren war *S. trutta* öfter befallen als *T. thymallus*. Ein Grund dafür könnte die größere und stabilere Population von *S. trutta* sein. Gleichzeitig kann vermutet werden, dass *S. trutta* gegenüber *Saprolegnia* spp. anfälliger ist als *T. thymallus*. Diese Hypothese gründet darauf, dass der Bestand von *S. trutta* regelmäßig durch Besatzmaßnahmen gestützt wird. Besatzfische können als Risikofaktoren betrachtet werden: Einerseits können sie *Saprolegnia* spp. ins Fließgewässer auf Grund einer zuvor nicht erkannten Infektion und daraus resultierend fehlender Behandlung, eintragen. Der Eintrag von Parasiten oder anderen Erkrankungen in ein Fließgewässer kann durch morphologisch unauffällige Besatzfische geschehen - ein Befall im Anfangsstadium kann meist nur auf molekularbiologischer Ebene erfolgen. Daher bleibt eine Infektion in diesem Stadium für die Züchter oftmals unerkannt.

Andererseits können sie durch die oftmals hohe Besatzdichte im Bruthaus ein geschwächtes Immunsystem besitzen, so dass sie die invadierenden Sporen im Fließgewässer nicht sezernieren können. Nach dem Besatz müssen sich die Fische an die Temperaturen sowie ggf. Schwankungen in der Wupper adaptieren. Zusätzlich erfolgte eine Umstellung auf das vorherrschende Nahrungsangebot - die Nahrungsaufnahme geschieht z. T. nicht mehr regelmäßig bzw. kann es zu einer veränderten Nahrungszusammensetzung, in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Organismen, kommen. Auf Grund der veränderten Lebensbedingungen für die ausgesetzten Tiere kann eine Infektion schneller ausbrechen. Im Vergleich zu *S. trutta* bildet *T. thymallus* eine autochthone Population, die gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen wahrscheinlich robuster ist.

### Pathogenität der unterschiedlichen Arten von *Saprolegnia* spp.

Nach dem erfolgreichen Nachweis von *Saprolegnia* spp. wurde eine Stichprobe von Salmoniden auf den Befall mit *S. parasitica* getestet (**Tab. 7**). In allen Fällen konnte diese Art nachgewiesen werden. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die Pathogenität der unterschiedlichen *Saprolegnia*-Arten in Abhängigkeit der untersuchten Fischart und der Region steht:

*S. parasitica* zählt zu den Oomyceten, die als Fischpathogen besonders schädlich sind und teilweise für den Rückgang natürlicher Salmonidenpopulationen oder anderer Süßwasserfische verantwortlich sind (van West 2006). Besonders bei den im Fließgewässer lebenden *S. trutta* verursacht *S. parasitica* Saprolegniosis (Hatai & Hoshiai 1992, Noga 1993, Diéguez-Uribeondo et al. 1996, Pottinger & Day 1999, Hussein et al. 2001, Fregenda-Grandes et al. 2007). Die Untersuchungen von Willoughby (1994) haben gezeigt, dass Salmoniden gegenüber *S. ferax* nicht vulnerabel sind, sondern *S. parasitica* als Fischpathogen agiert. Stueland et al. (2005) konnten diese Ergebnisse verifizieren, indem nachgewiesen werden konnte, dass *S. ferax* bei *S. salar* nicht zu den virulenten Stämmen zählt und keine oder nur geringe Sterblichkeiten auslöst. Die Untersuchungen von Sandoval-Sierra et al. (2014) konnten ebenfalls zeigen, dass vorwiegend *S. parasitica* die adulten Salmoniden parasitiert. Damit wird an bereits bestehende Ergebnisse angeknüpft, die ebenfalls gezeigt haben, dass *S. parasitica* als primäres Pathogen agiert (Tiffney 1939, Willoughby & Pickering, 1977, Willoughby 1978, Hatai & Hoshiai 1992, Noga 1993, Diéguez-Uribeondo et al. 1996, Pottinger & Day 1999, Hussein et al. 2001, Diéguez-Uribeondo et al. 2007, Fregeneda-Grandes et al. 2007, Songe et al. 2014).

Für den Nachweis der *Saprolegnia*-Arten sollte der Zeitraum der Probenentnahme berücksichtigt werden. Auf Grund ihres jahreszeitlichen Vorkommens kann angenommen werden, dass die Arten differente Temperaturanforderungen haben (Roberts 1963). Auch wenn bei ca. 75 % der Salmoniden *Saprolegnia* spp. nachgewiesen werden konnte, bedeutet dies nicht, dass es zu einer akuten Infektion kommt. Der Ausbruch einer Infektion ist an viele unterschiedliche prädisponierende Faktoren gekoppelt (Pickering & Willoughby 1982, Mayer 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde nicht untersucht, inwiefern die Fische besonders empfänglich für den Ausbruch der Saprolegniose sind.

### Der Befall von *Saprolegnia* spp. in der Wupper im Vergleich zu anderen Fließgewässern

Doch nicht nur in der Wupper konnten Saprolegniales nachgewiesen werden. Bei einem Vergleich mit anderen Flüssen wurde festgestellt, dass allgemein die Zahl der Infektionen in den unterschiedlichen Fließgewässern mit *Saprolegnia* spp. in den letzten Jahren zugenommen hat. Riethmüller & Langer (2005) untersuchten das saisonale Vorkommen von Arten der Saprolegniales im Ausee und in der Fulda unter Berücksichtigung fischpathogener Arten. Sie konnten insgesamt 9 Arten der Saprolegniales von lebenden Fischen isolieren. Ausschließlich *S. ferax* konnte im ganzjährig nachgewiesen werden. Zum saisonalen Vorkommen von *Saprolegnia* spp. liegen in Deutschland bislang nur wenige Untersuchungen vor. Es gibt keine ausreichenden Untersuchungen des fischparasitären Potentials der in Deutschland isolierten Arten der Saprolegniales. Voraussetzung für die Verpilzung von Fischen ist einerseits die Empfänglichkeit des Fisches gegenüber Pathogenen, andererseits das zeitgleiche Vorhandensein eines infektiösen Isolates der Oomyceten.

Doch nicht nur in Deutschland konnte *Saprolegnia* spp. nachgewiesen werden: Auch in der Schweiz wurden in verschiedenen Flusssystemen Infektionen mit dem Oomyceten beobachtet. Davon betroffen waren u. a. Doubs, Loue und Sorne. Seit dem Frühjahr 2015 konnten auch einige infizierte Fische im Rhein beobachtet werden: Nicht nur laichbereite Adulte waren infiziert, sondern auch Juvenile. Besonders betroffen waren *S. trutta* und *T. thymallus* - ihr Bestand war zeitweise massiv reduziert. Die Ausbrüche waren vor allen Dingen durch anthropogene Einflüsse bedingt (Schweizerischer Fischerei-Verband: Internetquelle 7).

#### **4.2. Wirksamkeit der Extrakte von *Carica papaya* und *Mucuna pruriens* bei *in vitro*-Versuchen**

Im folgenden Kapitel werden die traditionellen Behandlungsmöglichkeiten bei einem Befall mit *Saprolegnia* spp. mit phytotherapeutischen Ansätzen verglichen. Hierbei wird diskutiert, ob sich die Extrakte von *C. papaya* und *M. pruriens* nach Durchführung der *in vitro*-Versuche auch für weitere Experimente eignen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden, in Anlehnung an die Untersuchungen von Bruno & Wood (1999), folgende Ziele bei der Durchführung der *in vitro*-Versuche mit *C. papaya* und *M. pruriens* formuliert:

- die Einwirkzeit der Pflanzenextrakte sollte nicht mehr als 1 h betragen, um die Praktikabilität für die Aquazucht zu prüfen
- die eingesetzten Extrakte sollten zu reproduzierbaren Ergebnissen führen: Für eine effektive Anwendung sollten sie entweder komplett löslich sein oder eine homogene Suspension bilden
- das Phytotherapeutikum sollte das Myzel des Pilzes entweder komplett abtöten oder das Wachstum inhibieren
- es sollte bei der Anwendung sicher und bei der Therapie erfolgreich sein.

Erste erfolgreiche Tauchbadbehandlungen mit den Extrakten aus den Blättern von *M. pruriens* und den Samen von *C. papaya*, die eine signifikante Reduktion des Parasiten *Ichthyophthirius multifiliis*, Fouquet 1876 (Wimpertierchen), zur Folge hatten, konnten bei *Carassius auratus auratus*, Linnaeus 1758 (Goldfisch), beobachtet werden (Ekanem et al. 2004). Bei *I. multifiliis* handelt es sich um einen einzelligen Parasiten, der die Haut und die Kiemen bei Süßwasserfischen besiedelt und die Ichthyophthiriose ((Weiß)-Pünktchenkrankheit) verursacht (Schumacher 2011). Die Untersuchungen von Ekanem et al. (2004) haben gezeigt, dass die parasitär-induzierte Mortalität erheblich reduziert werden konnte: Somit haben sie das Potenzial zur effektiven Kontrolle von *I. multifiliis*.

Zur Behandlung der Saprolegniose bei Salmoniden mit Hilfe der Extrakte von *C. papaya* und *M. pruriens* liegen noch keine Ergebnisse aus älteren Studien vor. Die vorliegenden durchgeführten *in vitro*-Versuche ähneln einem Kurzzeitbad. Diese Methode wurde auf Grund der Praktikabilität (auch für zukünftige Anwendungen in der Aquazucht) gewählt. Ergänzend zu dem Kurzzeitbad wurde jedoch eine 14 tägige Langzeitbeobachtung durchgeführt, um zu gewährleisten, dass das Wachstum des Myzels auch über einen längeren Zeitraum hinweg inhibiert werden konnte und damit die Gefahr einer erneuten Infektion minimiert wird (**Tab. 8, 9 und 10**). Bei einem Kurzzeitbad werden die Fische über einen Zeitraum von wenigen Sekunden oder Minuten im Kescher in eine vorbereitete Badelösung getaucht. Alternativ werden die Ova bzw. Adulten in kurzer Zeit im Durchströmungsverfahren mit

einer höheren Konzentration des Medikaments in Kontakt gebracht. Bei einem Befall mit Schimmelpilzen sollte die Dauer des Kurzzeitbades ca. 15-30 min. betragen (Baur & Rapp 2003). Daher wurde bei den aktuell durchgeführten Versuchen eine Zeitspanne von 15-60 min. gewählt. Das Kurzzeitbad ist besonders bei der Forellenbrut geeignet und erfolgversprechend.

Für eine erfolgreiche Behandlung von *S. ferax* mit den Extrakten aus *C. papaya* und *M. pruriens* können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

Die gewählten Verdünnungsreihen der *in vitro*-Versuche wurden in Anlehnung an die Untersuchungen von Caruana et al. (2012) gewählt.

Sowohl bei der Anwendung von *C. papaya* als auch von *M. pruriens* konnten nach 15 min. Erfolge beobachtet werden. Im Vergleich zu *M. pruriens* hatte *C. papaya* den Vorteil, dass eine 1 % ige Lösung ausreichend war, um das Wachstum des Myzels zu inhibieren. Auch wenn bei einer Kombination beider Präparate Erfolge erzielt werden konnten, scheinen sie für weitere *in vivo*-Versuche eher ungeeignet zu sein. Einerseits ist nicht nur die Einwirkzeit länger, sondern eine Kombination der beiden Präparate ist ebenfalls kostenintensiv. Die Effizienz einer Behandlung mit *C. papaya* ist abhängig von der Quantität der verschiedenen Wirkstoffe während der Extraktion. Die Quantität ist in der Frucht, dem Latex, den Blättern und Wurzeln verschieden und variiert in Abhängigkeit der Extraktionsmethode, dem Alter der Pflanzen, der Kultursorte sowie dem Geschlecht des Baumes (de Boer et al. 2005, Wagh et al. 1993). Die Extrakte von *C. papaya* können wahrscheinlich bei einer oralen als auch einer dermalen Therapie bei Fischen eingesetzt werden (Emeruwa 1982).

Für weitere Versuche sollte die Praktikabilität im Bruthaus berücksichtigt werden. Daher scheinen die Behandlungen mit einer einmaligen Behandlung am geeignetsten zu sein. Auch wenn eine kurze Einwirkzeit wünschenswert ist, wäre eine längere Einwirkzeit bei einmaliger Wiederholung immer noch einer mehrfachen Anwendung vorzuziehen. Dies lässt sich folgendermaßen erklären: Eine einmalige Durchführung hat den Vorteil, dass die Fische weniger Stress ausgesetzt sind, der durch mehrmaliges Abkeschern an mehreren aufeinander folgenden Tagen entstehen würde. Nicht nur die Fische wären vermehrt einer Stresssituation ausgesetzt, sondern für den Anwender im Bruthaus wäre dies mit mehr Arbeit verbunden - und das bei gleicher Effizienz in Bezug auf die angestrebte Inhibition des Myzels oder den präventiven Einsatz.

#### **4.3. Bewertung der gemessenen physikochemischen Parameter Temperatur, Sauerstoffgehalt und pH-Wert: Vergleich der Jahre und unterschiedlichen Probestellen**

Bei einem Vergleich der gemessenen physikochemischen Parameter ist nach wie vor die Temperatur für die Salmoniden ein kritischer Parameter. Seit der Einführung des dynamischen Temperaturmanagements konnte zwar festgestellt werden, dass sich die Temperaturen, besonders in den Sommermonaten verändert haben und zu dieser Zeit die Richtwerte für ein Salmonidengewässer eingehalten werden. Allerdings wird die Temperatur nach wie vor im Oktober und November überschritten. Dies wirkt sich einerseits auf die Reproduzierbarkeit der Adulten aus, andererseits auf die Entwicklung der Ova.

Daher werden im Folgenden die in der Wupper erhobenen physikochemischen Parameter der Jahre 2009 bis 2015 miteinander verglichen. Der Fokus liegt einerseits auf der allgemeinen Entwicklung im Jahresvergleich, andererseits auf der Entwicklung an den unterschiedlichen KM im Flussverlauf. Seit der Forderung der WRRL (2000), den guten Zustand eines Gewässers wieder herzustellen, wird in der Wupper der Fokus auf die Optimierung der Temperaturverhältnisse gerichtet. Um einen natürlichen Salmonidenbestand zu etablieren, muss die Wasserqualität, die den Ansprüchen der heimischen Fischarten in allen Lebensphasen gerecht wird, gewährleistet sein (Schmidt 2004).

#### 4.3.1. Der Einfluss der Temperatur auf die Biozönose und die Veränderungen in der Wupper

Kommt es in einem Fließgewässer zur Überschreitung der Richtwerte, ist meist die gesamte Population der Salmoniden betroffen (Garside 1973). In der Wupper zählen neben *S. trutta* auch die Populationen von *T. thymallus*, *S. salar* sowie *S. trutta trutta*, Linnaeus 1758 (Meerforelle), dazu.

In Bezug auf die Entwicklung der Temperatur in den Jahren 2009 (Abb. 31 A) bis 2015 (Abb. 37 A) konnten in der Wupper folgende Beobachtungen gemacht werden:

2009 (Abb. 31 A) und 2010 (Abb. 32 A) wurden im Jahresverlauf erhöhte Werte gemessen, die sich negativ auf alle Stadien der Salmoniden auswirken. Während 2009 vorwiegend der Nachstadtbereich von Temperaturerhöhungen betroffen war, konnten 2010 in allen Stadtbereichen Grenzwertüberschreitungen gemessen werden. Anders verhielt sich die Situation 2011 (Abb. 33 A): In diesem Jahr konnten nur im Oktober und November Temperaturerhöhungen gemessen werden, die das Laichverhalten der Adulten bzw. die Entwicklung der Ova beeinflusst. An diesen Trend schlossen sich die Jahre 2012 (Abb. 34 A) bis 2015 (Abb. 37 A) an, in denen ebenfalls vorwiegend im Oktober und November erhöhte Werte gemessen wurden. Eine Ausnahme in diesem Zeitraum bildete der gemessene Tageswert von 23 °C im Sommer 2013 (Abb. 35 A).

Doch nicht nur bei den unterschiedlichen Arten, sondern auch bei den Lebensstadien der Salmoniden existieren große Unterschiede bzgl. der Toleranz für Temperaturschwankungen und Habitatspräferenzen: Für die Wupper wurde für die Ova eine optimale Temperatur zwischen 4-12 °C definiert. Auch der Zeitpunkt der Reproduktion findet in einem sehr limitierten Rahmen statt (EIFAC 1969, Elliott & Elliott 2010). Der Toleranzbereich für *S. trutta* und *T. thymallus* in der Wupper wurde zwischen 1-10 °C definiert (Abb. 2). Allerdings konnten in bereits durchgeführten Versuchen z. T. sehr divergierende Grenzwerte für jedes Stadium sowie die unterschiedlichen Fischarten festgestellt werden (Tab. 12):

**Tab. 12:** Vergleich der Temperaturgrenzwerte bei *S. trutta* und *T. thymallus*. In der Tab. werden die optimalen Temperaturen sowie die Grenzwerte für die Salmoniden in den unterschiedlichen Stadien dargestellt.

Fischart	Stadium	Optimal °C	Grenzwert °C/ Mortalität	Autor
<i>S. trutta</i>	Ova		0-13	Elliott 1981
		4-6		Müller 1997
		7	12-13	Jungwirth & Winkler 1984
	Adulte	14-17	25	Müller 1997
		4-19	0-4 bzw. 19-30	Elliott 1981
	Reproduktion	1-10		Elliott 1981
		6		Alabaster & Lloyd 1980
		7-13		Bjornin & Reiser 1991
<i>T. thymallus</i>	Ova	9	6-13	Arrignon 1998
			$\geq 0$ bzw. $\leq 14$	Elliott 1981
		7-14	1-15	Alabaster & Lloyd 1980
		6 und 14	16	Jungwirth & Winkler 1984
	Adulte	15-17		Müller 1997
		4-18	18-24	Elliott 1981
		18	25	Northcote 1995
	Reproduktion	6-10		Elliott 1981, Alabaster & Lloyd 1980

Allgemein bedeutet dies für die Salmonidenpopulation in der Wupper:

Bei einer Temperaturhöhung, die an einzelnen Tagen gemessen werden konnte, können sich die Salmoniden wahrscheinlich an die Situation adaptieren. Einerseits sind die Kiemen für den Wärmeaustausch zuständig, können aber mit ca. 10-30 % nur verhältnismäßig wenig regulieren. Daher erfolgt der restliche Wärmeaustausch über den Körper. Fische haben darüber keine aktive Kontrolle, so dass die Körpertemperatur in Abhängigkeit zur Außentemperatur steht. Cypriniden sind die tolerantesten, Salmoniden die am wenigsten tolerantesten Fische (Elliott & Elliott 2010).

Das Temperaturmodell von Elliott (1981) formuliert das Erreichen eines oberen und unteren kritischen Grenzwertes. Der obere kritische Grenzwert liegt zwischen 19-30 °C, der untere zwischen 0-4 °C. Innerhalb dieser Grenzbereiche wird thermaler Stress durch das Verhalten und die Verteilung der Fische deutlich. Auch wenn diese definierten Grenzwerte mit tageweise 23 °C bzw. 0 °C in den einzelnen Jahren z. T. in der Wupper erreicht wurden, ist fraglich, ob sich diese Messungen nachhaltig negativ auf die Population der einzelnen Fischarten auswirken. Es kann vermutet werden, dass sich eine tageszeitliche Schwankung, auch wenn sie um bis zu 7 °C vom Temperaturoptimum abweicht, nicht langfristig negativ auf die Salmonidenpopulation auswirkt. Zusätzlich handelt es sich bei den erhöhten Messungen um Tageswerte an den einzelnen Probestellen. Daher können die Fische den kurzfristigen Schwankungen ausweichen und in kühlere Areale migrieren (**Kap. 1.1.1.1.**).

Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Probestellen konnte beobachtet werden, dass KM 36,7 und KM 41,6 in der Nachstadt in allen Jahren, besonders im Oktober und November, nach wie vor im kritischen Bereich lagen. Die Akkumulation der Warmwassereinleitungen der beiden Heizkraftwerke Elberfeld und Barmen sowie die des Klärwerks Buchenhofen können noch unterhalb des Stadtgebietes nachgewiesen werden (Bürgel et al. 2005). Obwohl das Heizkraftwerk Barmen seit April 2013 nicht mehr kontinuierlich genutzt wird und die Wärmeeinleitungen des Heizkraftwerkes Elberfeld im gesetzlichen Rahmen liegen, werden die optimalen Temperaturen stellenweise immer noch überschritten. Allerdings war die Erwärmung seit 2013 nicht mehr in den Sommermonaten Juli und August zu messen, sondern im Oktober und November (**Kap. 3.2.1.**). Es stellt sich nicht nur die Frage, ob die Laichbereitschaft der Salmoniden beeinträchtigt wird, sondern auch, ob sich die Ova ohne Schäden entwickeln können. Daher hat die Erhöhung der Wassertemperatur in den Wintermonaten im Vergleich zu den Sommermonaten fatalere Auswirkungen auf das aquatische Ökosystem (Caissie 2006).

#### **4.3.2. Der Sauerstoffgehalt in der Wupper**

Für die Wupper konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

Bei einem Vergleich der O<sub>2</sub>-Messungen von 2009 (**Abb. 31 B**) bis 2015 (**Abb. 37 B**) wurde festgestellt, dass der O<sub>2</sub>-Gehalt, insgesamt betrachtet, nur an wenigen Tagen einen relativ niedrigen Wert von 8 mg/ L aufwies (**Kap. 3.2.1.**). Besonders betroffen davon war KM 36,7, der sich nach den Einleitungen der Heizkraftwerke und des Klärwerks befindet. Die meisten

niedrigen gemessenen Werte zeigten sich im Juni, Juli und August. Möglicherweise handelte sich bei dem sehr niedrigen Wert von 1,5 mg/ L am 17.05.2011 (**Abb. 33 B**) um einen Messfehler. Der O<sub>2</sub>-Anteil lag an allen gemessenen Tagen und Probestellen in dem Bereich, den Salmoniden für optimale Lebensbedingungen in allen Entwicklungsstadien benötigen. Damit wurden die gesetzlichen Vorgaben eingehalten (Fischgewässerrichtlinie 2006).

Sowohl die Einleitung von Kühlwasser (Heizkraftwerk Elberfeld und Heizkraftwerk Barmen) als auch die Einleitung des Klärwerks Buchenhofen zählen zu Risikofaktoren, die zu einer Veränderung des Gewässers (besonders an diesen Stellen) führen können. Kläranlagen tragen kontinuierlich O<sub>2</sub>-zehrungsfähige Stoffe ins Gewässer und damit ins Interstitial ein. Die Folge sind saprobielle und nitrifikante O<sub>2</sub>-Zehrung, die sich im Interstitial durch das Absenken der O<sub>2</sub>-Konzentration auf die immobilen Entwicklungsstadien der Salmoniden negativ auswirken (MUNLV 2006, Schmidt 2004). Die O<sub>2</sub>-Konzentrationen in einem Fließgewässer haben Einfluss auf die Salmonidenbestände: Niedrige O<sub>2</sub>-Konzentrationen können den Reproduktionserfolg erheblich beeinträchtigen, in dem die Emergenz verzögert wird und die Körpergröße oder die Fitness der Larven verringert ist (Chapman 1988). Über die Auswirkungen unterschiedlich langer, episodischer Unterschreitungen dieser Grenzwerte liegen derzeit keine Untersuchungen vor. Allerdings kann vermutet werden, dass auch kurzfristige Unterschreitungen der kritischen Grenzwerte zu massiven Entwicklungsstörungen bei Fischen führen (MUNLV 2006). Wie bei veränderten Temperaturen, können Fische auch bei einem niedrigen O<sub>2</sub>-Gehalt in andere Areale des Gewässers migrieren, um subletale und letale Schädigungen zu vermeiden (MUNLV 2006).

#### **4.3.3. Bewertung der gemessenen pH-Werte in der Wupper**

Bei einem Vergleich des pH-Wertes in der Wupper von 2009 (**Abb. 31 C**) bis 2015 (**Abb. 37 C**) lagen die Werte meist zwischen 7,0 und 8,0 und befanden sich im Rahmen der gesetzlichen Vorgaben (Fischgewässerrichtlinie 2006). Daher wurde die Biozönose nicht beeinflusst.

#### 4.4. Auswertungen der Schuppenproben: Alter und Längenwachstum der Salmoniden im Verlauf der Wupper

Besonders interessant ist die Entwicklung der Altersverteilung im Jahresvergleich bei den Fischen, die sich im vierten Lebensjahr befanden (**Abb. 38, 39** und **40**): In allen drei Jahren wurden die ältesten Fische zwischen den Einleitungen der beiden Heizkraftwerken gefangen - und dass, obwohl z. T. erhöhte Temperaturen gemessen wurden (**Abb. 34 A, 35 A, 36 A, 37 A**). Die älteste *T. thymallus*, die sich im dritten Lebensjahr befand (2013, **Abb. 39**), wurde in unmittelbarer Nähe des Heizkraftwerkes Elberfeld gefangen.

Generell lassen sich zur Altersverteilung von *T. thymallus* folgende Aussagen machen:

Die kontinuierliche Einspeisung von kaltem Tiefenwasser des Beyenburger Talsperre führt zu einer tieferen Temperatur (KM 61,4) (**Kap. 3.1.**), auf die besonders *T. thymallus* sehr sensitiv reagieren und könnte den fehlenden Nachweis 2013 (**Abb. 39**) erklären. Dennoch konnte bei *T. thymallus* eine positive Entwicklung im Jahresvergleich an KM 41,6 festgestellt werden. Während 2012 noch keine Tiere gefangen und beprobt werden konnten, waren die Tiere 2015 an dieser Probenstelle bereits im dritten Lebensjahr. Eine mögliche Erklärung für die veränderte Population sind die in den Jahren zuvor durchgeführten Renaturierungsmaßnahmen. Grundlage dafür war das ökologische Maßnahmenprogramm der Stadt Wuppertal, dessen Inhalt eine naturnahe Gestaltung des Gewässers ist. Ziel der Umgestaltung war die Erhöhung der Strukturvielfalt am und im Gewässer. Es sollten nicht nur vorhandene Strukturen verbessert, sondern auch neue Bereiche für eine eigendynamische Entwicklung initiiert werden. In die Wupper sollen kleine Geröllwälle sowie große Belebungssteine eingetragen und Inselbildungen geschaffen werden. Durch das Einbringen von Belebungssteinen entstehen unterschiedliche Strömungen, die das Wasser mit O<sub>2</sub> anreichern. Für Fische werden zusätzlich Ruhe- und Rückzugsbereiche angelegt (Internetquelle 10).

Generell können zu der Altersverteilung der Salmoniden in den Jahren 2012, 2013 und 2015 folgende Aussagen gemacht werden:

Alle beprobten Fische befanden sich im Jahresvergleich bei der Entnahme im maximal vierten Lebensjahr. Dafür lassen sich folgende Erklärungen finden:

Ein Grund dafür könnten die veränderten physikochemischen Parameter sein: *T. thymallus* zählt zu den besonders sensiblen Organismen und wird als Gewässergüteanzeiger bezeichnet. Auch wenn sich die physikochemischen Parameter in den letzten Jahren positiv verändert haben, kam es immer noch zu Grenzwertüberschreitungen, besonders in den Monaten Oktober und November (**Abb. 34 A, 35 A, 36 A, 37 A**), zur Laichzeit von *S. trutta*.

Ein weiterer Grund könnte die Methode der Altersbestimmung an Hand von Schuppenproben sein: Sie ist sehr schwierig und bedarf großer Erfahrung, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. In der Vergangenheit kam es z. T. zu unterschiedlichen Interpretationen, so dass Abweichungen auftraten. Diese Problematik tritt besonders dann auf, wenn neue Mitarbeiter ohne längere Einarbeitung die Schuppenproben interpretieren (Hammer & Gröhsler 1996). Die Altersbestimmung an Hand kalzifizierter Strukturen bedeutet oft eine subjektive Interpretation der Circuli und Annuli. Die Annuli, die die einzelnen Wachstumszonen separieren, sind unterschiedlich stark ausgeprägt (Casselman 1987), so dass sie schwer zu identifizieren und interpretieren sind und dadurch Fehler beim Lesen entstehen können.

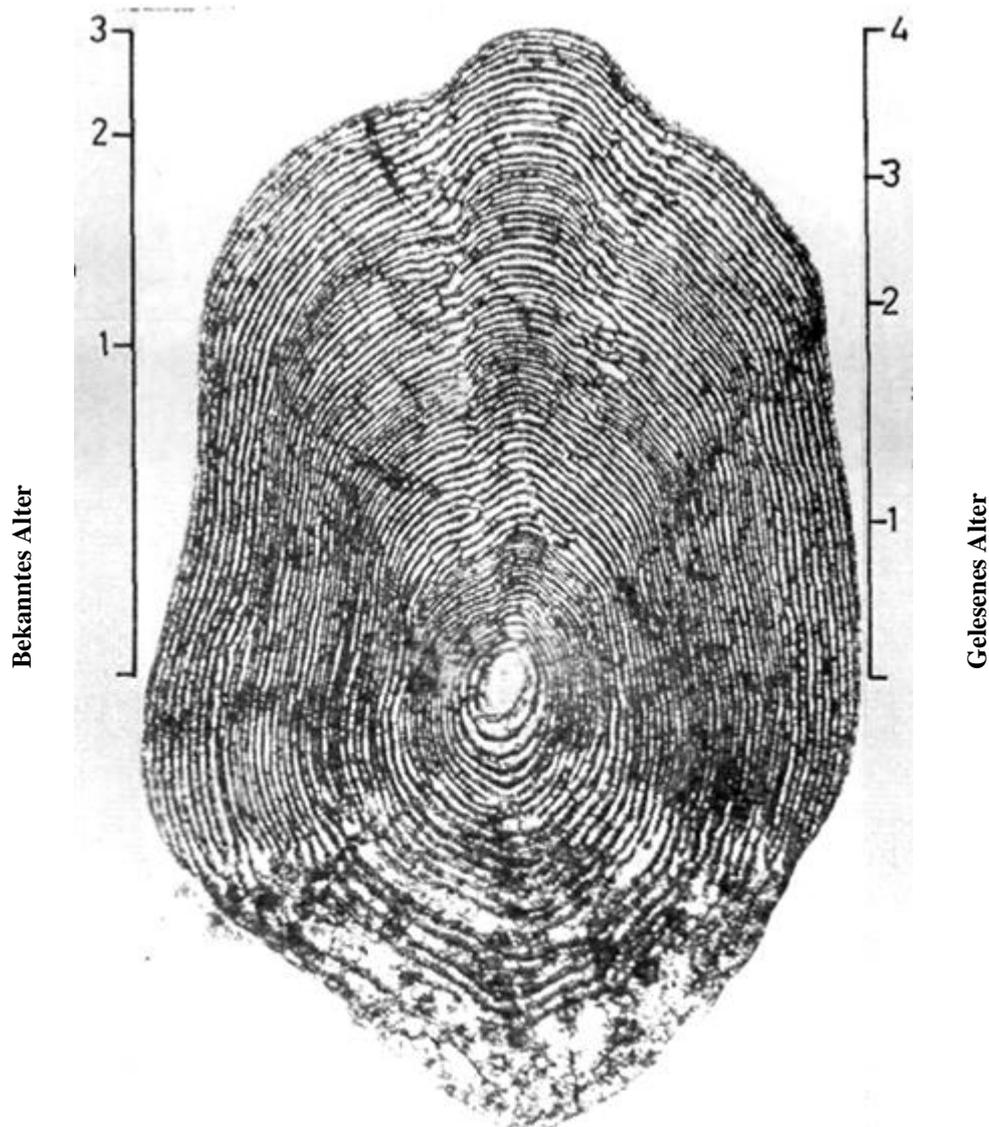
Gerade bei älteren Fischen entstehen oft Probleme bei der Altersbestimmung. Fische wachsen mit zunehmendem Alter langsamer als in den Jahren zuvor: Die Annuli liegen auf einer Schuppe dichter beieinander, so dass besonders der jüngste Annulus schwer zu identifizieren ist. Ältere Fische werden daher bzgl. ihres Alters oft unterschätzt. Ein häufiger Fehler besteht darin, das Extrajahr zu lesen, bei dem sich der Fisch im ersten Lebensjahr befindet (Burnet 1969, Barber & Walker 1988), so dass sich dieser Fehler kontinuierlich fortsetzt (Faragher 1992). Das Alter eines Fisches kann daher nicht immer mit Gewissheit richtig bestimmt werden - allerdings ist es wichtig bei der Bestimmung auf Konsistenz des Lesens zu achten und mit dem gleichen Verfahren vorzugehen (Shearer 1992). Im Vergleich zu der Alter-Lese-Problematik bei Adulten sind bei Juvenilen die Annuli oft sehr schwach ausgeprägt, so dass sie schnell übersehen werden können (Davies & Sloane 1987).

Bei der Vermessung der aus der Wupper stammenden Proben kam erschwerend hinzu, dass nicht alle Proben, auch wenn sie vom gleichen Individuum stammten, die gleiche Größe hatten. Die Schuppengröße eines Fisches variiert stark. Dies lässt sich folgendermaßen erklären (Kipling 1962):

- Jeder Fisch besitzt unterschiedliche große Schuppen (bei der Probenentnahme können also auch unterschiedliche Schuppengrößenklassen entnommen werden)

- Fische der gleichen Größenklassen können ebenfalls unterschiedliche große Schuppen besitzen (während ein Fisch große Schuppen hat, besitzt ein anderer kleinere).

Bei den Schuppenanalysen von Burnet (1969) konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der übereinstimmenden Lesarten, und somit der Ergebnisse, nicht nur sehr stark vom Bearbeiter abhängig sind, sondern auch, dass die Wahrscheinlichkeit einer Übereinstimmung sehr gering ist (Abb. 44).



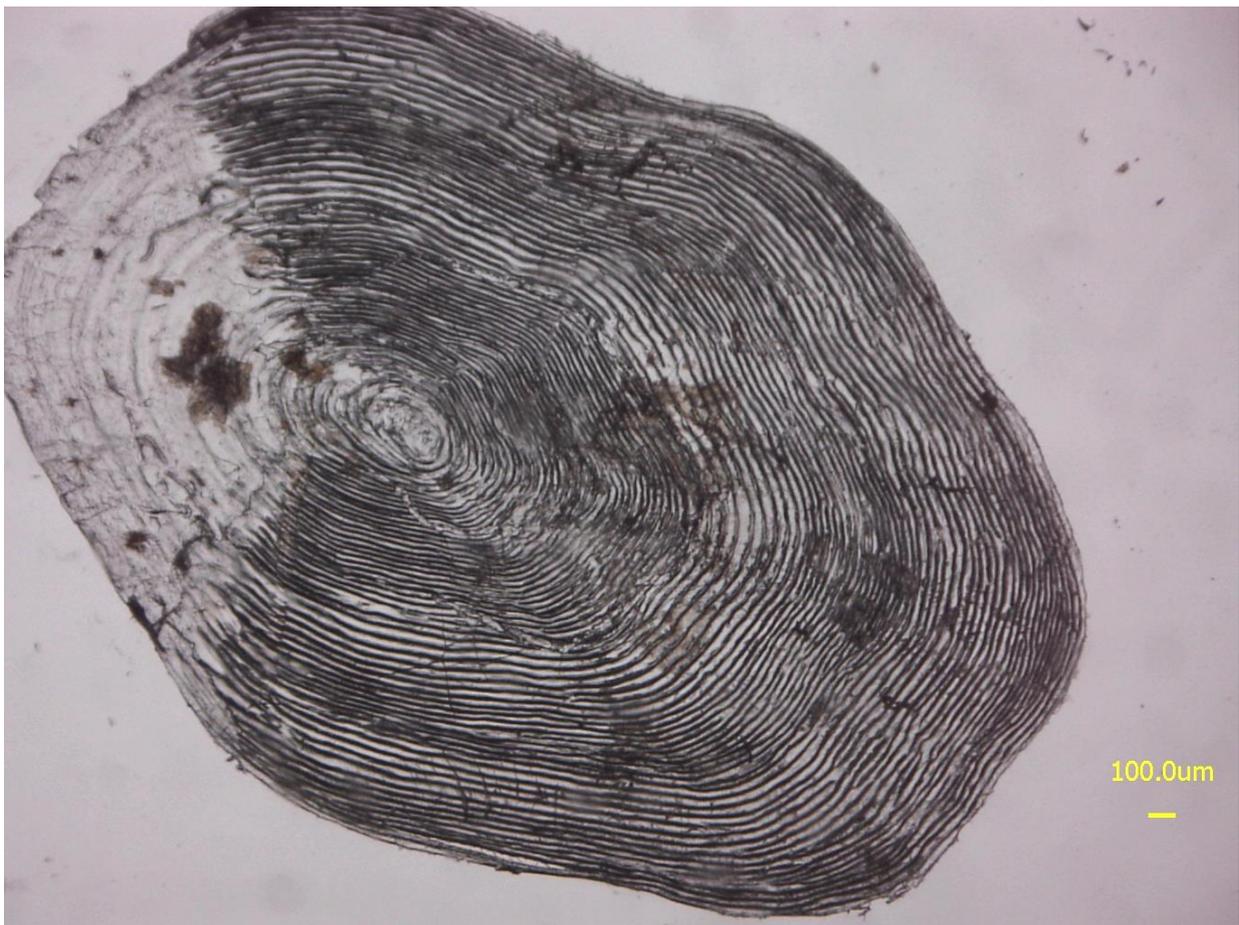
**Abb. 44:** Schuppenprobe (verändert nach Burnet 1969). Auf der Abb. ist zu sehen, dass das gelesene Alter vom bekannten Alter um 1 Jahr divergiert.

Jede der drei ausgewählten Schuppen der vorliegenden Analysen wurde insgesamt von drei unabhängigen Bearbeitern gelesen und vermessen (Heidarsson et al. 2006). Die Ergebnisse

wurden anschließend verglichen und, bei Unstimmigkeiten, diskutiert. Probleme entstanden in folgenden Punkten:

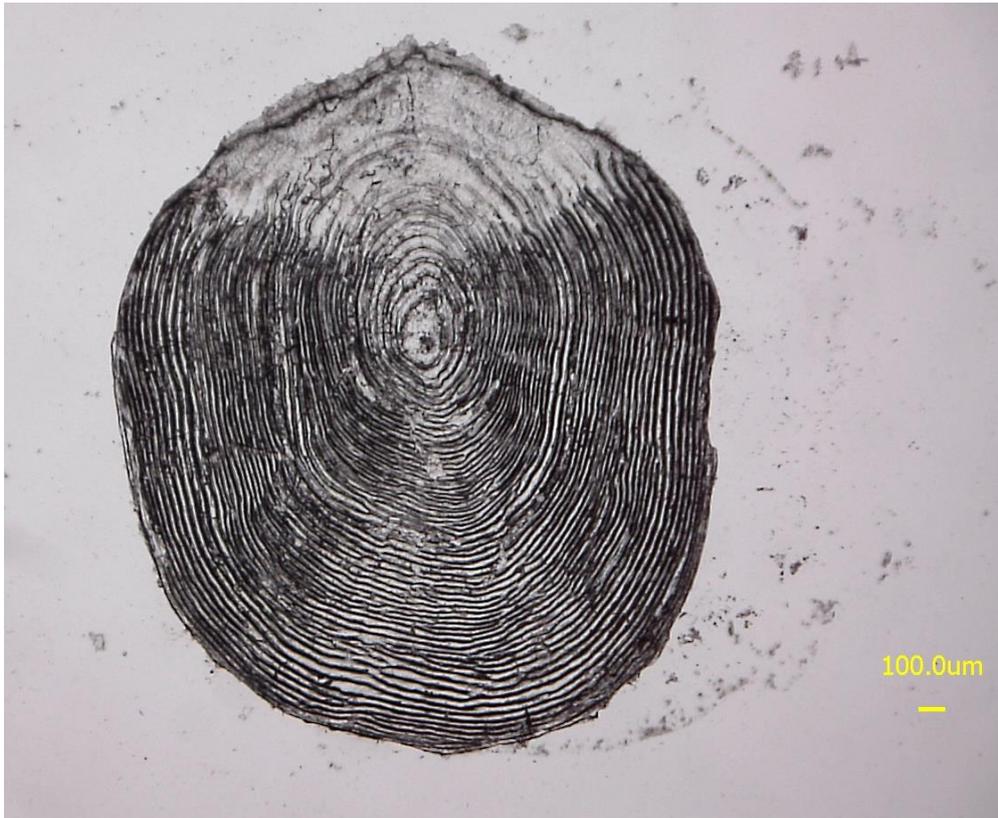
- Der Mittelpunkt des Nukleus wurde bei der Vermessung nicht immer gleich gewählt
- Teilweise waren die Annuli schwer zu erkennen, da die Circuli z. T. sehr gleichmäßig geformt waren

Erschwerend kam hinzu, dass sich die Struktur der Schuppen im Jahresvergleich verändert hat. Die Circuli waren 2012 noch gut erkennbar (**Abb. 45**).



**Abb. 45:** Schuppenprobe 2012. Dargestellt wird eine Schuppenprobe von *S. trutta*. Deutlich sind die unterschiedliche stark ausgeprägten Circuli zu erkennen (breit: Sommer, schmal: Winter).

Diese Strukturen konnten in den darauffolgenden Jahren immer weniger identifiziert werden. Durch die regelmäßige Struktur (**Abb. 46**) liegt die Vermutung nahe, dass einige Besatzfische beprobt wurden. Breite und schmale Circuli waren in vielen Fällen kaum noch voneinander zu unterscheiden. Daher könnten auch hier die Annuli falsch gesetzt worden sein.



**Abb. 46:** Schuppenprobe 2015. Die Abb. zeigt eine Schuppenprobe von *S. trutta*, bei der im Vergleich zu 2012, die Circuli sehr gleichmäßig ausgebildet sind.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Schuppenproben von Zuchtfischen analysiert (**Abb. 47**). Die Struktur der Circuli kann genutzt werden, um zu differenzieren, ob es sich um Zucht- oder Wildfische handelt (Ibáñez et al. 2008). Durch eine regelmäßige Futterzufuhr besitzen Zuchtfische Circuli, die sehr gleichmäßig geformt sind. Bilton & Robins (1971) konnten feststellen, dass der Abstand zwischen den Circuli von der Futterzufuhr abhängig ist.



**Abb. 47:** Schuppenprobe Zuchtfisch. In der Abb. ist die Schuppe einer *O. mykiss* zu sehen. Die Circuli sind sehr gleichmäßig geformt. Ein Annulus ist durch die permanente Futterzufuhr und die relativ gleichbleibenden physikochemischen Parameter nicht zu erkennen.

Die morphologischen Untersuchungen ergaben, dass die aus der Wupper stammenden Schuppen im letzten Beprobungszeitraum (2015) denen aus der Zucht sehr ähnlich waren.

Bzgl. des Längenzuwachses der Salmoniden können folgende Aussagen gemacht werden:

Im Vergleich aller Zuwächse in den verschiedenen Jahren untereinander, konnte beobachtet werden, dass an allen Probestellen *S. trutta* die größten Individuen aufwies.

Bei einem Vergleich aller Individuen fiel auf, dass das Längenwachstum 2012 (**Abb. 41**) an den KM 54,5 (XII-D3), KM 53,5 (XII-E8) und KM 41,6 (XII-P9) am größten war. Während sich die ersten beiden KM in der Nähe des Heizkraftwerks Barmen (KM 52,8) befinden, liegt KM 41,6 oberhalb des Klärwerks Buchenhofen (KM 40,4). 2013 (**Abb. 42**) wurde der längste Fisch (XIII-F9) mit ca. 650 mm im Alter von 2+ nur 200 m oberhalb des Heizkraftwerkes in Elberfeld beprobt. Dieses Phänomen war auch 2015 (**Abb. 43**) zu beobachten: Der größte Fisch (XV-H8, 620 mm, 3+) wurde in unmittelbarer Nähe der Einleitungen des Heizkraftwerkes Elberfeld gefangen.

Hierbei könnte es sich besonders bei der Probe von XIII-F9 um einen Mess- bzw. Lesefehler handeln. Dieser lässt sich entweder dadurch erklären, dass die Schuppenproben schwer lesbar waren (weil die Circuli gleichmäßig geformt waren) oder dass die Annuli nicht richtig erkannt wurden. Ein anderer Grund für diese Auffälligkeit könnte darin liegen, dass Fische nicht gleichmäßig wachsen. Selbst in einer Region kann es vorkommen, dass jüngere Fische ältere Fische im Wachstum einholen oder sogar überholen (Hammer & Gröhsler 1996).

Die Größe von Fischen steht in enger Beziehung zu einer Vielzahl unterschiedlicher Interaktionen. Fische wachsen kontinuierlich, allerdings mit zunehmendem Alter langsamer. Sowohl die Wachstumsrate als auch die Größe, die ein Fisch erreichen kann, sind sehr flexibel und werden von genetischen und ökologischen Faktoren bestimmt (McDowall 1994). Diese Variabilität kann mit der Irregularität im Wachstum und der Formierung der Annuli auf der Schuppe assoziiert werden (Závorka et al. 2014). Der Schuppenzuwachs findet in regelmäßigen Abständen am Rand einer jeden Schuppe statt (Helfman et al. 2009).

Die Variabilität des individuellen Wachstums wird durch zahlreiche endogene und exogene Faktoren beeinflusst. Dazu zählen Krankheiten, Verletzungen, die Verfügbarkeit von Nahrung, die Geschlechtstreife sowie die Temperatur (Casselmann 1987, DeVries & Frie 1996, Helfman et al. 2009 u. a.). Die Temperatur zählt zu einem der Faktoren, der nicht nur die Größe eines Fisches, sondern auch den Abstand zwischen den einzelnen Circuli beeinflusst. Die Annuli sind gekennzeichnet durch wechselnde Zeiträume des schnelleren und langsameren Wachstums (Barber & Walker 1988). Diese Variabilität kann mit der Irregularität der Annuli auf den Schuppen assoziiert werden, so dass Fehler bei der Altersbestimmung entstehen können (Beamish & McFarlane 1983). Ein verlangsamtes Wachstum kann dazu führen, dass die Annuli sehr nah beieinander liegen und die Schuppen daher schwer lesbar sind (Power 1978).

Abschließend lässt sich zu der Altersverteilung und dem Längenzuwachs an den unterschiedlichen KM vermuten, dass es auf Grund der, sich in der Nähe befindenden Einleitungen zu einer veränderten Temperatur kam und sich dies auf das Vorkommen des Makrozoobenthos (MZB) auswirkt. Dadurch ist gewährleistet, dass die Fische auf Grund der Wärmezufuhr nicht nur besser Nahrung aufnehmen können, sondern auch mehr, da sich evtl. das Nahrungsangebot verändert hat und andere Organismen zur Verfügung stehen. Diese Veränderung kann sich positiv auf den Längenzuwachs der einzelnen Jahre auswirken (Gray & Setna 1930). Die Körpergröße, die ein Individuum erreicht, spiegelt die komplexen Beziehungen zwischen der Verfügbarkeit von Futter sowie den vorherrschenden

Umweltbedingungen (z. B. der Temperatur) wieder. In den Sommermonaten ist daher oft ein kumulatives Wachstum zu beobachten (Crozier et al. 2010).

## 5. Ausblick

### 5.1. Der Befall mit *Saprolegnia* spp.: Auswirkungen auf die Salmonidenpopulation in der Wupper

Bei einem Jahresvergleich von 2012 zu 2015 fällt auf, dass nach einer Abnahme im Jahr 2013 der Befall von Salmoniden, die mit *Saprolegnia* spp. infiziert waren, vergleichsweise hoch war. Zukünftig müssen Maßnahmen ergriffen werden, um diesen zu reduzieren:

Zunächst muss die Datenlage bzgl. des Besatzes bekannt sein. Dies bedeutet einerseits Transparenz im Bruthaus (Gibt es infizierte Tiere, wenn ja: Wie viele, in welchem Stadium, wie werden sie behandelt? Werden auch präventive Maßnahmen durchgeführt?) andererseits stellt sich die Frage nach dem Besatz (An welchen KM wird besetzt, wie viele Fische, welche Größe?). Zusätzlich sollte analysiert werden, ob der Eintrag von *Saprolegnia* spp. in die Wupper aus dem Bruthaus kommt und sich ausbreitet oder aber, ob sich *Saprolegnia* spp. auf den Besatzfischen ausbreiten kann, da sie durch die Zeit im Bruthaus eine veränderte Fitness im Vergleich zu den autochthonen Fische haben und durch veränderte Umweltbedingungen anfälliger sind. In diesem Fall würde der Eintrag also nicht direkt durch den Besatz entstehen, sondern indirekt. Dies bedeutet, dass keine direkten Zusammenhänge zu den veränderten physikochemischen Parametern der Jahre 2009 bis 2015 hergestellt und damit keine Rückschlüsse auf die Fitness der besetzten Fische gemacht werden konnten. Hieran schließt sich die Frage, ob und wie lange Besatzfische in der Wupper aufgrund der physikochemischen Zusammensetzung sowie der morphologischen Beschaffenheit des Gewässers grundsätzlich überlebensfähig sind (Mellin 2016). Zukünftig wäre ein funktionierender Austausch zwischen allen Kooperationspartnern wünschenswert, damit Maßnahmen entwickelt werden können, um die Population der Salmoniden in der Wupper langfristig zu schützen und wieder anzusiedeln.

### 5.2. Möglichkeiten einer phytotherapeutischen Behandlung zur Prävention von *Saprolegnia* spp. in der Aquazucht

Um zu verhindern, dass Besatzfische Parasiten oder Pilze in Fließgewässer eintragen, sollten sich Fischzüchter die Frage stellen, ob sie präventiv ihre Fische behandeln. Eine Alternative zu herkömmlichen Mitteln stellt die Phytotherapie dar, auch wenn diese Art der Behandlung

eine besondere Herausforderung ist, da sie spätestens bei den ersten Anzeichen einer Erkrankung erfolgen muss (Bruno & Wood 1999, Valladão et al. 2014).

Auch bei den Fischen, die in der Wupper ausgesetzt werden, scheint eine präventive Behandlung sinnvoll, da der Großteil der beprobten Fische zwar morphologisch unauffällig war, jedoch bei ca. 75 % der insgesamt beprobten Tiere molekularbiologisch ein Befall zu erkennen war. Durch diese Maßnahmen würden der Eintrag infizierter Fische und die Infektion autochthoner Tiere minimiert.

Die Versuchsergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass der Einsatz von Phytotherapeutika durchaus erfolgversprechend sein kann. Bei der Anwendung von pflanzlichen Extrakten müssen zukünftig allerdings weitere *in vivo*-Versuche durchgeführt werden, um ihre Wirksamkeit zu verifizieren (Silva & Fernandes-Junior 2010). Dies gilt besonders bei der Behandlung der Saprolegniose (Caruana et al. 2012). Einige Studien haben gezeigt, dass Pflanzenextrakte bei falscher Dosierung und Applikation einen toxischen Effekt auf Fische haben können (Sambasivam et al. 2003, Ekanem 2007, Kavitha et al. 2012 u. a.). Daher sind weitere Regularien und Standardisierungen notwendig, wenn Pflanzenextrakte in der Aquazucht eingesetzt werden sollen (Reverter et al. 2014). Für zukünftige *in vivo*-Versuche in der Aquazucht muss berücksichtigt werden, dass eine Infektion mit *Saprolegnia* spp. schon während der Entwicklung der Ova verhindert werden sollte, da die Saprolegniose bereits zu diesem Zeitpunkt ein Absterben auslösen kann (Meyer 1991).

Allgemein betrachtet gibt es bei Fischen drei Möglichkeiten der Verabreichung von Arzneimitteln (Bad, Futter, Injektion), bei denen im Folgenden eine Fokussierung auf die Tauchbadbehandlung erfolgt (Baur & Rapp 2003). Bei einem Vergleich der drei herkömmlichen Behandlungsmethoden scheint das Tauchbad am geeignetsten zu sein: Sie lassen sich bei den Fischen in jedem Stadium anwenden (auch prophylaktisch) und sind gut dosierbar. Die jeweiligen Applikationen sind zielgerichtet. Im Vergleich zur oralen Therapie ist gewährleistet, dass jeder zu behandelnde Fisch für exakt die gleiche Zeit bei der gleichen Verdünnung im Tauchbad verbleibt und die Dosierung erfolgreich verlaufen kann.

### **5.3. Veränderungen der physikochemischen Parameter in der Wupper**

Sowohl die Einführung des Temperaturmanagements als auch die daraus resultierenden Veränderungen der Warmwassereinleitungen scheinen die Fischpopulation der Wupper allmählich zu verändern, so dass sich der Bestand der Salmoniden langsam erholt. Obwohl *S. trutta* im Jahr 2015 in allen Altersstadien vertreten war, kann keine eindeutige Aussage über die natürliche Reproduktion gemacht werden, da an unterschiedlichen Probestellen Besatzmaßnahmen durchgeführt wurde. Inwiefern sich auch der Bestand von *T. thymallus* stabilisiert hat, muss in weiteren Monitorings zukünftig überprüft werden.

Die Wupper ist auf dem besten Wege sich wieder zu einem Gewässer zu entwickeln, das seiner ursprünglichen Morphologie entspricht und in dem sich Salmoniden hoffentlich schon bald wieder selbstständig reproduzieren und ansiedeln können, so dass die Population nicht zusätzlich durch Besatzfische gestützt werden muss. Allerdings ist es auch zukünftig erforderlich, Maßnahmen zu ergreifen, um die Temperatur in den Monaten während der Laichzeit bzw. während der Entwicklung der Ova im Grenzbereich zu halten. Für weitere Untersuchungen wäre es sinnvoll, an relevanten KM täglich die physikochemischen Parameter, insbesondere die Temperatur, zu messen: Die Ergebnisse wären dadurch aussagekräftiger und würden nicht nur den Eindruck einzelner Messungen darstellen.

### **5.4. Altersbestimmungen und weitere Forschungsfragen**

Für weitere Forschungsarbeiten sollten die Salmoniden individuell markiert werden und zwar (nach Möglichkeit) schon als Juvenile. Dies hat den Vorteil, dass im Untersuchungszeitraum von den gleichen Individuen Schuppenproben genommen werden können. Ob und inwiefern es sich bei den beprobten Fischen um Besatzfische oder autochthone Tiere handelt, kann nur mit Hilfe genetischer Analysen festgestellt werden. Zusätzlich wären ergänzende MZB-Analysen hilfreich, die Aufschluss über das Nahrungsangebot der Salmoniden und somit über den Längenzuwachs machen könnten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adam, B., Schürmann, M., Schwevers, U. (2013): Zum Umgang mit aquatischen Organismen - Versuchstierkundliche Grundlagen. Springer Spektrum
- Adejuwon, A. O., Agbaje, E. O., Idika, N. (2011): Antifungal and antibacterial activities of aqueous and methanolic root extracts of *Carica papaya* linn. (Caricaceae). International Research Journal of Microbiology 2 (8). S. 270-277
- Alabaster, J. S. & Lloyd, R. (1980): Water Quality Criteria for Freshwater Fish. London and Boston: Butterworths
- Almodóvar, A. & Nicola, G. G. (2004): Angling impact on conservation of Spanish stream-dwelling brown trout *Salmo trutta*. Fisheries Management and Ecology 11. S. 173-182
- Aravind, G., Debjit, B., Duraivel, S., Harish. G. (2013): Traditional and Medicinal Uses of *Carica papaya*. Journal of Medicinal Plants Studies 1 (1). S. 7-15
- Arrignon, J. (1998): Aménagement piscicole des eaux douces. Paris: Lavoisier. In: Reinartz, R. (2007): Auswirkungen der Gewässererwärmung auf die Physiologie und Ökologie der Süßwasserfische Bayerns - Temperatur und Gewässer, Fische und Erwärmung, anthropogene Ursachen der Gewässererwärmung und Auswirkungen auf die Fischbestände
- Arulmozhi, M. & Janardhanan, K. (1992): The biochemical composition and nutritional potential of the tribal pulse, *Mucuna monosperma* DC Ex Wight. Plant Foods for Human Nutrition 42 (1). S. 45-53
- Bagenal, T. (1978): Methods for Assessment of Fish Production in Fresh Waters. Blackwell Scientific Publications in Oxford. S. 303-351
- Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I., Doolittle, W. F. (2000): A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. Science 290. S. 972-977

- Barber, W. E. & Walker, R. J. (1988): Circuli spacing and annulus formation: is there more than meets the eye? The case for sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Journal of Fish Biology* 32. S. 237-245
- Baskaralingam, V. & Rajagopalan, T. (2014): Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International* 22. S. 1079-1091
- Baur, W. H. & Rapp, J. (2003): *Gesunde Fische. Praktische Anleitung zum Vorbeugen, Erkennen und Behandeln von Fischkrankheiten*. 2. Auflage. Parey Buchverlag
- Beacham, T. D. & Murray, C. B. (1986): Sexual Dimorphism in Length of Upper Jaw and Adipose Fin of Immature and Maturing Pacific Salmon (*Oncorhynchus*). *Aquaculture* 58. S. 269-276
- Beakes, G. W., Woods, S. E., Burra, A. W. (1994): Features which characterize Saprolegnia isolates from salmonid fish lesions - a review. S. 52-66. In: Mueller, G. J. (Hg.): *Salmon Saprolegniasis*. Bonneville Power Administration, Division of Fish and Wildlife, Portland, Oregon
- Beamish, R. J. & McFarlane, G. A. (1983): The forgotten requirement for age validation in fisheries biology. *Transactions of the American Fisheries Society* 112. S. 735-743
- Beitinger, T. L., Bennett, W. A., McCauley R. W. (2000): Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes* 58. S. 237-275
- Bekanntmachung der Neufassung des Landesfischereigesetzes (LFischG): Vom 22. Juni 1994 Aufgrund des Artikels III des Gesetzes zur Änderung des Fischereigesetzes für das Land Nordrhein-Westfalen - Landesfischereigesetz - vom 17. Mai 1994 (GV. NW. S. 248) (Fn 2) wird nachstehend der Wortlaut des Landesfischereigesetzes vom 11. Juli 1972 (GV. NW. S. 226) in der seit dem 21. Juni 1994 geltenden Fassung bekanntgemacht
- Berger, C. (2011): Kartierung und ökologische Bedingungen ausgewählter Salmoniden in der Wupper
- Berkeley, M. J. (1846): Observations, botanical and physiological, on the potato murrain. *Horticultural Society Journal* 1. S. 9-34

- Berman, C. H. & Quinn, T. P. (1991): Behavioural thermoregulation and homing by spring chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), in the Yakima River. *Journal of Fish Biology* 39. S. 301-312
- Bilton, H. T. & Robins, G. L. (1971): Effects of feeding level on circulus formation on scales of young sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 28. S. 861-868
- Bjornin, J. R. & Reiser, D. W. (1991): Habitat requirements of salmonids in streams. In: Meehan, W. R. (Hg.): *Influence of Forest and Rangeland Management on Salmonids Fishes and Habitats*. American Fisheries Society Special Publication 19. S. 83-138
- Bly, J. E. & Clem L. W. (1992): Temperature and teleost immune functions. *Fish and Shellfish Immunology* 2. S. 159-171
- Blohm, H.-P., Gaumert, D., Kämmereit, M. (1994): Leitfaden für die Wieder- und Neuansiedlung von Fischarten. Niedersächsisches Landesamt für Ökologie. S. 1-11
- Brazil (2011): Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Formulario de Fitoterapicos da Farmacopeia Brasileira/ Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, Anvisa, Brasilia [in portuguese]. In: Valladão, G. M. R., Gallani, S. U. & Pilarski, F. (2014): Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. S. 1-12
- Brett, J. R. (1956): Some principles in the thermal requirements of fishes. *The Quarterly Review in Biology* 31, S. 75-87
- Brett, J. R., Shelbourn, J. E., Shoop, C. T. (1969): Growth rate and body composition of fingerling sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in relation to temperature and ration size. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 26. S. 2363-2394
- Bruno, D. W. & Wood, B .P. (1999): Saprolegnia and other Oomycetes, S. 599-659. In: Woo, P. T. K. & Bruno, D. W. (Hrsg.): *Fish Diseases and Disorders, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections* CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK
- Buckland-Nicks, J. A., Gillis, M., Reimchen, T. E. (2011): Neutral network detected in a presumed vestigial trait: ultrastructure of the salmonid adipose fin. *Proceedings of the Royal Society*. S. 1-9

- BUGeFi (2012): Untersuchung der Wupperfischfauna im Jahr 2013 im Rahmen der fischbiologischen Validierungsphase des prognosebasierten Temperaturmanagements. Unveröff. Bericht im Auftrag der Wuppertaler Stadtwerke
- BUGeFi (2015): Untersuchung der Wupperfischfauna im Jahr 2015 im Rahmen der fischbiologischen Validierungsphase des prognosebasierten Temperaturmanagements. Unveröff. Bericht im Auftrag der Wuppertaler Stadtwerke
- Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft BUWAL (2002): Erfolgskontrolle zum Fischbesatz in der Schweiz. Mitteilungen zur Fischerei Nr. 71. S. 1-54
- Brehm, J. & Meijering, M. (1996): Fließgewässerkunde. Einführung in die Ökologie der Quellen, Bäche und Flüsse. 3. überarbeitete Auflage. Wiesbaden
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2013): Formaldehyd-Lösung 36 Prozent (m/m) ad us. vet. S. 1-4
- Burnet, A. M. R. (1969): An examination of the use of scales and fin rays for age determination of brown trout (*salmo trutta* L.). New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. S. 147-151
- Bürgel, B., Linnemann, V., Schubert, S. (2005): Ergebnisbericht Wupper - Wasserrahmenrichtlinie in NRW - Bestandsaufnahme. Staatliches Umweltamt Düsseldorf. MUNLV
- Cabello, F. C. (2006): Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environmental Microbiology 8. S. 1137-1144
- Cairns, J., Buikema Jr., A. L., Heath, A. G., Parker, B. C. (1978): Effects of temperature on aquatic organism sensitivity to selected chemicals. Virginia Water Resources Research Center 106. S. 9-70
- Caissie, D. (2006): The thermal regime of rivers: a review. Fisheries and Oceans, Oceans and Sciences Branch, Moncton, NB, Canada. S. 1-18
- Campana, S. E. (2001): Review Paper - Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. Journal of Fish Biology 59. S. 197-242

- Canini, A., Alesiani, D. D., Arcangelo, G., Tagliatesta, P. (2007): Gas chromatography - mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. leaf. *Journal of Food Components and Analysis* 20 (7). S. 584-590
- Cao, H., Xia, W., Zhang, S., He, S., Wie, R., Lu, L., Yang, X. (2011): Saprolegnia Pathogen from Pengze Crucian Carp (*Carassius auratus* var. Pengze) Eggs and its Control with Traditional Chinese Herb. *The Israeli Journal of Aquaculture*. S. 1-8
- Caruana, S., Yoon, G. H., Freeman M. A., Mackie J. A., Shinn A. P. (2012): The efficacy of selected plant extracts and bioflavonoids in controlling infections of *Saprolegnia australis* (Saprolegniales; Oomycetes). *Aquaculture* 358-359. S. 146-154
- Casselman, J. M. (1987): Determination of age and growth. S. 209-242. In: Weatherley, A. H. & Gill, H. S. (Hrsg.): *The biology of fish growth*. Academic Press London
- Chapman, D. W. (1988): Critical review of variables used to define effects of fines in redds of large salmonids - *Transactions of the American Fisheries Society* 117. S. 1-21
- Cheung, C., Chaillé, P. M., Randall, D. J., Gray, J. S., Au, D. W. T. (2007): The use of scale increment as a means of indicating fish growth and growth impairment. *Aquaculture* 266. S. 102-111
- Chilton, D. E. & Beamish, R. J. (1982): *Age Determination Methods for Fishes Studied by the Groundfish Program at the Pacific Biological Station*. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences 60
- Citarasu, T. (2010): Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture Industry. *Aquaculture International* 18. S. 403-414
- Coker, W. C. (1923): *The Saprolegniaceae with Notes on Other Water Moulds*. University of North Caroline Press Chapel Hill
- Copland, J. W. & Willoughby, L. G. (1982): The pathology of Saprolegnia infections of *Anguilla anguilla* L. elvers. *Journal of Fish Diseases* 5. S. 421-428
- Coutant, C. C. (1977): Compilation of temperature preference data. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34. S. 739-745
- Coutant, C. C. (1987): Thermal preference: when does an asset become a liability? *Environmental Biology of Fishes* 18 (3). S. 161-172

- Cross, M. L. & Willoughby, L. G. (1989): Enhanced vulnerability of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to *Saprolegnia* infection, following treatment of the fish with an Androgen. *Mycological Research* 93 (3). S. 379-383
- Crozier, L. G., Zabel, R. W., Hockersmith, E. E., Achord, S. (2010): Interacting effects of density and temperature on body size in multiple populations of Chinook salmon. *Journal of Animal Ecology* 79. S. 342-349
- Currie, R. J., Bennett, W. A., Beitinger, T. L. (1998): Critical thermal minima and maxima of three freshwater game-fish species acclimated to constant temperatures. *Environmental Biology of Fishes* 51. S. 187-200
- Czeczuga, B., Bartel, R., Kiziewicz, B., Godlewska, A., Muszyńska, E. (2005): Zoosporic Fungi Growing on the Eggs of Sea Trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) in River Water of Varied Trophicity. *Polish Journal of Environmental Studies* 14 (3). S. 295-303
- Dahl, K. (1910): *The Age and Growth of Salmon and Trout in Norway as shown by their scales*. London: The Salmon and Trout Association, Fishmongers' Hall, E. C.
- Damrow, P. (2014): *Untersuchungen zum Einfluss abiotischer Faktoren auf das Längenwachstum ausgewählter Salmoniden in der Wupper*
- Davies, P. E. & Sloane, R. D. (1987): Characteristics of the spawning migrations of brown trout, *Salmo trutta* L., and rainbow trout, *S. gairdneri* Richardson, in Great Lake, Tasmania. *Journal of Fish Biology* 31. S. 353-73
- de Boer, H. J., Kool, A., Broberg, A., Mziray, W. R., Hedberg, I., Levenfors, J. J. (2005): Antifungal and antibacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology* 96. S. 461-469
- DeVries, D. R. & Frie, R. V. (1996): Determination of age and growth, S. 483-508. In: Murphy, B. R. & Willis, D. W. (Hrsg.): *Fisheries Techniques*, 2nd Edition, American Fisheries Society, Bethesda, USA.
- Diéguez-Uribeondo, J., Cerenius, L., Söderhäll, K. (1996): Physiological characterization of *Saprolegnia parasitica* isolates from brown trout. *Aquaculture* 140. S. 247-257

- Diéguez-Uribeondo, J., Fregeneda-Grandes, J. M., Cerenius, L., Pérez-Iniesta, E., Miguel Aller-Gancedo, J., Tellería, M. T., Söderhäll, K., Martín, M. P. (2007): Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina*-*Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. *Fungal Genetics and Biology* 44. S. 585-601
- Doughari, J. H., Elmahmood, A. M. and Manzara, S. (2007): Studies on the antibacterial activity of root extracts of *Carica papaya* L.. *African Journal of Microbiology Research*. S. 37-41
- Dudka, U. A. (1965): Aquatic Fungi of the Southern Part of Kiev Woodland District. Candidate dissertation, Kiev (in Russian). In: Oláh, J. & Farkas, J. (1978): Effect of Temperature, pH, Antibiotics, Formalin and Malachite Green on the Growth and Survival of *Saprolegnia* and *Achlya* Parasitic on Fish. *Aquaculture* 13. S. 273-288
- Dumont, U., Anderer P., Schwevers, U. (2012): Methoden zur Untersuchung von Fischwanderungen und der Schädigung von Fischen an Wasserkraftstandorten. Umweltbundesamt für Mensch und Umwelt. Texte 21/2012 Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. S. 70-93
- Durborow, R. M., Wise, D. J., Terhune, J. S. (2003): Saprolegniasis (Winter Fungus) and Branchiomycosis of Commercially Cultured Channel Catfish. SRAC Publication No. 4700. S. 1-4
- Ebersole, J. L., Liss, W. J., Frissell, C. A. (2001): Relationship between stream temperature, thermal refugia and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* abundance in arid-land streams in the northwestern United States. *Ecology of Freshwater Fish* 10. S. 1-10
- Eddy, F. B. & Fraser, J. E. (1982): Sialic acid and mucus production in rainbow trout *Salmo gairdneri* in response to zinc and seawater. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73C. S. 357-359
- EIFAC (1969): Water quality criteria for European freshwater fish - water temperature and inland fisheries. *Water Research* 3. S. 645-662

- Ekanem, A. P., Obiekezie, A., Kloas, W., Knopf, K. (2004): Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research* 92. S. 361-366
- Ekanem, A. P., Ekpo, I. A., Morah, F., Amanke, E., Afangide, U. (2007): Acute toxicity of ethanol extracts from two ichthyotoxic plants *Adenia cissampeloides* (Passifloraceae) and *Blighia sapida* (Sapindaceae) to one week old *Heterobranchus longifilis* juveniles. *Nigerian Journal of Botany* 20. S. 157-161
- El-Feki, M., Hatai, K., Hussein, M. M. A. (2003): Chemotactic and chemokinetic activities of *Saprolegnia parasitica* toward different metabolites and fish tissue extracts. *Mycoscience* 44 (2). S. 159-162
- Elliott, J. M. (1981): Some aspects of thermal stress in freshwater teleosts, S. 209-245. In: Pickering, A. D. (Hg.): *Stress and Fish*, Academic Press, London and New York. S. 209-245
- Elliott, J. M. & Elliott, J. A. (2010): Temperature requirements of Atlantic salmon *Salmo salar*, brown trout *Salmo trutta* and Arctic charr *Salvelinus alpinus*: predicting the effects of climate change. *Journal of Fish Biology* 77. S. 1793-1817
- Fischer, F. G. & Werner, G. (1958): Die Chemotaxis der Schwärmsporen von Wasserpilzen (Saprolegniaceen). *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 310 (Jahresband). S. 65-91
- Emeruwa, A. C. (1982): Antibacterial Substance from *Carica Papaya* Fruit Extract. *Journal of Natural Products* 45 (2). S.123-127
- Fischgewässerrichtlinie (2006): Amtsblatt der Europäischen Union. Richtlinie 2006/44/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. September 2006 über die Qualität von Süßwasser, das schutz- oder verbesserungsbedürftig ist, um das Leben von Fischen zu erhalten
- Faragher, R. A. (1992): Growth and Age Validation of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Lake Eucumbene, New South Wales. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 43. S. 1033-1042

- FischgewV (1997): Verordnung zur Umsetzung der Richtlinie 78/659/EWG des Rates vom 18.Juli 1978 über die Qualität von Süßwasser, das schutz- oder verbesserungsbedürftig ist, um das Leben von Fischen zu erhalten - ABl. EG Nr. L 222 S. 1 -, zuletzt geändert durch Artikel 2 Abs. 1 in Verbindung mit Anhang I Buchstabe c) der Richtlinie 91/692/EWG des Rates vom 23.Dezember 1991 zur Vereinfachung und zweckmäßigen Gestaltung der Berichte über die Durchführung bestimmter Umweltschutzrichtlinien - ABl. EG Nr. 377 S. 48 - Nordrhein-Westfalen
- Fitzpatrick, M. S., Schreck, C. B., Chitwood, R. L. (1995): Evaluation of three candidate fungicides for treatment of adult spring chinook salmon. *The Progressive Fish-Culturist* 57. S. 153-155
- Fletcher, T. C. & Grant, P. T. (1969): Immunoglobins in the serum and mucus of the plaice *Pleuronectes platessa*. *Biochemical Journal* 115. S. 65
- Francis, R. (1990): Back-calculation of fish length: a critical review. *The Fisheries Society of the British Isles*. S. 883-902
- Fregeneda-Grandes, J. M., Fernández Díez, M., Aller Gancedo, J. M. (2000): Ultrastructural analysis of *Saprolegnia* secondary zoospore cyst ornamentation from infected wild brown trout, *Salmo trutta* L., and river water indicates two distinct morphotypes amongst long-spined isolates. *Journal of Fish Diseases* 23 (2). S. 147-160
- Fregeneda-Grandes, J. M., Fernández Díez, M., Aller Gancedo J. M. (2001): Experimental pathogenicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), of two distinct morphotypes of long-spined *Saprolegnia* isolates obtained from wild brown trout, *Salmo trutta* L., and river water. *Journal of Fish Diseases* 24. 351-359
- Fregeneda-Grandes, J. M., Rodríguez-Cadenas, F., Aller-Gancedo, J. M. (2007): Fungi isolated from cultured eggs, alevins and broodfish of brown trout in a hatchery affected by saprolegniosis. *Journal of Fish Biology* 71. S. 510-518
- Fukuwaka, M. & Kaeriyama, M. (1996): Scale analyses to estimate somatic growth in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. Hokkaido Salmon Hatchery. Fisheries Agency of Japan. S. 631-636
- Garside, E. T. (1973): Ultimate upper lethal temperature of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Canadian Journal of Zoology*. 51. S. 898-900

- Gerster, S. (2006): Jagd und Fischerei. Skript zum Elektrofischerei-Kurs Mai 2006 Mümliswil
- Gebhardt, H. & Ness, A. (2005): Fische - Die heimischen Süßwasserfische sowie die Arten der Nord- und Ostsee. 7. durchgesehene Auflage. München
- Gibson, R. J. (1966): Some factors influencing the distribution of brook trout and young Atlantic salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 23. S. 1977-1979
- Gibson, R. J. (1993): The atlantic salmon in fresh water: spawning, rearing and production. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3. S. 39-73
- Gieseke, C. M., Serfling, S. G., Reimschuessel, R. (2006): Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 253. S. 120-129
- Giordani, R. & Siepai, O. M (1991): Antifungal action of *Carica papaya* latex isolation of fungal cell wall hydrolyzing enzymes *Mycoses* 34. S. 469-477
- Gozlan, R. E., Marshall, W., Lilje, O., Jessop, C., Gleason, F. H., Andreou, D. (2014): Current ecological understanding of fungal-like pathogens of fish: what lies beneath? *Frontiers in Microbiology* 5 (62). S. 1-24
- Gray, J. & Setna, S. B. (1930): The Growth of Fish. The Effect of Food Supply on the Scales of *Salmo irrideus*. S. 55-62
- Greenhalgh, M. (2007): Süßwasserfische. Der praktische Taschenführer für Angler. München. blv Verlag
- Hamers, R. & Schreckenbach, K. (2002): Stress bei Fischen. Aquakultur- und Fischereiiinformationen, Rundbrief der Fischereibehörden, des Fischgesundheitsdienstes und der Fischereiforschungsstelle des Landes Baden-Württemberg (2). S. 5-9
- Hammer, C. & Gröhsler, T. (1996): Das europäische Netzwerk zur Koordination der Altersbestimmung bei Fischen: European Fish Ageing Network (EFAN). *Information Fischwirtschaft*. Heft 43. S. 98-100
- Hansen, L. P. & Jonsson, B. (1988): Salmon Ranching Experiments in the River Imsa: Effects of Dip-Netting, Transport and Chlorobutanol Anaesthesia on Survival. *Aquaculture* 74. S. 301-305

- Hari, R. E., Livingstone, D. M., Siber, R., Burkhardt-Holm, P., Güttinger, H. (2006): Consequences of climatic change for water temperature and brown trout populations in Alpine rivers and streams. *Global Change Biology* 12, S.10-26
- Håstein, T. & Lindstad, T. (1991): Diseases in wild and cultured salmon: possible interaction. *Aquaculture* 98. S. 277-288
- Hatai, K. & Hoshiai, G. I. (1992): Mass mortality in cultured Coho Salmon (*Oncorhynchus Kisutch*) due to *Saprolegnia Parasitica* Coker. *Journal of Wildlife Diseases* 28 (4). S. 532-536
- Hatai, K. & Hoshiai, G. I. (1994): Pathogenicity of *Saprolegnia parasitica* Coker. Salmon Saprolegniasis. S. 87-98. In: Mueller, G. J. (Hg.): Salmon Saprolegniasis. Bonneville Power Administration, Division of Fish and Wildlife, Portland, Oregon
- Heidarsson, T., Antonsson, T., Snorasson, S. S. (2006): The Relationship between Body and Scale Growth Proportions and Validation of Two Back-Calculation Methods Using Individuality Tagged and Recaptured Wild Atlantic Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 135. S. 1156-1164
- Helfman, G. S., Collette, B. B., Facey, D. E., Bowen, B. W. (2009): *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*. 2nd Edition. Wiley - Blackwell, Oxford, UK
- Hernani & Tangendjaja, B. (1988): Analisis mutu minyak nilam dan minyak cengkeh secara kromatografi. *Media Penelitian Sukamandi* 6. S. 57-65 (in Indonesian). In: Soto, C. G. & Burhanuddin (1995): Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture* 136. S. 149-152
- Hickley, P. & Chare, S. (2004): Fisheries for non-native species in England and Wales: angling or the environment? *Fisheries Management and Ecology* 11. S. 203-212
- Hoffmann, A. (2009): *Dynamisches Temperaturmanagement in der Wupper - Entwicklung eines Prognose-Tools und Frühwarnsystems im Auftrag der WSW-Energie-AG*
- Hoffmann, A., Kauermann, G., Windmann, M., Tischbierek, J., Leonhard, V. (2011): *Temperaturmanagement in der Wupper. Phänologische Beobachtungen in NRW. Natur in NRW. LANUV. Nr. 1. S. 34-40*

- Holm, P. (2000): Biologie, Lebensraumsprüche und Gefährdungsursachen der Bachforelle. S. 1-14
- Hughes, G. C. (1962): Seasonal Periodicity of the Saprolegniaceae in the South-Eastern United States. Transactions of the British Mycological Society 45 (4). S. 519-531
- Hussein, M. M. A., Hatai, K., Nomura, T. (2001): Saprolegniosis in salmonids and their eggs in Japan. Journal of Wildlife Diseases 37 (1). S. 204-207
- Ibáñez, A. L., Britton, J. R. Cow, I. G. (2008): Relationship between scale growth checks, circuli formation rate and somatic growth in *Rutilus rutilus* (L.) a fish farm-reared cyprinid. Journal of Fish Biology 72. S. 1023-1034
- Isaacs, G. (1983): Permanent local anaesthesia and anhidrosis after clove oil spillage. Lancet, 1, S. 882.
- Jungwirth, M. & Winkler, H. (1984): The temperature dependence of embryonic development of grayling (*Thymallus thymallus*), danube salmon (*Hucho hucho*), arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and brown trout (*Salmo trutta*). Aquaculture 38. S. 315-327
- Kales, S. C. (2001): Extracellular serine protease activity among selected members of the Saprolegniales: Potential role in pathogenicity. Electronic Theses and Dissertations. Paper 2055. S. 1-135
- Kallert, D. M. (2009): Der Einfluss exogener und endogener Parameter auf den Erbrütungserfolg bei Salmoniden - Eine integrative Untersuchung von Problemen bei der Vermehrung von Bachforelle, Bachsaibling und Seesaibling. S. 1-144
- Kavitha, C., Ramesh, M., Kumaran, S. S., Lakshmi, S. A. (2012): Toxicity of *Moringa oleifera* seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. Experimental and Toxicologic Pathology 64. S. 681-687
- Kaya, C. M., Caddy, L. R., Burkhalter, D. E. (1977): Use of a cold-water refuge by rainbow and brown trout in a geothermally heated stream. Progressive Fish Culturist 39. S. 37-39
- Keene, J. L., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D., Soto, C. G. (1998): The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture Research 29. S. 89-101

- Kipling, C. (1962): The Use of the Scales of the Brown Trout (*Salmo trutta* L.) for the Back-Calculation of Growth. Oxford Journals - ICES Journal of Marine Science. S. 304-315
- Kitancharoen, N., Yamamoto, A., Hatai, K. (1997): Fungicidal effect of hydrogen peroxide on fungal infection of rainbow trout eggs. Mycoscience 38 (4). S. 375-378
- Kitancharoen, N. & Hatai, K. (1998): Some biochemical characteristics of fungi isolated from salmonid eggs. Mycoscience 39 (3). S. 249-255
- Klein, R., Paulus, M., Tarricone, K., Teubner, D. (2012): Richtlinie zur Probennahme und Probenbearbeitung von Brasseln (*Abramis brama*). Umwelt Bundes Amt für Mensch und Umwelt. Umweltprobenbank des Bundes. S. 1-16
- Koeypuksa, W., Phadee, P., Tangtrongpiros, J., Hatai, K. (2005): Influence of pH, Temperature and Sodium Chloride Concentration on Growth Rate of *Saprolegnia* spp. Journal of Scientific Research 30 (2). S. 123-130
- Krishna, K. L., Paridhavi, M., Patel, J. A. (2008): Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). Natural Product Radiance Vol 7 (4). S. 364-373
- Lacombe, J., Macke, K., Gellert, G. (2000): Die Wupper - Vom „schwarzen Fluss“ zum Lachsgewässer. S. 91-101. In: MUNVL 2000 Gewässergütebericht 2000 - 30 Jahre Biologische Gewässerüberwachung in Nordrhein-Westfalen
- Lahnsteiner, F. (2012): Effect of temperature on the reproductive potential of teleost fish. Blue Globe Foresight. Klima- und Energiefonds
- Lamour, K. & Kamoun, S. (2009): Oomycete Genetics and Genomics. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc. S. 407-424
- Langvad, F. (1994): Saprolegnia in Norwegian fish farming. S. 189-201. In: Mueller, G. J. (1994): Salmon Saprolegniasis. USDOE, Bonneville Power Adm., Div. Fish and Wildlife. Portland. S. 189-203
- Lehnen, L. P. & Powell, M. J. (1993): Characterization of cell surface carbohydrates on asexual spores of the Water mold *Saprolegnia ferax*. Protoplasma. 175. S.161-172

- LUA - Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen (1999): Leitbilder für kleine bis mittelgroße Fließgewässer in Nordrhein-Westfalen. Merkblatt Nr. 17 des Landesumweltamtes, Essen
- LUA - Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen (2001): Leitbilder für mittelgroße bis große Fließgewässer in Nordrhein-Westfalen. Merkblatt Nr. 34 des Landesumweltamtes, Essen
- Magaud, H., Migeon, B. Morfin, P., Garric, J., Vindimian, E. (1997): Modelling fish mortality due to urban storm run-off: interacting effects of hypoxia and un-ionized ammonia. *Water Research* 31 (2). S. 211-218
- Marking, L. L. & Meyer, F. P. (1985): Are better anesthetics needed in fisheries? *Fisheries* 10. S. 2-5.
- Marking, L. L., Rach, J. J., Schreier, T. M. (1994): Evaluation of antifungal agents for fish culture. *Progressive Fish Culturist* 56. S. 225-231
- Mayer, K. (2000): Saprolegnia: There´s a fungus among us. OSU Department of Fisheries and Wildlife
- McDowall, R. M. (1994): On size and growth in freshwater fish. *Ecology of Freshwater Fish*, 3, S. 67-79
- Meyer, F. P. (1991): Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Science* 69, S. 4201-4208
- Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen MUNLV (2003): Leitlinie zum Fischbesatz in Nordrhein-Westfalen. Bestandsbewertung - Besatz - Erfolgskontrolle. Münster
- Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen MUNLV (2006): Leitfaden zur wasserwirtschaftlich-ökologischen Sanierung von Salmonidenlaichgewässern in NRW.
- Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen MUNLV (2009): Steckbriefe der Planungseinheiten in den nordrhein-westfälischen Anteilen von Rhein, Weser, Ems und Maas Oberflächengewässer und Grundwasser Teileinzugsgebiet Rhein/Wupper. S. 1-90

- Misra, S. K. & Sahu, K. C. (1977): Screening of some indigenous plants for antifungal activity against Dermatophytes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 9 (4). S. 269-272
- Moore, A., Bendall, B., Barry, J., Waring, C., Crooks, N., Crooks, L. (2012): River temperature and adult anadromous Atlantic salmon, *Salmo salar*, and brown trout, *Salmo trutta*. *Fisheries Management and Ecology* 19. S. 518-526
- Moyes, C. D. & Schulte, M. N. (2008): Tierphysiologie. Pearson Studium. S. 483-486
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro - the polymerase chain-reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51. S. 263-273
- Müller, R. (1997): Vorlesungsskript Fischkunde der Schweiz 1997/8. In: Reinartz, R. (2007): Auswirkungen der Gewässererwärmung auf die Physiologie und Ökologie der Süßwasserfische Bayerns - Literaturstudie im Auftrag des Bayerischen Landesamtes für Umwelt Referat 57/ Gewässerökologie. Münster
- Müller-Belecke, A. (2008): Institut für Binnenfischerei e.V. Potsdam-Sacrow, Erfassung und Dokumentation der genetischen Vielfalt von Zuchtkarpfen sowie der Nebenfische der Karpfenteichwirtschaft, der Zuchtsalmoniden sowie der Nebenfische der Salmonidenhaltung und der weiteren in Aquakultur gehaltenen Arten in Deutschland/ Aquatische genetische Ressourcen - Laichfischbestände von Wirtschaftsfischarten in Deutschland, Schriften des Instituts für Binnenfischerei e.V. Potsdam-Sacrow 2009). S. 3-50
- Müller-Belecke, A. (2011): Schutzkonzept Bachforelle Eifelrur - Genetische Untersuchungen von Bachforellenbeständen. Schriften des Instituts für Binnenfischerei e . V. Potsdam - Sacrow. Jahresbericht 2011 Band 31. S. 3-15
- Naumov, H. A. (1954): Fungi Flora of Leningrad District. Nauka, Moskow (in Russian). Russian). In: Oláh, J. & Farkas, J. (1978): Effect of Temperature, pH, Antibiotics, Formalin and Malachite Green on the Growth and Survival of *Saprolegnia* and *Achlya* parasitic on Fish. *Aquaculture* (13). S. 273-288
- Neish, G. A. (1977): Observations on saprolegniasis of adult sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). *Journal of Fish Biology* 10. S. 513-522

- Neish, G. A. & Hughes, G. C. (1980): Fungal Diseases of Fish, Book 6. T. F. H. Publications  
New Jersey
- Nicola, S. J. & Cordone, A. J. (1973): Effects of Fin Removal on Survival and Growth of  
Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) in a Natural Environment. Transactions of the  
American Fisheries Society 102. S. 753-758
- Nidir, E. S. J. & Lokesh, A. N. (2011): Antifungal activity of *Mucuna pruriens* Seed  
Extractives and L-DOPA. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants 17 (2). S. 139-  
143
- Nikolski, G. W. (1957): Spezielle Fischkunde. Berlin. VEB Deutscher Verlag der  
Wissenschaften.
- Nishiguchi, M. K., Doukakis, P., Egan, M., Kizirian, D., Phillips, A., Prendini, L.,  
Rosenbaum, H. C., Torres, E. Wyner, Y., DeSalle, R., Giribet, G. (2002): DNA  
Isolation Procedures, Methods and Tools in Biosciences and Medicine. Techniques in  
molecular systematics and evolution. S. 267-268
- Noga, E. J. (1993): Water mold infections of freshwater fish: recent advances. Annual Review  
of Fish Diseases. S. 291-304
- Northcote, T. G. (1995): Comparative biology and management of Arctic and European  
grayling (*Salmonidae*, *Thymallus*). Reviews in Fish Biology and Fisheries 5. S. 141-  
194
- Ogle, D. (2010): Back-Calculation of Fish Length from Scale Measurements. S. 1-15
- Oláh, J. & Farkas, J. (1978): Effect of Temperature, pH, Antibiotics, Formalin and Malachite  
Green on the Growth and Survival of *Saprolegnia* and *Achlya* Parasitic on Fish.  
Aquaculture 13. S. 273-288
- Panfili, J. & Loubens, G. (1992): Starting age study of fishes. Example for *Prochilodus*  
*nigricans* (*Prochilodidae*, *Characiformes*). Colloque et Seminaires. Institut Francais de  
Recherche Scientifique pour le Developpement en Cooperation/ORSTOM. S. 335-340
- Panfili, J., de Pontual, H., Troadec, J.-P., Wright, P. J. (2002): Manual of fish  
sclerochronology. Brest, France: Ifremer-Ird co-edition

- Petersson, E., Torbjörn, J., Olsén, H., Mayer, I., Hedenskog, M. (1999): Male-male competition and female choice in brown trout. *Animal Behaviour* 57. S. 777-783
- Phillips, A. J., Anderson, V. L., Robertson, E. J., Secombes, C. J., van West, P. (2008): New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology* 16 (1), S. 13-19
- Pickering, A. D. (1974): The distribution of mucous cells in the epidermis of the brown trout *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Fish Biology* 6. S. 111-118
- Pickering, A. D. & Macey, D. J. (1977): Structure, histochemistry and the effect of handling on the mucous cells of the epidermis of the char *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Fish Biology* 10. S. 505-512
- Pickering, A. D. & Christie, P. (1980): Sexual differences in the incidence and severity of ectoparasitic infestation of the brown trout, *Salmo trutta* L.. *Journal of Fish Biology* 16. S. 669-683
- Pickering, A. D. & Willoughby, L. G. (1982): Saprolegnia infections of salmonid fish. *Annual Report of Freshwater Biology* 50. S. 38-48
- Pickering, A. D. & Duston, J. (1983): Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L., and its effects on the susceptibility to Saprolegnia infection and furunculosis. *Journal of Fish Biology* 23. S. 163-175
- Pickering, A. D. (1989): Factors affecting the susceptibility of salmonid fish to disease. Fifty-seventh annual report for the year ended 31st March 1989. Ambleside, UK, Freshwater Biological Association. S. 61-80
- Pickering, A. D. (1994): Factors which predispose Salmonid Fish to Saprolegniasis S. 67-78. In: Mueller, G. J. (Hg.): *Salmon Saprolegniasis*. Bonneville Power Administration, Division of Fish and Wildlife, Portland, Oregon
- Picón-Camacho, S. M., Marcos-Lopez, M., Bron, J. E., Shinn, A. P. (2012): An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish. *Parasitology* 139. S. 149-190

- Pottinger, T. G. & Day, J. G. (1999): *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova. *Diseases of Aquatic Organisms* 36. S. 129-141
- Power, G. (1978): Fish population structure in arctic lakes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35. S. 53-59
- Quist, M. C., Pegg, M. A., DeVries, D. R. (2012): Age and Growth, S. 677-731. In: Zale, A., Parrish, D., Sutton, T. (Hrsg.): *Fisheries Techniques*. 3rd Edition. Bethesda, MD: American Fisheries Society.
- Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. (2006): *Biologie der Pflanzen*. 4. Aufl. Berlin; New York: De Gruyter.
- Reimchen, T. E., Temple, N. F. (2004): Hydrodynamic and phylogenetic aspects of the adipose fin in fishes. *Canadian Journal of Zoology* 82. S. 910-916
- Reinartz, R. (2007): Auswirkungen der Gewässererwärmung auf die Physiologie und Ökologie der Süßwasserfische Bayerns - Literaturstudie im Auftrag des Bayerischen Landesamtes für Umwelt Referat 57/ Gewässerökologie. Münster
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. (2014): Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture* 433. S. 50-61
- Richards, R. H. & Pickering, A. D. (1978): Frequency and distribution patterns of *Saprolegnia* infection in wild and hatchery-reared brown trout *Salmo trutta* L. and char *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 1. S. 69-82
- Richards, R. H. & Pickering A. D. (1979): Changes in serum parameters of *Saprolegnia* infected brown trout, *Salmo trutta* (L.). *Journal of Fish Diseases* (2). S. 197-206
- Richards, T. A., Dacks, J. B., Jenkinson, J. M., Thornton, C. R., Talbot, N. J. (2006): Evolution of Filamentous Plant Pathogens: Gene Exchange across Eukaryotic Kingdoms. *Current Biology* 16. S. 1857-1864
- Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates (2000): Zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik

- Rico, A., Geng, Y., Focks, A., Van den Brink, P. J. (2013): Modeling environmental and human health risks of veterinary medicinal products applied in pond aquaculture. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32 (5). S. 1196-1207
- Rico, A. & Van den Brink, P. J. (2014): Probabilistic risk assessment of veterinary medicines applied to four major aquaculture species produced in Asia. *Science of the Total Environment* 468-469. S. 630-641
- Riethmüller, A. & Langer, E. J. (2005): Saisonales Vorkommen von Arten der Saprolegniales und Leptomitales im Auesee und in der Fulda in Kassel (Hessen) unter Berücksichtigung fischpathogener Arten. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 33 (6). S. 622-634
- Roberts, R. E. (1963): A Study of the Distribution of certain Members of the Saprolegniales. *Transactions of the British Mycological Society* 46 (2). S. 213-224
- Robertson, E. J., Anderson, V. L., Phillips, A. J., Secombes, C. J., Diguez-Urbeondo, J., van West, P. (2009): Saprolegnia - Fish Interactions. In: Lamour, K. & Kamoun, S. (2009): *Oomycete Genetics and Genomics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc. S. 407-424
- Robideau, G. P., De Cock, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Dé Saulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Hu, C.-H., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. B., Lévesque, C. A. (2011): DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* (11). S. 1002-1011
- Rose, J. D. (2002): The Neurobehavioral Nature of Fishes and the Question of Awareness and Pain. *Reviews in Fisheries Science*, 10 (1). S. 1-38
- Rose, J. D., Arlinghaus, R., Cooke, S. J., Diggles, B. K., Sawynok, W., Stevens, E. D., Wynne, C. D. L. (2012): Can fish really feel pain? *Fish and Fisheries*. S. 1-37

- Rosenthal, H. & Munro, A. L. S. (1985): Der aquatische Lebensraum. Umweltbedingungen in natürlichen Gewässern und Aquakulturanlagen. S. 1-22. In: Roberts, R. J. (Hg.): Grundlagen der Fischpathologie - mit einer Einführung in die Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie und Immunologie sowie in den aquatischen Lebensraum der Knochenfische
- Rottmann, R. W., Francis-Floyd, R., Durborow, R. (1992): The Role of Stress in Fish Disease SRAC Publication No. 474. S. 1-4
- Rümmler, F., Schreckenbach K., Göthling U., Schiewe, S. (2004): Schriften des Instituts für Binnenfischerei e.V. Potsdam-Sacrow Band 14 - Untersuchungen zu den Auswirkungen des Elektrofischfangs auf Fische. S. 1-97
- Sambasivam, S., Karpagam, G., Chandran, R., Khan, S. A. (2003): Toxicity of leaf extract of yellow oleander *Thevetia nerifolia* on tilapia. Journal of Environmental Biology 24. S. 201-204
- Samad, A. P. A., Santoso, U., Lee, M. C. & Nan, F. H. (2014): Effects of dietary katuk (*Sauropus androgynus* L. Merr.) on growth, non-specific immune and diseases resistance against *Vibrio alginolyticus* infection in grouper *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunology 36. S. 582-589
- Samutsevits, N. (1931): Comparative occurrence of fungi in water, air and soil. Mater Mikolog. Fitopatol. 8 (in Russian). In: Oláh, J. & Farkas, J. (1978): Effect of Temperature, pH, Antibiotics, Formalin and Malachite Green on the Growth and Survival of Saprolegnia and Achlya parasitic on Fish. Aquaculture 13. S. 273-288
- Sandoval-Sierra, J. V., Latif-Eugenin, F., Martin, M. P., Zaror, L., Diéguez-Uribeondo, J. (2014): Saprolegnia species affecting the salmonid aquaculture in Chile and their associations with fish developmental stage. Aquaculture 434. S. 462-469
- Sathiyarayanan, L. & Arulmozhi, S. (2007): *Mucuna pruriens* Linn. - a comprehensive review. Pharmacognosy Review 1. S. 157-162
- Schmidt, G. (2004): Leitfaden zum Fischartenschutz in Nordrhein-Westfalen. Schriftenreihe der Landesanstalt für Ökologie, Bodenrodung und Forsten NRW. Bd. 2., 2. neu bearbeitete Auflage

- Schmieds, U. J. (1981): Ökologische Studien an Fischen des Schierenseebaches - einem norddeutschen Seeausfluß (Naturpark Westensee, Schleswig-Holstein). Das Wachstum der häufigsten Fischarten. Schriften des Naturwissenschaftlichen Vereins für Schleswig-Holstein. Band 51. S. 59-84
- Schumacher, I. (2011): Untersuchungen zur Wirksamkeit von Chinin gegen die Ichthyophthiriose bei Karpfen
- Selong, J. H., McMahon, T. E., Zale, A. V., Barrows, F. T. (2001): Effect of temperature on growth and survival of bull trout, with application of an improved method for determining thermal tolerance in fishes. Transactions of the American Fisheries Society 130. S. 1026-1037
- Seymour, R. (1970): The genus *Saprolegnia*. Nova Hedwigia 19. S. 1-124
- Shahbazian, N., Ebrahimzadeh, M. H. A., Soltani M., Khosravi A. R., Mirzargar, S., Sharifpour I. (2010): Fungal contamination in rainbow trout eggs in Kermanshah province propagations with emphasis on Saprolegniaceae. Iranian Journal of Fisheries Sciences 9 (1). S. 151-160
- Sharma, M., Mandloi A. K., Pandey, G., Sahni Y. P. (2012): Antimicrobial Activity of some Medicinal Plants against Fish Pathogens. International Research Journal of Pharmacy 3 (4). S. 28-30
- Shearer, W. M. (1992): ICES Cooperative Research Report - Atlantic Scale Reading Guidelines. International Council for the Exploration of the Sea. NO. 188. ISSN 1017-6195. 1-46
- Shephard, K. L. (1993): Mucus on the epidermis of fish and its influence on drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews I I. S. 403-417
- Shephard, K. L. (1994): Functions for fish mucus. Reviews in Fish Biology and Fisheries 4. S. 401-429
- Silva, N. C. C & Fernandes-Júnior, A. (2010): Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 16 (3). S. 402-413

- Sire, J.-Y. & Akimenko, M.-A. (2004): Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Developmental Biology* 48. S. 233-247
- Snieszko, S. F. (1974): The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *Journal of Fish Biology* 6. S. 197-208
- Songe, M. M., Thoen, E., Evensen, Ø., Skaar, I. (2014): In vitro passages impact on virulence of *Saprolegnia parasitica* to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. parr. *Journal of Fish Diseases* 37. S. 825-834
- Srinivasan, D., Perumalsamy, L., Nathan, P., Sures, T. (2001): Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 94. S. 217-222
- Staas, S., Heermann, L., Zoschke, A. (2013): Literaturstudie - Anforderungen der Leitfischarten hessischer Fließgewässer an Laichhabitats Erläuternder Bericht zur Literaturrecherche. Studie im Auftrag des Hessischen Landesamtes für Umwelt und Geologie (HLUG)
- Storch, V. & Welsch, U. (2004): Kükenthal - Zoologisches Praktikum. S. 356-369
- Stueland, S., Hatai K., Skaar, I. (2005): Morphological and physiological characteristics of *Saprolegnia* spp. strains pathogenic to Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 28. S. 445-453
- Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z., Vesely, T. (2007): Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. *Veterinari Medicina* 52 (12): S. 527-539
- Temple, N. F. & Reimchen, T. E. (2008): Adipose fin condition and flow regime in catfish. *Canadian Journal of Zoology* 86. S. 1079-1082
- Tierschutzbericht (2003): Bericht über den Stand der Entwicklung des Tierschutzes. Unterrichtung durch die Bundesregierung. S. 1-148

- Tierschutzgesetz (1972): Ausfertigungsdatum: 24.07.1972 - Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das durch Artikel 4 Absatz 87 des Gesetzes vom 18. Juli 2016 (BGBl. I S. 1666) geändert worden ist". S. 1-31
- Tiffney, W. N. (1939): The host range of *Saprolegnia parasitica*. Mycologia 31. S. 310-321
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D. G. (1997): The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25. S. 4876-4882
- Torto-Alalibo, T., Tian, M. , Gajendran, K., Waugh, M. E., van West, P., Kamoun, S. (2005): Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. BMC Microbiology 5 (46). S. 1-13
- Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG (2011): Molekularbiologische Identifizierung von Pilzen mittels IST-PCR und nachfolgender Sequenzierung. Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG). S. 1-8
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U. & Pilarski, F. (2014): Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. S. 1-12
- Van den Berg, A. H., McLaggan, D., Diéguez-Urbeon J., Van West P. (2013): The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. Fungal Biology Reviews 27. S. 33-42
- Van der Haegen, G. E., Blankenship, H. L., Hoffmann, A., Thompson, D. A. (2005): The effects of adipose fin clipping and coded wire tagging on the survival and growth of spring Chinook salmon. North American Journal of Fisheries Management 25. S. 1161-1170
- van West, P. (2006): *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. Mycologist 20. S. 99-104
- van Zyll de Jong M. C., Gibson R. J., Cowx I. G. (2004): Impacts of stocking and introductions on freshwater fisheries of Newfoundland and Labrador, Canada. Fisheries Management and Ecology 11. S. 183-193

- Verordnung zur Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (2013): Bundesgesetzblatt Jahrgang 2013 Teil I Nr. 47. S. 3125-3145
- Verordnung zum Landesfischereigesetz (Landesfischereiverordnung - LFischO) (2010): Auf Grund der § 38 Absatz 2, 39 Absatz 3, 42 Absatz 1 und 48 Absatz 3 des Landesfischereigesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Juni 1994 (GV. NRW. S. 516, ber. S. 864), zuletzt geändert durch Gesetz vom 9. Februar 2010 (GV. NRW. S. 137), wird nach Anhörung des Beirates für das Fischereiwesen verordnet
- Veröffentlichungen des Eidgenössischen Amtes für Umweltschutz und der Eidgenössischen Fischereiinspektion (1975): Nr. 33 Elektrofischerei. Veröffentlichung im Rahmen des eidgenössischen Fortbildungskurses für Fischereiaufseher abgehalten im Jahre 1975 im Kanton Graubünden. S. 1-96
- Vieira dos Fernandes, R. H. S., Rodrigues dos Prazeres, D., Gonçalves, F. A., Menezes de Rodrigues, F. G., Aragão, J. S., Sousa, O. V. (2001): Microbicidal Effect of Medicinal Plant Extracts (*Psidium guajava* Linn. and *Carica papaya* Linn.) upon Bacteria Isolated from Fish Muscle and known to induce Diarrhea in Children. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 43 (3). S. 145-148
- Wagh, A. N., Bhalekar, M. N., Kale, P. N. (1993): Effect of age of fruit on yield and quality of crude papain in some varieties of papaya. *Maharashtra Journal of Horticultural Research* 7 (1). S. 41-45
- Walker, C. & van West, P. (2007): Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biology Reviews* 21 (1). S. 10-18
- Weber, D., Wahle, R. J. (1969): Effect of fin-clipping on survival of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 26. S. 1263-1271
- Wehler, H.-U. (2005): *Deutsche Gesellschaftsgeschichte Band 2: Von der Reformära bis zur industriellen und politischen Deutschen Doppelrevolution 1815-1845/49*. 4. Auflage
- Weston, D. P. (2000): Ecological effects of the use of chemicals in aquaculture S. 23-30. In: Arthur, J. R. Lavilla-Pitogo, C. R. & Subasinghe R. P. (Hrsg.): *Use of Chemicals in*

- Aquaculture in Asia: Proceedings of the Meeting on the Use of Chemicals in Aquaculture in Asia 20-22 May 1996, Tigbauan, Iloilo, Philippines Tigbauan, Iloilo, Philippines: Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center
- Whisler, H. C. (1996): Identification of *Saprolegnia* spp. Pathogenic in Chinook Salmon. Washington, D. C., US Department of Energy
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In book: PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications, Publisher: Academic Press. S. 315-322
- Willoughby, L. G. & Pickering, A. D. (1977): Viable Saprolegniaceae spores on the epidermis of the salmonid fish *Salmo trutta* and *Salvelinus alpinus*. Transactions of the British Mycological Society 68. S. 91-95
- Willoughby, L. G. (1978): Saprolegnias of salmonid fish in Windermere: a critical analysis. Journal of Fish Diseases 1. S. 51-67
- Willoughby, L. G., McGrory, C. D., Pickering, A. D. (1983): Zoospore Germination of *Saprolegnia* Pathogenic to Fish. Transactions of the British Mycological Society 80 (3). S. 421-435
- Willoughby, L. G. (1986): An Ecological Study of Water as the Medium for Growth and Reproduction of the *Saprolegnia* from Salmonid Fish. Transactions of the British Mycological Society 87 (4). S. 493-502
- Willoughby, L. G. (1994): Fungi and fish diseases. Stirling, UK: Pisces Press Publication
- Willoughby, L. G. & Roberts, R. J. (1994): Zoospore Motility, its Loss and Recovery, in an Isolate of *Aphanomyces* from a Diseased Fish in Thailand. In: Mueller, G. J. (Hg.): Salmon Saprolegniasis. Bonneville Power Administration, Division of Fish and Wildlife, Portland, Oregon
- Wilson, J. G. M. (1976): Immunological aspects of fungal diseases in fish. In: Jones, E. B. G.: Recent advances in aquatic mycology. Elek Science, London. S. 573-601
- Windmann, M., Kauermann, G., Hoffmann, A., Tischbierek, J., Leonhard, V. (2011): Temperaturmanagement der Wupper im Bereich der Kraftwerke Barmen und Elberfeld. Wasserwirtschaft 9. S. 25-29

- Woo, P. T. K. & Bruno, D. W. (1999): Fish Diseases and Disorders. Viral, Bacterial and Fungal Infections Vol. 3. CABI publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom. S. 599-659
- Wood, S. E., Willoughby, L. G., Beakes, G. W. (1988): Experimental studies on uptake and interaction of spores of the *Saprolegnia diclina-parastica* complex with external mucus of brown trout (*Salmo trutta*). Transactions of the British Mycological Society 90 (1). S. 63-73
- World Health Organization (WHO) - International Agency for Research on Cancer (2006): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 88. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol
- Wunder, W. (1943): Beobachtungen über Schuppen beim Goldfisch (*Carassius auratus* L.), beim Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) und bei der Brachse (*Abramis brama* L.)
- Wupperverband (2008): Fische in der Wupper
- Wupperverband (2011): Die Wupper - vom Abwasserfluss zum Lebensraum
- Wuttke, H. (1997): Die Wupper und ihr Fischbestand - gestern, heute und morgen. In: Jahresberichte des Naturwissenschaftlichen Vereins in Wuppertal, Heft 50
- Xue-Gang, H., Lei, L., Cheng, C., Kun, H., Xian-Le, Y., Gao-Xue, W. (2013): In vitro Screening of Chinese Medicinal Plants for Antifungal Activity against *Saprolegnia* spp. and *Achlya klebsiana*. North American Journal of Aquaculture 75 (4). S. 468-473
- Yuasa, K. & Hatai, K. (1996): Some biochemical characteristics of the genera *Saprolegnia*, *Achlya* and *Aphanomyces* isolated from fishes with fungal infection. Mycoscience 37 (4). S. 477-479
- Závorka, L., Slavík, O., Horký, P. (2014): Validation of scale-reading estimates of age and growth in a brown trout *Salmo trutta* population. Biologia 69/5. S. 691-695

Email:

Leonhard, V. (2016): Email-Auskunft zum Betrieb der Heizkraftwerke in Wuppertal

Mellin, A. (2016): Email-Auskunft zur Besatzfischproblematik in der Wupper

Wuttke, H. (2016): Email-Auskunft zum Thema Besatzfische in der Wupper

Internetquellen

- 1) [http://www.wupperverband.de/internet/wupperverbandwys.nsf/files/wv\\_gebiet\\_fischregionen\\_internet.pdf/\\$FILE/wv\\_gebiet\\_fischregionen\\_internet.pdf](http://www.wupperverband.de/internet/wupperverbandwys.nsf/files/wv_gebiet_fischregionen_internet.pdf/$FILE/wv_gebiet_fischregionen_internet.pdf)
- 2) [www.wupperverband.de](http://www.wupperverband.de)
- 3) <http://www.wsw-online.de/wsw-energie-wasser/privatkunden/produkte/strom/produktion/heizkraftwerke-wuppertal/>
- 4) [http://www.aquafuture.de/d\\_projekte/fische\\_bachforellen.html](http://www.aquafuture.de/d_projekte/fische_bachforellen.html)
- 5) [http://www.naturganznah.com/shop/out/oxbaseshop/html/0/dyn\\_images/1/forelle05\\_p1.jpg](http://www.naturganznah.com/shop/out/oxbaseshop/html/0/dyn_images/1/forelle05_p1.jpg)
- 6) [http://images.google.de/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fratschan.at%2Fassets%2Fimages%2FAeschenentwicklung01\\_GrueneEier\\_500.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fratschan.at%2Fhtml%2FAeschenentwicklung.html&h=333&w=500&tbnid=wm\\_vQODtLN3gHM%3A&docid=BbFNglPsMc8rEM&ei=3UgPV56sMsP7swGsjL-oDA&tbnm=isch&iact=rc&uact=3&dur=274&page=5&start=139&ndsp=34&ved=0ahUK EwjejuvMz43MAhXD\\_SwKHSzGD8U4ZBAzCIMBKEAwQA](http://images.google.de/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fratschan.at%2Fassets%2Fimages%2FAeschenentwicklung01_GrueneEier_500.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fratschan.at%2Fhtml%2FAeschenentwicklung.html&h=333&w=500&tbnid=wm_vQODtLN3gHM%3A&docid=BbFNglPsMc8rEM&ei=3UgPV56sMsP7swGsjL-oDA&tbnm=isch&iact=rc&uact=3&dur=274&page=5&start=139&ndsp=34&ved=0ahUK EwjejuvMz43MAhXD_SwKHSzGD8U4ZBAzCIMBKEAwQA)
- 7) <http://www.sfv-fsp.ch/startseite/news.html?load=392>
- 8) [http://www.lfvooe.at/wp-content/uploads/aesche\\_1.jpg](http://www.lfvooe.at/wp-content/uploads/aesche_1.jpg)
- 9) [http://www.br.de/radio/bayern2/gesellschaft/notizbuch/lachs-gentechnik-102~\\_v-img\\_\\_16\\_\\_9\\_\\_xl\\_-d31c35f8186eb80b0cd843a7c267a0e0c81647.jpg?version=0ad3b](http://www.br.de/radio/bayern2/gesellschaft/notizbuch/lachs-gentechnik-102~_v-img__16__9__xl_-d31c35f8186eb80b0cd843a7c267a0e0c81647.jpg?version=0ad3b)
- 10) [https://www.wuppertal.de/rathaus-buergerservice/umweltschutz/natur\\_landschaft/102370100000224915.php](https://www.wuppertal.de/rathaus-buergerservice/umweltschutz/natur_landschaft/102370100000224915.php)

## 7. Danksagung

Prof. Dr. Gela Preisfeld möchte ich meinen herzlichen Dank für die Möglichkeit zur freien Durchführung dieser Arbeit sowie die Übernahme der Begutachtung und Betreuung, eine freundliche Arbeitsatmosphäre und jeder Zeit die Möglichkeit zum Gespräch aussprechen.

Bei PD Dr. Eberhard Schmidt bedanke ich mich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie die konstruktiven Ratschläge.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Andreas Mellin (Bezirksregierung Köln Dezernat 51 - Obere Fischereibehörde) bedanken, der bei der Gründung des Salmonidenprojektes eine tragende Rolle gespielt hat und immer noch ein zuverlässiger Ansprechpartner ist.

Besonderer Dank geht ebenfalls an Sabine Stratmann-Lettner für ihre Hilfsbereitschaft und ihre zahlreichen wertvollen Tipps bzw. Anregungen im Labor.

Beim Büro für Umweltplanung, Gewässermanagement und Fischerei BUGeFi (bes. Jennifer und Andreas) möchte ich mich für die gelungene Kooperation und Zuverlässigkeit bedanken. Vielen Dank auch an Jan Lackemann, der ebenfalls immer ein guter Ansprechpartner war und mitverantwortlich für eine gut geratene Organisation bei den Befischungen.

Olaf Zimball (ABU Soest) danke ich für die Durchführung der Befischungen sowie die Vermittlung seiner Artenkenntnis.

PD Dr. Matthias Schmidt danke ich für die Übernahme seiner Tätigkeit als Tierschutzbeauftragter sowie die konstruktiven Vorschläge zur Gestaltung des Antrages.

Mein Dank geht an Melanie Spies (Wupperverband) für die zuverlässige Übermittlung der physikochemischen Parameter und ihre Hilfsbereitschaft.

Ich danke Volker Leonhard (WSW Energie & Wasser AG) für die Bereitschaft zur Kooperation und die Bereitstellung der Daten.

Patrick Damrow danke ich für die effiziente Zusammenarbeit und den regen Austausch im Rahmen seiner Bachelorthesis und seines Forschungspraktikums.

Vielen Dank an die AG Preisfeld für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft.

Herzlichen Dank an Sebastian Scherdin für seine liebenswerte, aufmunternde Art mich darin zu bestätigen meine Ziele zu verfolgen und sein warmherziges Gemüt.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung, ihre unendliche Geduld mit meinen immer neuen Ideen und ihr gewecktes Interesse an der Ichthyologie.

## 8. Anhang

### 8.1. Herstellerangaben zu Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräten

<b>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Nelkenöl $\geq 80$ %, DAB, natürlich, Oleum Caryophyllorum	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG
5% iges-CHELEX®	Bio-Rad Laboratories, Inc.
CTAB	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Chloroform: Isoamylalkohol (24:1)	Applichem GmbH
Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl-Roth GmbH & Co. KG
DNA Stain Clear G	SERVA Electrophoresis GmbH
CaCO <sub>3</sub>	Carl-Roth GmbH & Co. KG
DNA Stain Clear G	SERVA Electrophoresis GmbH
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, $\geq 99$ %, p. a.	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Agar Bacteriology grade Agar-Agar	AppliChem GmbH
100 mM Tris/ HCl	Carl-Roth GmbH & Co. KG
NaCl $\geq 99,5$ %, p. a.	Carl-Roth GmbH & Co. KG
dNTP Mix (2 mM)	Thermo Scientific GmbH

RNase (100 mg/ mL)	Carl-Roth GmbH & Co. KG
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen GmbH
E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini Kit	OMEGA Bio-tek, Inc.
E.Z.N.A.® HP Fungal DNA Kit	OMEGA Bio-tek, Inc.
E.Z.N.A.® SP Fungal DNA Mini Kit	OMEGA Bio-tek, Inc.
Fungal DNA Mini Kit peqGOLD	VWR International GmbH
Kartoffel-Glucose-Bouillon	Carl-Roth GmbH & Co. KG
10 x Green Buffer	Thermo Scientific GmbH
peqGold Universal Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH
my budget Wangenabstrichtupfer	Bio-Budget Technologies GmbH
my-budget Double Pure Kit	Bio-Budget Technologies GmbH
DNA Mini Kit	Bio-Budget Technologies GmbH
Dream-Taq-Polymerase	Thermo Scientific GmbH
<i>Mucuna pruriens</i>	Raw living Ltd.
Papain	Vectrade UG
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder	Fisher Scientific GmbH
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fisher Scientific GmbH
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas GmbH

---

ExpressLink™ T4 DNA Ligase	Invitrogen GmbH
T4 DNA Ligase	Invitrogen GmbH
Loading Dye (6x)	Fermentas GmbH
Proteinase K (20 mg/ µL)	Carl-Roth GmbH & Co. KG

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG
Mastercycler Personal	Eppendorf AG
Sauerstoffelektrode PCE-PHD1 pH EC Messgerät	PCE Deutschland GmbH
Temperaturelektrode PCE-PHD1 pH EC Messgerät	PCE Deutschland GmbH
Geldokumentationsanlage Gel iX Imager, INTAS Science Imaging	Instruments GmbH
Agarosegelelektrophorese-Apparatur MIDI 1	Carl-Roth GmbH & Co KG
Inkubationsschüttler Innova® 44	New Brunswick Scientific Co.
Fluoreszenzmikroskop Biozero	Keyence GmbH
Mikroskop PrimoStar	Carl-Zeiss AG
Spektralphotometer GENESYS 10S UV-Vis Bio	Fisher Scientific GmbH
Nanodrop Lite Spectrophotometer	Thermo Scientific GmbH
Thermomixer ThermoShaker TS1	Biometra GmbH

Thermoblock TB2	Analytik Jena AG
Thermoblock TS1	Analytik Jena AG
Mikroskop BA300	Motic
MIDI 1 Elektrophorese-Kammer	Carl-Roth GmbH & Co. KG
Analysenwaage CP124S	Sartorius AG
Autoklav Systec VX-120	Systec GmbH
Zentrifuge 5804 (Swing-bucket-Rotor A-4-44)	Eppendorf AG
Zentrifuge 5424 (Rotor F45-24-11)	Eppendorf AG
Zentrifuge 5804 R (F45-30-11 bzw. Swing-bucket-Rotor A-4-44)	Eppendorf AG
Sicherheitswerkbank MSC-ADVANTAGE	Fisher Scientific GmbH
Laborwaage 440-49N	Kern & Sohn GmbH
GENESYS 10S UV-Vis Photometer	Fisher Scientific GmbH
Sicherheitswerkband MSC-ADVANTAGE	Fisher Scientific GmbH

---

Vortex-Schüttler VV3	VWR International GmbH
Wasseraufbereitungssystem Millipore Synergy UV	Merck KGaA
Trockenschrank UNB500	Memmert GmbH & Co. KG
Trockenschrank ED 115	Binder GmbH

## 8.2. Rohdaten

Tab. 13: Gesamtzahl der beprobten Salmoniden in Bezug auf die Altersverteilung im Jahr 2012

2012	BF					Ä					
	KM	n	1 J	2 J	3 J	4 J	n	1 J	2 J	3 J	4 J
41,6	26	4	21	1	0	0	0	0	0	0	0
46,1	4	0	3	1	0	4	0	4	0	0	0
46,3	12	0	8	4	0	7	0	6	1	0	0
51,1	9	0	7	2	0	9	0	9	0	0	0
53,5	17	2	11	4	0	3	0	2	1	0	0
54,5	11	1	7	2	1	18	0	18	0	0	0
56,9	17	2	11	4	0	0	0	0	0	0	0
61,4	6	0	4	2	0	1	0	1	0	0	0

Tab. 14: Gesamtzahl der beprobten Salmoniden in Bezug auf die Altersverteilung im Jahr 2013

2013	BF					Ä					
	KM	n	1 J	2 J	3 J	4 J	n	1 J	2 J	3 J	4 J
41,6	5	1	4	0	0	8	1	7	0	0	0
46,1	9	0	2	7	0	3	0	3	0	0	0
46,3	8	0	2	6	0	9	3	4	2	0	0
51,1	20	2	12	6	0	2	1	1	0	0	0
53,5	15	0	7	6	2	5	2	3	0	0	0
61,4	16	3	11	2	0	0	0	0	0	0	0

**Tab. 15:** Gesamtzahl der beprobten Salmoniden in Bezug auf die Altersverteilung im Jahr 2015

2015	BF					Ä				
	n	1 J	2 J	3 J	4 J	n	1 J	2 J	3 J	4 J
<b>41,6</b>	10	0	1	9	0	2	0	1	1	0
<b>46,1</b>	14	0	5	7	2	13	1	3	9	0
<b>51,1</b>	19	0	8	10	1	5	0	2	3	0
<b>53,5</b>	15	0	5	9	1	24	0	19	5	0
<b>61,4</b>	16	0	6	10	0	1	0	0	1	0

**Tab. 16:** Anzahl der beprobten Individuen an den unterschiedlichen KM im Jahr 2012 in Bezug auf den Befall mit *Saprolegnia* spp.

KM	15,6	22	29,3	32	35,9	41,6	46,1	46,3	51,1	53,5	54,5	56,9	61,4
<b>BF(n)</b>	9	3	12	14	14	30	4	13	11	19	12	18	6
<b>BF(S)</b>	9	3	8	3	5	4	2	5	10	7	8	15	2
<b>Ä(n)</b>	2	1	3	4	0	0	5	8	10	6	20	2	0
<b>Ä(S)</b>	1	1	1	1	0	0	2	3	1	1	9	2	0

**Tab. 17:** Anzahl der beprobten Individuen an den unterschiedlichen KM im Jahr 2013 in Bezug auf den Befall mit *Saprolegnia* spp.

KM	41,6	46,1	46,3	51,1	53,5	61,4
<b>BF (n)</b>	6	11	10	26	22	21
<b>BF (S)</b>	3	1	1	3	4	17
<b>Ä (n)</b>	7	3	12	2	5	0
<b>Ä (S)</b>	2	0	0	0	1	0

**Tab. 18:** Anzahl der beprobten Individuen an den unterschiedlichen KM im Jahr 2015 in Bezug auf den Befall mit *Saprolegnia* spp.

KM	31,6	41,6	46,1	51,1	53,5	61,4
<b>BF (n)</b>	18	10	12	20	16	18
<b>BF (S)</b>	12	5	10	14	13	16
<b>Ä (n)</b>	33	4	14	6	29	1
<b>Ä (S)</b>	14	3	6	1	11	0

**Tab. 19:** Vergleich der Probestellen in den einzelnen Jahren (S. 152 ff.).

	<b>Probestellen Mucus</b>	<b>Probestelle Temperaturmessung</b>
<b>2012</b>	KM 15,6	KM 24,8
	KM 22,0	KM 24,8
	KM 29,3	KM 31,8
	KM 32,0	KM 31,8
	KM 35,9	KM 36,7
	KM 41,6	KM 41,6
	KM 46,1	KM 46,6
	KM 46,3	KM 46,6
	KM 51,1	KM 52,4
	KM 53,5	KM 53
	KM 54,5	KM 57,3
	KM 56,9	KM 57,3
	KM 61,4	KM 62,9
<b>2013</b>	KM 41,6	KM 41,6
	KM 46,1	KM 46,6
	KM 46,3	KM 46,6
	KM 51,1	KM 52,4
	KM 53,5	KM 53
	KM 61,4	KM 62,9

<b>2015</b>	KM 31,6	KM 32,6
	KM 41,6	KM 41,6
	KM 46,1	KM 46,6
	KM 51,1	KM 52,3
	KM 53,5	KM 53,1
	KM 61,4	KM 62,8

**Tab. 20:** Berechnung des Längenzuwachses. In der Tab. werden die Längenzuwächse ausgewählter Salmoniden in den einzelnen Jahren und an den unterschiedlichen KM dargestellt (S. 153 ff.).

<b>Jahr</b>	<b>L 12 +</b>	<b>L 11-10</b>	<b>L 10-09</b>	<b>L 09-08</b>	<b>KM</b>	<b>Art</b>	<b>Probennr.</b>
	36	224	0	0	KM 61,4	Ä	XII-A3
	137	183	90	0	KM 61,4	BF	XII-R3
	131	136	123	0	KM 56,9	BF	XII-A6
	38	182	0	0	KM 54,5	Ä	XII-C2
	53	111	141	156	KM 54,5	BF	XII-D2
	165	285	0	0	KM 54,5	BF	XII-D3
	37	124	99	0	KM 53,5	BF	XII-E1
	86	234	0	0	KM 53,5	BF	XII-E8
	80	130	0	0	KM 51,1	Ä	XII-F5
	30	195	134	0	KM 51,1	BF	XII-F9
	72	138	0	0	KM 46,3	Ä	XII-G5
	20	180	139	0	KM 46,3	BF	XII-H6
	69	117	104	0	KM 46,3	BF	XII-H9
	120	160	0	0	KM 46,1	Ä	XII-Y8
	44	177	129	0	KM 46,1	Ä	XII-Z7
	75	219	96	0	KM 41,6	BF	XII-P9
	80	200	0	0	KM 41,6	BF	XII-Q5
<b>Jahr</b>	<b>L 13 +</b>	<b>L 12-11</b>	<b>L 11-10</b>		<b>KM</b>	<b>Art</b>	<b>Probennr.</b>
	90	160	0		KM 61,4	BF	XIII-A2
	137	73	0		KM 61,4	BF	XIII-i5
	42	115	92		KM 53,5	BF	XIII-C6
	58	135	186		KM 53,5	BF	XIII-B2
	144	146	0		KM 53,5	BF	XIII-i6
	125	135	90		KM 53,5	Ä	XIII-K8
	143	137	0		KM 51,1	BF	XIII-K1
	221	234	195		KM 46,3	BF	XIII-F9
	62	153	165		KM 46,3	BF	XIII-M8
	48	163	69		KM 46,3	Ä	XIII-E9
	75	177	228		KM 46,1	BF	XIII-E3

	123	137	0		KM 46,1	BF	XIII-N4
	125	155	0		KM 41,6	BF	XIII-O2
<b>Jahr</b>	<b>L 15 +</b>	<b>L 14-13</b>	<b>L 13-12</b>	<b>L 12-11</b>	<b>KM</b>	<b>Art</b>	<b>Probennr.</b>
	14	185	101	0	KM 61,4	Ä	XV-A1
	120	148	193	0	KM 61,4	BF	XV-A2
	13	117	80	0	KM 61,4	BF	XV-B2
	51	123	142	144	KM 53,5	BF	XV-C5
	20	181	139	0	KM 53,5	Ä	XV-B4
	7	164	120	0	KM 53,5	BF	XV-D6
	41	216	63	0	KM 53,5	Ä	XV-L9
	14	129	108	199	KM 51,1	BF	XV-E9
	43	142	85	0	KM 51,1	Ä	XV-E1
	78	160	193	0	KM 51,1	BF	XV-P2
	101	77	77	64	KM 46,1	BF	XV-H7
	154	236	112	118	KM 46,1	BF	XV-H8
	37	183	90	0	KM 46,1	BF	XV-i9
	45	143	92	0	KM 41,6	Ä	XV-K3
	86	173	151	0	KM 41,6	BF	XV-K7

### 8.3. Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BP	Bindepuffer
CaCO <sub>3</sub>	Calciumcarbonat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphate
DSMZ	Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Etylendiamintetraacetat
EP	Elutionspuffer
EtOH	Ethanol
ITS	Internal Transcribed Sequence
KW	Klärwerk
KM	Flusskilometer der Probenstellen
LFischG	Landesfischereigesetz
LP	Lysepuffer
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
max. speed	höchste Geschwindigkeit
MZB	Makrozoobenthos
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid

---

NCBI	National Center for Biotechnology Information
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PDB	Potato Dextrose Broth
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris/ HCl	Tris-Hydrochloride
V8	V8-Gemüsesaft
WHO	World Health Organization
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie
w/v	Weight per volume (Masse pro Volumen)



---

<b>Abb. 23:</b> Relative Häufigkeit von <i>Saprolegnia</i> spp. bei <i>S. trutta</i> (BF) und <i>T. thymallus</i> (Ä) im Jahr 2012. ....	59
<b>Abb. 24:</b> Relative Häufigkeit von <i>Saprolegnia</i> spp. bei den Salmoniden.....	60
<b>Abb. 25:</b> Relative Häufigkeit von <i>Saprolegnia</i> spp. bei <i>S. trutta</i> (BF) und <i>T. thymallus</i> (Ä) im Jahr 2013. ....	61
<b>Abb. 26:</b> Relative Häufigkeit von <i>Saprolegnia</i> spp. bei den Salmoniden.....	62
<b>Abb. 27:</b> Relative Häufigkeit von <i>Saprolegnia</i> spp. bei <i>S. trutta</i> (BF) und <i>T. thymallus</i> (Ä) im Jahr 2015 .....	63
<b>Abb. 28:</b> Relative Häufigkeit von <i>Saprolegnia</i> spp. bei den Salmoniden.....	64
<b>Abb. 29:</b> Nachweis des Befalls von <i>Saprolegnia</i> spp.....	65
<b>Abb. 30:</b> Nachweis des Befalls von <i>Saprolegnia</i> spp.....	66
<b>Abb. 31:</b> Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2009.....	72
<b>Abb. 32:</b> Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2010.....	74
<b>Abb. 33:</b> Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2011.....	76
<b>Abb. 34:</b> Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2012.....	78
<b>Abb. 35:</b> Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2013.....	80
<b>Abb. 36:</b> Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2014.....	82
<b>Abb. 37:</b> Physikochemische Parameter der Wupper für das Jahr 2015.....	84
<b>Abb. 38:</b> Altersverteilung von <i>S. trutta</i> (BF) und <i>T. thymallus</i> (Ä).....	87
<b>Abb. 39:</b> Altersverteilung von <i>S. trutta</i> (BF) und <i>T. thymallus</i> (Ä).....	88
<b>Abb. 40:</b> Altersverteilung von <i>S. trutta</i> (BF) und <i>T. thymallus</i> (Ä).....	89
<b>Abb. 41:</b> Längenzuwachs ausgewählter Salmoniden.....	90
<b>Abb. 42:</b> Längenzuwachs ausgewählter Salmoniden .....	91
<b>Abb. 43:</b> Längenzuwachs ausgewählter Salmoniden .....	92

---

<b>Abb. 44:</b> Schuppenprobe (verändert nach Burnet 1969) .....	108
<b>Abb. 45:</b> Schuppenprobe 2012 .....	109
<b>Abb.46:</b> Schuppenprobe 2015.. .....	110
<b>Abb. 47:</b> Schuppenprobe Zuchtfisch .....	111

## 8.5. Tabellenverzeichnis

**Tab. 1:** V8-Gemüsesaft-Agar 1 L Ansatz

**Tab. 2:** PDB-Agar 1 L Ansatz

**Tab. 3:** Verwendete Primer. In der Tab. werden alle getesteten Primerpaare dargestellt.

**Tab. 4:** Pipettierschema für einen Standard-PCR Ansatz

**Tab. 5:** Ansatz Gradienten-PCR

**Tab. 6:** Verdünnungsreihen und Einwirkzeiten

**Tab. 7:** Stichprobenumfang für *S. parasitica*

**Tab. 8:** Inkubation von *S. ferax* mit *C. papaya*

**Tab. 9:** Inkubation von *S. ferax* mit *M. pruriens*

**Tab. 10:** Inkubation von *S. ferax* mit *C. papaya* und *M. pruriens*

**Tab. 21:** Zusammenfassung der erfolgsversprechenden Inkubationen

**Tab. 22:** Vergleich der Temperaturgrenzwerte bei *S. trutta* und *T. thymallus*

**Tab. 23:** Gesamtzahl der beprobten Salmoniden in Bezug auf die Altersverteilung im Jahr 2012

**Tab. 24:** Gesamtzahl der beprobten Salmoniden in Bezug auf die Altersverteilung im Jahr 2013

**Tab. 25:** Gesamtzahl der beprobten Salmoniden in Bezug auf die Altersverteilung im Jahr 2015

**Tab. 26:** Anzahl der beprobten Individuen an den unterschiedlichen KM im Jahr 2012 in Bezug auf den Befall mit *Saprolegnia* spp.

**Tab. 27:** Anzahl der beprobten Individuen an den unterschiedlichen KM im Jahr 2013 in Bezug auf den Befall mit *Saprolegnia* spp.

**Tab. 28:** Anzahl der beprobten Individuen an den unterschiedlichen KM im Jahr 2015 in Bezug auf den Befall mit *Saprolegnia* spp.

**Tab. 29:** Vergleich der Probestellen in den einzelnen Jahren (S. 152 ff.)

**Tab. 30:** Berechnung des Längenzuwachses

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich

- die von mir eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe,
- nur die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche unter Angabe der Quelle gekennzeichnet habe,
- die Dissertation weder in der vorliegenden noch in ähnlicher Form bei anderen Instituten oder wissenschaftlichen Hochschulen vorgelegt habe,
- bislang keine Promotionsversuche unternommen habe.

Ich bin damit einverstanden, dass meine Dissertation wissenschaftlich interessierten Personen oder Institutionen zur Einsichtnahme zur Verfügung gestellt werden kann.

Wuppertal,

---