

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien  
Universität Berlin

und dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin,  
Arbeitsgebiet Fischhaltung und Fischkrankheiten.

**ANWENDUNG HÄMATOLOGISCHER UNTERSUCHUNGSMETHODEN FÜR  
FISCHBLUT UND BEEINFLUSSUNG DES BLUTBILDES VON BACHFORELLEN  
(*SALMO TRUTTA F. FARIO*) DURCH HALTUNGS- UND UMWELTEINFLÜSSE  
SOWIE ENDOGENE FAKTOREN**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Ralf Peter Pund**

Tierarzt aus Mannheim

Berlin 1997

Journal - Nr. 2051

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. K. Hartung

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Rudolph

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. W. Körting

Tag der Promotion: 6.6.97

*Ultra posse nemo obligatur,  
ne discere cessa !*



# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite	
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTUM</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Bestandteile des Fischblutes und Blutnormalwerte</b>	<b>14</b>
2.1.1	Zelluläre Bestandteile	14
2.1.1.1	Erythrozyten	14
2.1.1.2	Leukozyten	17
2.1.1.2.1	Granulozyten	18
2.1.1.2.2	Lymphozyten	23
2.1.1.2.3	Monozyten und Makrophagen	26
2.1.1.3	Thrombozyten	27
2.1.2	Blutplasma	29
<b>2.2</b>	<b>Methoden der Blutuntersuchungen bei Fischen</b>	<b>31</b>
2.2.1	Blutentnahmetechniken bei Fischen	31
2.2.2	Zählung der Blutzellen	31
2.2.3	Bestimmung des Hämatokritwertes	33
2.2.4	Bestimmung der Hämoglobinkonzentration	34
2.2.5	Die hämatologischen Kennwerte	34
<b>2.3</b>	<b>Beeinflussung des Blutbildes und Immunsystems durch Stressoren</b>	<b>36</b>
2.3.1	Theoretische Konzepte zum Stressphänomen	36
2.3.2	Stresskonzepte und Stressdefinitionen bei Fischen	38
2.3.3	Das allgemeine Adaptationssyndrom	41
2.3.4	Einteilung von Stress bzw. Stressoren	43
2.3.5	Prinzipielle Antworten des Fischorganismus auf Stressoren: primäre, sekundäre und tertiäre Stresseffekte	44
2.3.5.1	Die primäre Stressantwort	46
2.3.5.2	Die sekundäre Stressantwort	48
2.3.5.3	Die tertiäre Stressantwort ("Whole Animal Response")	52

2.3.6	Untersuchungen über Wirkungen von Stressoren	53
2.3.6.1	Exogene Stressfaktoren	54
2.3.6.1.1	Chemisch-physikalische Stressfaktoren	54
2.3.6.1.2	Haltungsbedingungen und Manipulationen am Fisch als Stressfaktoren	62
2.3.6.1.3	Immunsystem, Infektanfälligkeit und Stressfaktoren	69
2.3.6.2	Endogene Faktoren, die stressähnliche Blutbildveränderungen hervorrufen	76
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>79</b>
<b>3.1</b>	<b>Allgemeine Haltungsbedingungen der Versuchsfische</b>	<b>79</b>
3.1.1	Haltung im Wasserdurchlaufsystem	80
3.1.2	Haltung im Wasserkreislaufsystem	80
<b>3.2</b>	<b>Hämatologische Untersuchungsverfahren</b>	<b>81</b>
3.2.1	Betäubung und Blutentnahmetechnik	81
3.2.1.1	Betäubung der Versuchsfische	81
3.2.1.2	Die Blutentnahme	82
3.2.1.2.1	Herzpunktion	83
3.2.1.2.2	Blutentnahme aus dem Ductus Cuvieri	83
3.2.1.2.3	Blutentnahme aus der A. et V. caudalis	85
3.2.2	Hemmung der Blutgerinnung durch Heparin	86
3.2.3	Zählung der Blutzellen	87
3.2.4	Differentialblutbild	92
3.2.5	Vergleich zweier Auswertungsverfahren für die Bestimmung der Leuko- und Thrombozytenzahl	94
3.2.6	Bestimmung der Hämoglobinkonzentration	95
3.2.7	Bestimmung des Hämatokritwertes	97
3.2.8	Beeinflussung des Hämatokritwertes durch Heparin und EDTA	97
3.2.9	Bestimmung der Serum- und Plasmaosmolalität	98
3.2.10	Beeinflussung der Blutparameter durch Heparin	99
3.2.11	Bestimmung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten	99
3.2.12	Berechnung der hämatologischen Kennwerte	100
3.2.13	Bestimmung der Gesamteiweißkonzentration im Blutplasma	101

<b>3.3</b>	<b>Anwendung der Hämatologischen Untersuchungsverfahren</b>	<b>103</b>
3.3.1	Vergleichende Untersuchungen im Wasserkreislauf- und -durchlaufsystem	103
3.3.1.1	Versuchs- und Haltungsbedingungen	103
3.3.1.2	Kontrolle der Wasserqualität	105
3.3.2	Schwankungen des zellulären Blutbildes nach Einwirkung von Stressoren und Variation in Abhängigkeit von der Jahreszeit	106
3.3.2.1	Versuchs- und Haltungsbedingungen	106
3.3.2.2	Kontrolle der Wasserqualität	107
3.3.3	Beeinflussung des Blutbildes durch die Fischgröße	107
3.3.3.1	Haltungs- und Versuchsbedingungen	107
3.3.3.2	Kontrolle der Wasserqualität	108
<b>3.4</b>	<b>Wasseranalytik</b>	<b>108</b>
3.4.1	Messung und Berechnung der Ammoniakkonzentrationen	108
3.4.2	Messung der Nitritkonzentrationen	112
3.4.3	Messungen der Wasserhärte, Leitfähigkeit, Anionen und Kationen im Probenwasser	114
<b>3.5</b>	<b>Statistik</b>	<b>114</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>115</b>
<b>4.1</b>	<b>Betäubung, Blutentnahmetechniken und Blutuntersuchungsmethoden</b>	<b>115</b>
4.1.1	Betäubung	115
4.1.2	Blutentnahme	116
4.1.3	Ermittlung der Heparinkonzentration für die Hemmung der Blutgerinnung	117

4.1.4	Blutzellzählung	118
4.1.4.1	pH-Werte und Osmolalität der Verdünnungslösungen	118
4.1.4.2	Färberische Eigenschaften und Morphologie der Blutzellen	119
4.1.4.3	Vergleichende Untersuchung der Zellzahl für drei verschiedene Differenzierungslösungen	122
4.1.5	Differentialblutbild	123
4.1.6	Vergleich zweier Auswertungsverfahren für Bestimmung der Lympho- und Thrombozytenzahl	127
4.1.7	Osmotische Resistenz der Erythrozyten	129
4.1.8	Bestimmung des Hämatokritwertes	129
4.1.9	Ermittlung der Hämoglobinkonzentrationen	130
4.1.10	Beeinflussung verschiedener Blutparameter durch Heparin und EDTA	132
4.1.10.1	Beeinflussung durch das eingesetzte Heparinvolumen	132
4.1.10.2	Beeinflussung des Hämatokritwertes und der Osmolalität durch EDTA und Heparin	133
4.1.10.3	Variation des Hämatokritwertes und der Plasmaosmolalität in Abhängigkeit vom Blutvolumen bei EDTA-Blut	135
<b>4.2</b>	<b>Vergleich des Blutbildes bei zwei unterschiedlichen Haltungformen</b>	<b>137</b>
4.2.1	Wassermessungen	137
4.2.1.1	Wasserqualität in der Kreislauf- und Durchlaufhaltung	137
4.2.1.2	Wasserqualität zum Zeitpunkt der Blutuntersuchungen	140
4.2.2	Blutuntersuchungen	142
<b>4.3</b>	<b>Veränderung des zellulären Blutbildes in Abhängigkeit von der Körpermasse</b>	<b>146</b>
<b>4.4</b>	<b>Reaktion der Bachforellen auf akute Stressoren und saisonale Blutbildveränderungen im Wasserdurchlaufsystem</b>	<b>148</b>

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>154</b>
<b>5.1</b>	<b>Betäubung und Blutentnahme</b>	<b>154</b>
<b>5.2</b>	<b>Hämatologische Untersuchungsmethoden</b>	<b>157</b>
<b>5.3</b>	<b>Blutbilduntersuchungen</b>	<b>170</b>
5.3.1	Vergleich des Blutbildes von im Wasserdurchlauf- und im -kreislaufsystem gehaltenen Bachforellen	170
5.3.2	Reaktionen der Bachforellen auf akute Stressoren und saisonale Blutbildveränderungen im Wasserdurchlaufsystem	180
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>185</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>191</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>228</b>

## Liste der Abkürzungen

A.	Arteria
A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
A. tridest.	Aqua tridestillata
AAS	Allgemeines Adaptationssyndrom
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
APZ	Antikörperproduzierende Zellen
BD	Besatzdichte
BE	Blutentnahme
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
D.c.	Ductus Cuvieri
DBB	Differentialblutbild
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
EGZ	Eosinophile granuläre Zellen
g	Zentrifugalbeschleunigung
GH	Growth hormone
GIDH	Glutamat-Dehydrogenase
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
HT	Hypothalamus
HR	High responder
Kap.	Kapitel
KGW	Körpergewicht
l	Liter
LAS	Lokales Adaptationssyndrom
LDH	Laktat-Dehydrogenase
Li	Lithium
LR	Low responder
M	Molar (mol/l)
m <sup>3</sup>	Kubikmeter
Met-Hb	Methämoglobin
min	Minute

## Liste der Abkürzungen (Fortsetzung)

Min-Max	Minimal- und Maximalwerte
mod.	modifiziert
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
n.n.	nicht nachweisbar
NaCl	Natriumchlorid
o.A.	ohne Angaben
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
sog.	sogenannt
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
T <sub>3</sub>	Thrijodthyronin
T <sub>4</sub>	Thyroxin
Tab.	Tabelle
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
u	Units
u.a.	unter anderem
u.g.	unten genannt
U/min	Umdrehungen pro Minute
USP	U.S. Pharmacopeia
V.	Vena
VF	Verdünnungsfaktor

## 1. EINLEITUNG

Blutanalysen können bei Fischen neben immunologischen und histologischen Untersuchungen ein wichtiges Hilfsmittel für die Bewertung von akuten sowie chronischen Giftwirkungen von Wasserschadstoffen darstellen (McLEAY und GORDON 1977). Durch die Veränderungen des zellulären Blutbildes sowie der Blutbiochemie kann der Einfluß von Stressoren aufgedeckt und abgeschätzt werden (ELLSAESSER und CLEM 1986, GILL und EPPLE 1993). Stressinduzierte Veränderungen der Blutmeßwerte können weiterhin hilfreiche Parameter für die Abschätzung gradueller Abweichungen von geforderten Haltungsansprüchen der Fische darstellen und als Entscheidungshilfe bei der Frage nach dem Vorliegen von Leiden im Sinne des Tierschutzgesetzes fungieren (OIDTMANN und HOFFMANN 1994). Blutbildveränderungen können darüberhinaus als diagnostisches Hilfsmittel wertvolle Hinweise auf mögliche Ursachen umweltbedingter Fischkrankheiten liefern. So kann das Abweichen z.B. des weißen Blutbildes vom Physiologischen die immunsuppressive Wirkung von Wasserschadstoffen anzeigen und Erklärungsmöglichkeiten für das Vorliegen eines gehäuften Auftretens von Infektionskrankheiten geben. Die hämatologische Untersuchung stellt somit ein wichtiges Kriterium dar, den Gesundheitszustand der Fische zu kontrollieren.

Die moderne Hämatologie versucht, die Dynamik des Krankheitsgeschehen in den Mittelpunkt ihrer Betrachtungsweise zu stellen. Daher gewinnen die Untersuchungsmethoden in der diagnostischen Praxis an Bedeutung, welche die Krankheitsdynamik zu erfassen versuchen. In der Fischtoxikologie ist die Kenntnis von hämatologischen Symptomenkomplexen noch unzureichend, denn wenige Autoren berücksichtigen bisher überhaupt Blutbefunde. Im Gegensatz zu den in der Säugerhämatologie etablierten Methoden existieren wahrscheinlich auch aus diesem Grund für die Untersuchungen des Blutbildes der Fische keine standardisierten Methoden; die grundlegenden hämatologischen Verfahren werden vielfach ohne Anpassungen an das Fischblut aus der human- und veterinärmedizinischen Literatur übernommen. Zum einen ist damit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht mehr gewährleistet, zum anderen besteht bei Anwendung nicht adäquater Methoden die Gefahr von Mißinterpretationen.

Ziel dieser Arbeit ist es zunächst, verschiedene in der Veterinärmedizin etablierte Blutuntersuchungsmethoden für das Fischblut zu testen, zu optimieren und letztendlich eine für die Blutuntersuchungen von Fischen leicht handzuhabende Methoden zu standardisieren.

Die Hämatologie kann im Zusammenhang mit anderen klinischen Symptomen die Reaktionslage eines Organismus aufzeigen; die Befunde des Blutbildes tragen mit anderen klinischen Daten zur Sicherung der Diagnose bei. Um pathologische Zustände eines Individuums abklären zu können, ist es deshalb notwendig, die aktuell vorliegenden Werte der Norm gegenüberzustellen. Bei Abweichungen vom physiologischen Zustand kann auf die Reaktionslage des Organismus geschlossen werden. Diese Erarbeitung der Norm findet an einem Kollektiv gesunder Probanden

statt, die gefundenen Werte stellen die Grundlage für die Ermittlung des Normbereiches dar, die auch die individuellen bzw. physiologischen Schwankungen umfassen soll.

In der Fischhämatologie existieren nur wenige Untersuchungen von Blutnormalwerten, zudem variieren die ermittelten Werte stark. Dies hat ihre Ursachen zum einen in der schon oben erwähnten Anwendung uneinheitlicher hämatologischer Untersuchungsmethoden, zum anderen sind die Ursachen in den unterschiedlichen Haltungsbedingungen der Fische sowie den unterschiedlichen Ansätzen, Schwerpunkten und Zielsetzungen der Arbeiten zu sehen.

Es liegen zahlreiche Untersuchungen vor, die die Beeinflussung des Blutbildes durch mit Schwermetallen belasteten oder mit organischen Verbindungen kontaminiertem Wasser beschreiben. Nur sehr wenige Arbeiten befassen sich mit der Wirkung der "klassischen" fischtoxischen Stickstoffmetabolite Ammoniak, Nitrit und Nitrat oder anderer anorganischer Verbindungen (Sulphate, Phosphate) auf das Blutbild von Fischen, die besonders im geschlossenen Wasserkreislauf akkumulieren können (MYSZKOWSKI und SIWICKI 1994, OIDTMANN 1994).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, mit den etablierten hämatologischen Untersuchungsverfahren Normalbereiche des roten und weißen Blutbildes zu erarbeiten. Parallel hierzu wird untersucht, inwieweit zwei unterschiedliche und praxisübliche Haltungsformen verschiedene Blutparameter beeinflussen: die Aufzucht im Wasserdurchlauf- und Kreislaufsystem. Hierbei soll geprüft werden, inwieweit veränderte Haltungs- bzw. Umweltfaktoren zu einer Entstehung von Blutbildveränderungen führen, die als Indikatoren für das Vorliegen von Stressoren genutzt werden und als Kenngrößen für die Abschätzung gradueller Abweichungen von geforderten Haltungsansprüchen fungieren können. Die Bachforelle (*Salmo trutta f. trutta*) wird als Modellfischart verwendet, da diese Fischart am sensibelsten gegenüber sich verschlechternden Wasserqualitätsparameter reagiert (PUND und BERNOTH 1992).

Weiterhin wird untersucht, inwieweit eine saisonale Abhängigkeit des zellulären Blutbildes existiert oder eine von der Größe (Gewicht) der Tiere abhängige Veränderung der Blutwerte. Die Kenntnis einer möglichen Variation der Blutparameter durch diese Variablen erlauben bei vergleichenden Untersuchungen von haltungs- oder stressbedingten Blutbildveränderungen eine eindeutigere Interpretation der Daten.

## 2. SCHRIFTUM

### 2.1 BESTANDTEILE DES FISCHBLUTES UND BLUTNORMALWERTE

Blut mit roten und weißen Blutkörperchen ist Kennzeichen aller Vetrebraten. Man ist der Auffassung, daß das Blut zum erstenmal von sog. Pro-Vertebraten im Präkambrium ausgebildet wurde (FÄNGE 1994). So sollen lymphozytenähnlichen Zellen ("lymphocyte-like cells") von Seescheiden (*Ascaridae*, *Chordata*) Vorläuferzellen der Vertebraten-Lymphozyten darstellen, da sie u.a. eine mitogen-induzierte Blastogenese auf T- und B-Zellmitogene zeigten (PEDDIE und SMITH 1995). Die Blutzellen der höheren Knochenfische entsprechen in ihrer Morphologie und Funktion weitgehend denen der Landwirbeltiere (LEHMANN und STÜRENBERG 1981).

Das Blutvolumen varriert innerhalb der etwa 21700 Arten umfassenden zoologischen Reihe Pisces zwischen 2 und 17 %, bezogen auf das Körpergewicht. Je höher die Fische organisiert sind, desto geringer ist ihr relatives Blutvolumen (BOND 1996). Knochenganoide (Holostei) besitzen ein Blutvolumen von 17 %, Neunaugen (*Petromyzontia*) von 8.5 % und Haie sowie Rochen (Elasmobranchii) zwischen 6 - 8 %. Das Blutvolumen der modernen Knochenfische (*Teleostei*) varriert zwischen 2 und 5 % (BOND 1996, FERGUSON 1989, ELLIS et al. 1989). So schwankt das relative Blutvolumen bei Salmoniden (Regenbogenforellen; *Oncorhynchus mykiss*) zwischen 3 und 3.5 % (AMIN et al.1992, FÄNGE 1994). Etwa ein Drittel des Blutes besteht aus Zellen, das Blutplasma ist ähnlich zusammengesetzt wie das der Säuger; die Gesamtproteinkonzentration im Plasma ist jedoch im Vergleich zum Säugetierblut geringer, es liegt je nach Fischart zwischen 2 und 6 g/100 ml Plasma.

Blutbildungsstätte der Blutzellen ist bei Knochenfischen vor allem die Kopfniere (Analoge zum Knochenmark der Säugetiere), daneben die Milz und z.T. der Darm (LEHMANN und STÜRENBERG 1981, BLÜM et al. 1988). Bei Haien und Rochen und Seekatzenartigen (*Holocephali*) werden die Blutzellen in der Milz gebildet (FÄNGE 1994). Heute favorisiert man die monophyletische Blutzellbildungs-Hypothese, d.h. die Bildung aller Zellarten aus einer gemeinsamen Stammzelle (BLÜM et al. 1988).

#### 2.1.1 ZELLULÄRE BESTANDTEILE

##### 2.1.1.1 ERYTHROZYTEN

Die Erythrozyten der Fische machen etwa 98 - 99 % aller Zellen des Blutes aus. Reife Zellen sind von ovaler und flacher Gestalt mit einem zentral im Zytoplasma gelegenen Kern (HOUSTON 1990, FÄNGE 1994). Sie enthalten wenige Mitochondrien und Hämoglobin in semikristalliner Form (FÄNGE 1994) mit einer Molekularmasse von 55000 dalton bei adulten Regenbogenforellen (IUCHI 1973). Die Größe liegt bei Knochenfischen in einem Bereich zwischen 10 und 15 µm, bei Haien und Rochen 30 - 33 µm. *Maurolicus*, ein Tiefseefisch, besitzt

als Ausnahme kernlose Erythrozyten (BRANSON 1993, FÄNGE 1994). Manche antarktische Eisfische besitzen keine Erythrozyten, hier übernimmt das Plasma die Funktion der roten Blutkörperchen. (FERGUSON 1989, FÄNGE 1994). Wie bei den Säugetieren dienen die Erythrozyten dem Sauerstofftransport, im Unterschied zu diesen besitzen die Erythrozyten der Fische jedoch einen oxidativen Stoffwechsel (ELLIS et al. 1989). Je nach Aktivität und Habitat variiert der Anteil der Erythrozyten im Blut (Hämatokrit). So besitzen schnell-schwimmende Arten einen hohen Wert (50 %), wie z.B die Makrele (*Scomber scombrus*); langsam schwimmende Arten, wie der Anglerfisch (*Lophius piscatorius*) zeigen Hämatokritwerte von 20 % (FÄNGE 1994).

Die Anzahl schwankt bei Knochenfischen zwischen  $1.05$  und  $3.0 \times 10^6/\mu\text{l}$  Blut (ELLIS et al. 1989) und ist von der Fischart bzw. bei ein und derselben Art von der Herkunft abhängig (HAIDER 1977).

In der panoptischen Färbung nach Pappenheim sind verschiedene Erythrozytenpopulationen identifizierbar, die gleichzeitig unterschiedlichen Reifegraden entsprechen; im Laufe ihrer Reifung nehmen sie - im Unterschied zu Säuger-Erythrozyten - an Größe zu (FERGUSON 1989).

Beispielhaft sei die erythropoetische Reihe bei einem der Vertreter der Salmoniden und weltweit wichtigstem Nutzfisch, der Regenbogenforelle, dargestellt (BLÜM et al. 1988).

#### 1. Proerythroblast:

Er kommt in der Kopfniere, sehr selten im peripheren Blut vor und stellt mit Ausnahme der ausgereiften Erythrozyten die größte und jüngste Zelle der erythropoetischen Reihe dar (KREUTZMANN 1984, BLÜM et al. 1988). Er ist durch eine kreisrunde Form und nahezu gleichartig geformten, zentral gelegenen Kern charakterisiert. Der Nukleus besitzt ein lockeres, dunkelviolet angefarbtes und feingranuliertes Chromatin. Das Zytoplasma zeigt eine intensiv basophile Reaktion.

#### 2. Erythroblast

Er folgt als nächste Reifestufe. Das Zytoplasma reagiert noch leicht basophil, die Form ist rund bis oval mit locker strukturiertem Chromatin, der Zytoplasmasaum ist breiter als beim Erythroblasten (KREUTZMANN 1984, BLÜM et al. 1988). KREUTZMANN (1984) unterscheidet allgemein bei Fischen noch den basophilen sowie polychromatischen Erythroblast; beim letztgenannten besitzt das Plasma eine rötlich-violette Farbe (= polychromatisch).

### 3. Proerythrozyt und Erythrozyt

Der Proerythrozyt ist durch eine weitere Abschwächung der Basophilie des Zytoplasmas erkennbar und besitzt eine bereits ovalere Zellform und einen länglich-ovalen Zellkern (KREUTZMANN 1984).

Der reife länglich ovale, etwa 15 µm lange und 9.5 µm breite Erythrozyt besitzt ein meist homogenes, hellrosa angefärbtes Zytoplasma und ein dunkelviolettes, kompaktes Chromatin in der Pappenheimfärbung. Der Zellkern ist länglich-oval. In der Supravitalfärbung mit Brillantkresylblau aber zeigt das Zytoplasma basophile Einschlüsse (Substantia granulofilamentosa), bestehend aus Lysosomen, Mitochondrien und Golgiapparat (KREUTZMANN 1984).

Die reifen Erythrozyten der Karpfen (Cypriniden) sind in ihrer Form deutlich abgerundeter als die der Regenbogenforellen und besitzen einen runderen Kern (LEHMANN et al. 1994).

Die unreifen Formen der Erythrozyten werden auch Polychromatozyten genannt (ELLIS et al. 1989, AMIN et al. 1992). Das im Vergleich zu den Säugern vermehrte Vorkommen von unreifen roten Blutkörperchen im Fischblut ist nichts Ungewöhnliches, da eine Blut-Knochenmarkschranke fehlt. So kann der Prozentsatz an unreifen Erythrozyten bei Regenbogenforellen 17.6 % relativ zur Gesamt-Erythrozytenzahl betragen (RIVA und FLOS 1993). ELLIS et al. (1989) geben 1 % Polychromatozyten an, bezogen auf die Gesamterythrozytenmenge.

Die Erythropoese findet in der Milz und Vorniere (Kopfniere, Pronephros) statt. Im Erythroblastenstadium gelangen sie in das periphere Blut und reifen aus (FÄNGE 1994). Im Verlauf der Reifung werden die Zellen flacher und nehmen eine ovale Form an. Im Zytoplasma treten Organellen auf und es beginnt die Synthese der Häm- und Globinmoleküle sowie die Zusammenlagerung von Hämoglobin (HOUSTON 1990). Das Lebensalter der Erythrozyten ist unbekannt.

Erythrozytenvermehrung durch Amitosen im Blut als ein regelmäßig vorkommendes Ereignis wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. HOUSTON (1990) faßt zusammen, daß bei frisch geschlüpften Fischen regelmäßig Amitosen auftreten. Bei adulten Saugfischen (*Catostomus commersoni*), Regenbogenforellen, Schollen (*Pleuronectes platessa*), Atlantischen Lachsen (*Salmo salar*), Goldfischen (*Carassius auratus*) und Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*.) treten sie so gut wie immer auf, es ist jedoch hiermit keine Veränderungen des DNA-Gehaltes feststellbar. LEHMANN et al. (1994) konnten bei Karpfen (*Cyprinus carpio*) in seltenen Fällen Amitosen beobachten. DURGA PRASAD et al. (1989) ermittelten bei hungernden Tarpunfischen (*Megalops cyprinoides*, "Ochsenauge") eine über 60 Tage andauernde Zunahme der doppelkernigen Erythrozyten von 0,2 auf 7,8 %. Sie bewerteten die Doppelkernigkeit als eine pyknotische Zelldegeneration. Amitosen können bei gesunden Regenbogenforellen regelmäßig vorkommen, ihr gehäuftes Auftreten wird bei Bleivergiftungen gesehen (HAIDER 1977). Tabelle 1 zeigt die Erythrozytenanzahl wichtiger Nutzfischarten.

**Tabelle 1:** Erythrozytenanzahl von Knochenfischen nach verschiedenen Autoren.

Fischart	Fischgröße	Anzahl [x 10 <sup>6</sup> /µl Blut]	Autor
Regenbogenforellen	o.A.	1.20	BLÜM et al. 1988
	o.A.	1,01	KLONTZ 1994
	10-15 cm	0,96	RIVA und FLOS 1993
	50 g	0.98-1.04	BRUNO und MUNRO 1986
	o.A.	1,67	DEUFEL und PÖLLNITZ 1977
	> 10 g	1,20	SCHÄPERCLAUS et al. 1990
	o.A.	0.80-1.60	WEDEMEYER et al. 1990
Atlantische Lachse	20 g	0.94-1.05	BRUNO und MUNRO 1986
Bachforellen	160 g	0,995 (0.61- 1.32)	BLAXHALL und DAISLEA 1973
	o.A.	1,20 (1.0-1.45)	CATTON (1951)
Karpfen	o.A.	0.84	KLONTZ 1994
Karpfen	75-116 g	1,56	LEHMANN et al. 1994
Karpfen	25 - 250 g	1.20-1.75	SCHÄPERCLAUS et al. 1990
Amerikanischer Gelbbarsch ( <i>Perca flavescens</i> )	o.A.	3.17	KLONTZ 1994
Aal ( <i>Anguilla anguilla</i> )	o.A.	1.40-1.60	SCHÄPERCLAUS et al. 1990

o.A. = ohne Angaben

### 2.1.1.2 LEUKOZYTEN

Die weißen Blutzellen der Knochenfische umfassen Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Leukoblasten und Thrombozyten (LAGLER et al. 1977, FÄNGE 1994), wobei die Thrombozyten von manchen Autoren als eigenständige Zellpopulation angesehen werden (AMIN et al. 1992). Die Differenzierung der Leukozyten kann nach der Romanowsky-Färbung (HOUSTON 1990) oder der Pappenheim-Färbung (BLÜM et al. 1988) im Blutausschrieb vorgenommen werden.

### 2.1.1.2.1 GRANULOZYTEN

Die Benennung der Granulozyten im Fischblut ist uneinheitlich und wird in der Literatur kontrovers diskutiert (ELLIS et al. 1989, HOUSTON 1990, HAMERS 1995b). Granulozyten machen bei den Fischen etwa 25 bis 50 % der Leukozyten aus (FÄNGE 1994). Anhand der färberischen Eigenschaften der Granula in der Pappenheim- und Romanowsky-Färbung können sog. eosinophile granuläre Zellen (BLÜM et al. 1988, LEHMANN et al. 1989, HOUSTON 1990), basophile und neutrophile (BLÜM et al. 1988) sowie bei Karpfen bezeichnete heterophile Granulozyten (HAMERS 1995a, LEHMANN et al. 1994) unterschieden werden. Diese weitgehende deskriptive Klassifikation beruht auf Beobachtungen an Blutzellen des Menschen, die nach der Pappenheim- oder Romanowsky-Färbung gefärbt wurden: Im menschlichen Blut reagieren die neutrophilen Granula mit dem in der Giemsalösung enthaltenen Azurkomplexen nur schwach, die der basophilen Granulozyten stark (Blaufärbung). Die eosinophilen Granula reagieren mit dem Eosin, so daß die Granula rot erscheinen. Demgegenüber färben sich bei Fischen in den seltensten Fällen die Granula der als Neutrophile eingestuften Zellen in der Pappenheim, Giemsa- oder Romanowskyfärbung neutral an oder besitzen multilobuläre Zellkerne, wie bei den neutrophilen Granulozyten der Säugetiere. Aus diesem Grunde wurden Bezeichnungen wie "heterophiler" Granulozyt oder Typ I Leukozyt gewählt (ELLIS et al. 1989). Heterophil bedeutet das gleichzeitige Vorkommen unterschiedlich angefarbter Granula in der Zelle (LEHMANN et al. 1994). HOUSTON (1990) ist der Auffassung, daß die heterophilen Granulozyten der Nicht-Säuger den Neutrophilen der Säuger entsprechen. LEHMANN et al. (1994) unterscheiden beim Karpfen neutrophile und heterophile Granulozyten. HAMERS (1995b) bezeichnet diejenigen Granulozyten als neutrophil, die nur schwach mit basischen oder sauren Farbstoffen bei neutralen pH-Werten reagieren. Heterophile Granulozyten stellen Zellen dar, die neben verschieden großen auch unterschiedlich anfärbbare Granula besitzen. Basophile und eosinophile Granulozyten lassen sich mit alkalischen bzw. sauren Farbstoffen anfärben (HAMERS 1995b).

Allgemeine Charakteristika der Fisch-Granulozyten sind die runde Gestalt, im Zytoplasma enthaltene Granula sowie polymorph ausgebildete Kerne, die eine zentrale oder exzentrische Lage im Zytoplasma einnehmen (ROWLEY 1990). Ihr Kern-Plasma-Verhältnis schwankt von etwa 1:3 bis 1:2. Die Größe der Granulozyten variiert je nach Fischart zwischen 7 und 13 µm (HOUSTON 1990).

In der nachfolgenden Klassifikation der Fisch-Granulozyten wurde die in der Hämatologie für den Menschen etablierte Terminologie gewählt, auf tierartige Besonderheiten wird gesondert eingegangen. Die färberischen Eigenschaften beziehen sich vornehmlich auf die Pappenheimfärbung, andere Färbemethoden (z.B. Test-Simplen) werden erwähnt.

## Neutrophile Granulozyten

Die Granulozytenanzahl bei Knochenfischen variiert zwischen 1 und  $3 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl stellen sie etwa 6-8 % (ELLIS et al. 1989), 2 bis 25 % (HOUSTON 1990) bzw. 4 bis 40 % (LAGLER et al. 1977). Bei Regenbogenforellen beträgt sie etwa 1 - 9 %, bezogen auf die Leuko- und Thrombozyten (WEDEMEYER et al. 1990). Aufgrund histochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen fand man, daß der größte Teil der Fisch-Granulozyten den beim Säuger vorkommenden polymorphkernigen (neutrophilen) Granulozyten ähnelt bzw. entspricht (ELLIS et al. 1989, FÄNGE 1994). Zytochemische Untersuchungen ergaben eine hohe Peroxidaseaktivität in den Granula (FÄNGE 1994) sowie ähnliche zytochemische Reaktionen wie die der Säugerzellen, d.h. positive PAS-Reaktion und Sudanschwarzanfärbung sowie positive saure und alkalische Phosphatase-Reaktion (ELLIS et al. 1989). Daneben besitzen Granulozyten saure Esterasen (BLAXHALL und HOOD 1985). Ultrastrukturell erscheinen die membrangebundenen Granula oval oder länglich mit faserartigem, streifenartigem oder kristallinem Aufbau (ELLIS et al. 1989, HOUSTON 1990).

LEHMANN et al. (1994) machen darauf aufmerksam, daß die neutrophilen Granulozyten bei Karpfen im Nativpräparat nur schwer von den Heterophilen unterschieden werden können. Nur im optimalen Falle können die Neutrophilen sowohl phasenoptisch als auch in der panoptischen Pappenheimfärbung an den feineren Granula erkannt werden. In der Pappenheim- und Romanowskyfärbung sind verschiedene Reifestadien der Granulozyten in den Blutaussstrichen erkennbar, die sich je nach Fischart unterschiedlich anfärben.

### 1. Granuloblast

Sie entsprechen den Myeloblasten und Myelozyten der Säugetiere (ELLIS et al. 1989). Als frühestes Entwicklungsstadium kommen sie in der Milz und Vorniere vor, der Bildungsstätte der Granulozyten bei Knochenfischen. Die Granuloblasten sind sehr selten im peripheren Blut feststellbar. Das Zytoplasma reagiert bei Regenbogenforellen stark basophil, der Kern besitzt keine exakt runde Form und liegt meistens exzentrisch (BLÜM et al. 1988).

### 2. Metagranulozyt

Aus dem Granuloblasten entsteht über den Progranulozyt der Metagranulozyt. Der Zellkern ist bei Regenbogenforellen im Idealfall bohnenförmig, das Zytoplasma erscheint schwächer basophil als das der Granuloblasten. In diesem Stadium kann der Metagranulozyt mit Monozyten verwechselt werden, die jedoch eine negative Peroxidase-Reaktion zeigen (BLÜM et al. 1988).

### 3. Stabkerniger und segmentkerniger Granulozyt

Der stabkernige Granulozyt ist bei Regenbogenforellen durch eine stabförmige Brücke zwischen zwei Kernlappen gekennzeichnet. Das Zytoplasma reagiert je nach Fischart unterschiedlich. Bei Regenbogenforellen "neutrophil"-rosa (BLÜM et al. 1988), bei Karpfen hyalin (LEHMANN et al. 1994), bei Welsen (*Ictalurus punctatus*) in der Romanowskyfärbung graublau (HOUSTON 1990), bei Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) in der Romanowskyfärbung rosa und bei Goldfischen schwach azidophil (HOUSTON 1990). Die zytoplasmatischen Granula variieren stark in der Färbung, sie erscheinen ungefärbt, schwach rosa oder graubläulich und lassen sich nur bei starker Vergrößerung erkennen (BLÜM et al. 1988, HOUSTON 1990). Bei Karpfen zeigen stabkernige wie segmentkernige Granulozyten im hyalinen (ungefärbten) Zytoplasma feine und schwach orange angefärbte Granula (LEHMANN et al. 1994).

Der segmentierte Granulozyt der Fische wird in der gleichen Weise wie der Stabkernige angefärbt. Die Kernform ist je nach Fischart variabel. Meistens besitzt er bei der Regenbogenforelle 2 bis 5 Kernsegmente, die durch fadenförmige Kernbrücken miteinander verbunden sind (BLÜM et al. 1988, AMIN et al. 1992). Bei Karpfen werden Granulozyten, die mehr als drei Segmente besitzen, als übersegmentiert angesehen (LEHMANN et al. 1994). Eine Einteilung der segmentkernigen Granulozyten in fünf verschiedenen Formtypen, wie bei den Säugetieren, ist wegen der Formenvielfalt nicht vorgenommen worden (HOUSTON 1990).

Die Funktion der Granulozyten ist nicht restlos geklärt und wird in der Literatur unterschiedlich diskutiert (HOUSTON 1990). Sie sind in Entzündungsgebieten (bakterielle Infektionen, parasitäre Invasionen, mechanische Verletzungen) gehäuft feststellbar und sollen an Entzündungsreaktionen teilnehmen (ELLIS et al. 1989, HOUSTON 1990). Eine phagozytische Aktivität wird vermutet (ELLIS et al. 1989), scheint aber nicht die Hauptfunktion dieser Zellen zu sein (AMIN et al. 1992). Nach FÄNGE (1994) besitzen die Granulozyten ähnliche Funktionen wie die der Säugetiere, d.h. Phagozytose und intrazelluläre Verdauung von Fremdmaterial. Die Phagozytose kann durch Immunisierung erhöht werden. Eine Zunahme der Neutrophilen ist vor allem bei Einwirkungen von Stressoren feststellbar (stressassoziierte Neutrophilie). KURATA et al. (1995) stellen bei Karpfengranulozyten der Vorniere eine zytotoxische Aktivität gegenüber Granulozyten des Menschen, nicht aber gegen Tumorzelllinien von Mäusen fest. Sie vermuten, daß die von den Granulozyten ausgehende lytische Wirkung infolge Konjugation mit den Zielzellen und nachfolgender Aktivierung des Peroxidasystems zustande kommt.

Die Bildung der Granulozyten erfolgt bei Knochenfischen vor allem in der Vorniere und zu einem geringen Teil in der Milz (ELLIS et al. 1989, HOUSTON 1990). Ihre Lebensdauer beträgt 5 Tage (ELLIS et al. 1989).

## Heterophile Granulozyten

Heterophile Granulozyten werden bei Fischen, Vögeln und Reptilien beschrieben (HAWKEY und DENNETT 1990, HOUSTON 1990, LEHMANN et al. 1994). Je nach Definition, Färbemethode und Fischart werden die Heterophilen neben den Neutrophilen als eigenständiger Zelltyp aufgeführt (LEHMANN et al. 1994) oder als Synonym zu den Neutrophilen verstanden (HOUSTON 1990). Eindeutig werden die heterophilen Granulozyten anhand färberischer Merkmale nur bei Vögeln, Reptilien und Karpfen beschrieben (HAWKEY und DENNETT 1990, LEHMANN et al. 1994).

Im Karpfenblut sind die Heterophilen von neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten sowohl in der phasenoptischen Nativfärbung als auch in der panoptischen Pappenheimfärbung nicht eindeutig abgrenzbar und können nur im optimalen Fall unterschieden werden (LEHMANN et al. 1994). Bei Regenbogen- und Bachforellen werden sie nicht beschrieben (BLAXHALL und DAISLEA 1973, BLÜM et al. 1988).

## Eosinophile Granulozyten

Die Existenz und das Vorkommen von eosinophilen Granulozyten bei Fischen werden in der Literatur widersprüchlich diskutiert, selbst die Namensgebung ist für diese Zellen nicht einheitlich (ELLIS et al. 1989). Ein Großteil der Beschreibungen bezieht sich auf die sogenannten eosinophilen granulären Zellen (EGZ) der Haut, der Kiemen, des Bulbus arteriosus, des Darms und der hämatopoetischen Organe, während "echte" eosinophile Granulozyten im Fischblut nur bei wenigen Knochenfischarten beschrieben werden (ELLIS et al. 1989, AMIN et al. 1992, FÄNGE 1994). Hierbei ist es ungeklärt, ob die EGZ bei Regenbogenforellen identisch mit den eosinophilen Granulozyten des Blutes sind (BLÜM et al. 1988). Bei dieser Art konnten eosinophile granuläre Zellen nur in Verbindung mit Infektionen mit *Aeromonas salmonicida* im Blut nachgewiesen werden (BLÜM et al. 1988, LEHMANN et al. 1989). ELLIS (1985) stellte bei Injektionen von extrazellulären bakteriellen *Aeromonas salmonicida*-Toxinen eine Degranulation der darmständigen EGZ bei gleichzeitigem Anstieg von Histamin im Blut fest. Er kommt zu dem Schluß, daß die gewebeassoziierten EGZ Histamin enthalten und somit an anaphylaktischen Reaktionen teilnehmen könnten. SIRE und VERNIER (1995) vermuten, daß die darmassoziierten EGZ der Regenbogenforellen den Säugereosinophilen entsprechen.

BLÜM et al. (1988) sowie ELLIS et al. (1989) sind der Meinung, daß die EGZ in den Geweben und die "echten" Bluteosinophilen verschiedene Zellpopulationen darstellen. Das einzige Unterscheidungsmerkmal der "echten" Eosinophilen bei Fischen ist das Vorkommen von großen eosinophil angefärbten Granula. Sie besitzen einen hohen isoelektrischen Punkt, so daß sie sich mit sauren Farbstoffen (Eosin) im alkalischen Milieu anfärben lassen.

Ein Grund für das seltene Vorkommen der Eosinophilen bzw. EGZ kann in der wechselhaften Anfärbung der Granula zu suchen sein, denn sie stellt bei den üblichen Färbemethoden das primäre Unterscheidungsmerkmal dar. So können sie mit Heterophilen, Neutrophilen oder Mastzellen verwechselt werden (HOUSTON 1990), bei Vögel und Reptilien werden sie oftmals mit den Heterophilen verwechselt (HAWKEY und DENNETT 1990). Eosinophile Granulozyten können anhand der Ultrastruktur der Granula eindeutiger identifiziert werden. Diese besitzen eine homogene Außenregion und ein zentral gelegenes axiales Kristall (HOUSTON 1990). Eindeutiger liegen die Verhältnisse bei den Haien und Rochen, Chondrostei und Lungenfischen (Dipnoi) vor. Sie besitzen in den konventionellen Färbemethoden eindeutig identifizierbare Merkmale der eosinophilen Granulozyten (große eosinophil angefärbte Granula), sind jedoch peroxidase-negativ (FÄNGE 1994). Karpfen-Eosinophile besitzen ebenfalls eine negative Peroxidasereaktion (LEHMANN et al. 1994).

Eindeutig als eosinophile Granulozyten des Blutes identifizierbare Zellen sind runde, etwa 10-15  $\mu\text{m}$  im Durchmesser große Zellen mit einem zweifach gelappten Kern. In der Romanowsky-Färbung erscheinen die großen (0,5 - 1  $\mu\text{m}$ ), membranassoziierten und rund bis ovalen Granula rosasrot. Der Zellkern liegt exzentrisch (HOUSTON 1990). Bei Karpfen besitzen die Eosinophilen einen runden Zellkern und gut differenzierbare rotviolette Granula; sie können mit gut angefärbten heterophilen Granulozyten verwechselt werden (HAMERS 1995b).

Funktion und Ursprung der eosinophilen Granulozyten sind ungeklärt (AMIN et al. 1992). Vermutet werden Phagozytoseeigenschaften, z.B. von Antigen-Antikörper-Komplexen und Beteiligung bei parasitären Invasionen (ELLIS et al. 1989, HOUSTON 1990).

## Basophile Granulozyten und Mastzellen

Wie bei den eosinophilen Granulozyten wird das Vorkommen dieser Granulozytensubpopulation bei Fischen widersprüchlich diskutiert (ELLIS et al. 1989, AMIN et al. 1992, BRANSON 1993). BLAXHALL und DAISLEA (1973) bzw. BLÜM et al. (1988) konnten bei Bachforellen bzw. Regenbogenforellen keine Basophilen identifizieren. LEHMANN et al. (1994) wiesen basophile Granulozyten bei Karpfen nach, während HINES und SPIRA (1973) diese nicht identifizieren konnten. WILLIAMS und WARNER (1976) beschrieben bei Welsen (*Ictalurus punctatus*) basophile Granulozyten, CANNON et al. (1980) konnten sie bei dieser Fischart nicht nachweisen.

HOUSTON (1990) beschrieb bei Goldfischen die basophilen Granulozyten als runde, etwa 10-15  $\mu\text{m}$  große Zellen mit großem rundem, oftmals exzentrisch gelegenen Kern mit 0.5 - 1.0  $\mu\text{m}$  messenden basophilen Granula. LEHMANN et al. (1994) identifizierten bei Karpfen panoptisch die Basophilen als 9-13  $\mu\text{m}$  (fixierter Zustand) große runde Zellen; während der Pappenheimfärbung werden die Granula herausgewaschen, so daß das Plasma wabig erscheint. Im Test-Simplet zeigen die basophilen Granulozyten des Karpfens eine dicht gepackte, grobe

Granulation, die nach längerer Zeit einen fast schwarzen Farbton annimmt. Basophile sind aufgrund des Fehlens der Granula in der Pappenheimfärbung mit den Heterophilen leicht zu verwechseln.

Mastzellen werden aufgrund ihrer Lokalisation in Geweben und ihres Vorhandenseins von metachromatischen sowie basophilen Granula bei Fischen beschrieben; bei Schollen enthalten die metachromatisch-granulären Zellen der Haut Histamin (ELLIS et al. 1989). Die Granula der Mastzellen scheinen löslich zu sein, so daß sie nur mit speziellen Färbemethoden und Fixativen nachweisbar sind (ELLIS et al. 1989).

Die Funktionen der Mastzellen und der basophilen Granulozyten sind unbekannt. Vermutet wird bei den Basophilen eine Beteiligung bei anaphylaktischen Reaktionen.

#### 2.1.1.2.2 LYMPHOZYTEN

Die Lymphozyten der Fische kommen im Blut und in den lymphatischen Organen vor (Thymus, Milz und Kopfniere). Sie ähneln in ihren färberischen Eigenschaften und der Morphologie denen der Säugetiere (ELLIS 1976, ELLIS et al. 1989). Im Fischblut sind morphologisch große (8-12  $\mu\text{m}$ ) und kleine (4-5  $\mu\text{m}$ ) Lymphozyten unterscheidbar, die wahrscheinlich verschiedene Funktionszustände repräsentieren (ELLIS 1976). AMIN et al. (1992) sind der Ansicht, daß die großen Lymphozyten bei Regenbogenforellen unreife Formen darstellen. Die Einteilung in morphologisch unterschiedliche Größenpopulationen ist nach HOUSTON (1990) nicht angebracht, da fließende Größenübergänge der Lymphozyten existieren können.

Die absolute Anzahl liegt bei Fischen im allgemeinen höher als bei Säugetieren (ELLIS et al. 1989). Im Blut von Regenbogenforellen stellen die Lymphozyten den häufigsten Zelltyp der weißen Zellreihe dar (BLÜM et al. 1988). Die Morphologie der Lymphozyten wird bei allen Fischarten einheitlich beschrieben (ELLIS et al. 1989). Es sind runde Zellen mit einem großen Zellkern und mehr oder weniger dichtem Chromatin. Mit dem Alter nimmt im allgemeinen das Plasmavolumen ab, wodurch bei kleinen, reifen Lymphozyten nur ein schmaler Zytoplasmasaum sichtbar wird (BLÜM et al. 1988, HOUSTON 1990). Der Kern liegt meist exzentrisch und erscheint rund, eingebuchtet oder zweifach gelappt (HOUSTON 1990). Die Zytoplasmamembran kann in nach Pappenheim fixierten und gefärbten Blutaussstrichen mehr oder weniger große Pseudopodien ausbilden. Im basophilen Zytoplasma können azurophile Granula sichtbar sein (AMIN et al. 1992). Zwischen den Lymphozyten und den kernhaltigen Thrombozyten existieren bei Fischen große morphologische Ähnlichkeiten und werden deshalb oft verwechselt (ELLIS et al. 1989, HOUSTON 1990, LEHMANN et al. 1994). Erschwerend für eine eindeutige Unterscheidung dieser zwei Zelltypen ist, daß die Thrombozyten während der Blutentnahme eine stressassoziierte Vergrößerung des Zytoplasmas zeigen; beim Blutaussstrich kann das Zytoplasma so weggeschmiert und die Zellkerne mit den kleinen Lymphozyten verwechselt werden (ELLIS

1977). Aus diesem Grunde variieren die Angaben über die Anzahl in der Literatur (ELLIS 1977, BOGNER und ELLIS 1977). So stellten McCARTHY et al. (1973) bei Regenbogenforellen zwischen Lympho- und Thrombozyten ein Verhältniss von 50 : 1 fest, WEINREB (1958) fand ein Verhältniss von 2 : 1 bei dieser Salmonidenart. ELLIS (1976) konnte nachweisen, daß je nach gewählter Differenzierungsmethode unterschiedliche Verhältnisse zwischen Leuko- und Thrombozyten im Schollenblut festgestellt werden können. HOUSTON (1990) fand nach Durchsicht der Literatur, daß zum einen die Lymphozyten den einzigen Zelltyp im Blut darstellen, zum anderen, daß die Thrombozyten etwa 54 - 95 % der weißen Blutzellen stellen. Deshalb sollten Blutausstriche nur bei Vorhandensein von eindeutig differenzierbaren Thrombozyten ausgewertet werden (HOUSTON 1990).

Hauptunterscheidungsmerkmale der Lymphozyten von runden Thrombozyten sind zum einen die Anfärbbarkeit des Zytoplasmas in der Romanowskyfärbung: Lymphozyten zeigen ein himmel- bis dunkelblaues, Thrombozyten ein blaßblaues Zytoplasma, zum anderen ist die Ausbildung von zytoplasmatischen Ausläufern (Pseudopodien) ein Charakteristikum für die Lymphozyten (ELLIS 1976, HOUSTON 1990).

BLÜM et al. (1988) und AMIN et al. (1992) beschreiben bei Regenbogenforellen im fixierten Blutausstrich drei unterschiedliche Lymphozytenformen: Den Lymphoblasten (große, unreife Lymphozyten), den Lymphozyten und die Plasmazelle. Die Plasmazelle tritt vorwiegend in der Kopfniere auf, selten im Blut. Der Zellkern liegt exzentrisch, das Chromatin ist dicht und zeigt oftmals Radspeichenstruktur. Im Zytoplasma liegen zahlreiche unscharf abgegrenzte Vakuolen (BLÜM et al. 1988). Die Funktion dieser Zelle ist unbekannt. Der Durchmesser des kleinen Lymphozyten beträgt bei Regenbogenforellen 7-10 µm, in der Giemsa-Färbung ist ein dichtes und violett angefarbtes Chromatin erkennbar, im basophilen Zytoplasma können azurophile Granula sichtbar sein (ELLIS 1977, AMIN et al. 1992). Tabelle 2 (S. 25) zeigt die von verschiedenen Autoren gefundenen Normalwerte für Lymphozyten.

**Tabelle 2:** Normalwerte für Lymphozyten bei Knochenfischen nach verschiedenen Autoren.

Fischart	Gewicht	Anzahl [x10 <sup>4</sup> /μl] oder [%] <sup>1</sup>	Autor
Karpfen	75 - 116 g	2,00 (56,6 %)	LEHMANN et al.1994
	o.A.	bis 90 %	BOND 1996
Bachforellen	160 g	56 - 100 %	BLAXHALL und DAISLEA 1973
Regenbogenforellen	50 g	1,34 - 2,16 (große Lymphozyten)	BRUNO und MUNRO 1986
		1,258 - 2,72 (große Lymphozyten)	
	o.A.	75 %	
	o.A.	89 - 98 %	WEDEMEYER et al. 1990
Forellen	o.A.	bis 90 %	BOND 1996
Atlantische Lachse	20 g	1,41 - 1,79 (große Lymphozyten)	BRUNO und MUNRO 1986
		1,40 - 2,22 (kleine Lymphozyten)	
Schollen	o.A.	4,80	ELLIS et al. 1989

<sup>1</sup>Prozentwert, bezogen auf Gesamtleukozyten ohne Thrombozyten

o.A. = ohne Angaben

Wie bei Säugetieren sind die Lymphozyten für die zellvermittelten Immunfunktionen verantwortlich. Ob eine Lymphozyten-Heterogenität der Fischlymphozyten wie bei den Säugetieren existiert, ist fraglich. Es wird bei den modernen Knochenfischen vermutet, daß ähnlich wie bei Säugern B- und T-Zellpopulationen vorkommen; sie werden im allgemeinen als Ig-positive (B-Zellanaloge) und Ig-negative (T-Zellanaloge) Zellen bezeichnet (DeLUCA et al. 1983, BLAXHALL und HOOD 1985, ELLIS 1989, FÄNGE 1994, FINDLAY und TATNER 1994). Über andere Fischklassen liegen hierzu nur wenige Untersuchungen vor (FÄNGE 1994). Eine früher oft vermutete Phagozytoseaktivität der Lymphozyten konnte nicht bestätigt werden (ELLIS 1977): Thrombozyten können eine Phagozytose durch Einlagerung von Partikel in intraplasmatische Kanälchen vortäuschen, durch die Verwechslung von Thrombozyten mit den Lymphozyten wurde diesen dann eine Phagozytoseaktivität zugesprochen.

Über die Bildungsstätten der Lymphozyten liegen keine eindeutigen Erkenntnisse vor (HOUSTON 1990). Es wird vermutet, daß die Lymphozyten aus Stammzellen im Thymus heranreifen und noch vor seiner Involution - zum Zeitpunkt der Sexualreife - andere lymphomyeloide Organe besiedeln (ELLIS 1977, ELLIS 1989, HOUSTON 1990, FÄNGE 1994). Während der Thymusinvolution wird das Lymphoidgewebe durch Bindegewebe ersetzt, nach der Geschlechtsreife reifen die Lymphozyten in Milz und Vorniere heran (ELLIS 1977, HOUSTON

1990). Lymphozyten werden 4-5 Tage alt, bisweilen 90 Tage. T-Zellen sind langlebiger als B-Zellen (ELLIS 1977).

#### 2.1.1.2.3 MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN

Über das Vorkommen von Monozyten liegen widersprüchliche Ergebnisse vor. In einigen Fällen werden sie im Blut verschiedener Arten beschrieben, in anderen Fällen wird die Existenz der Monozyten verneint. Ein Grund hierfür besteht in der Verwechslungsmöglichkeit mit großen Lymphozyten, Metagranulozyten oder Heterophilen (BLÜM et al. 1988, HOUSTON 1990). Man geht heute jedoch davon aus, daß Blutmonozyten bei Fischen regelmäßig vorkommen und ähnliche funktionelle Stadien wie bei anderen Vertebratengruppen durchlaufen (HOUSTON 1990). Sie werden im hämatopoetischen Gewebe der Niere gebildet und in das Blut als teilweise enddifferenzierte Zellen abgegeben. Von dort besiedeln die Monozyten verschiedene Organe und treten als residente, nicht mehr teilungsfähige Makrophagen (Histiozyten) innerhalb des mononukleären phagozytären Systems (MPS) in Erscheinung (ELLIS 1989, AMIN et al. 1992, BRANSON 1993, FÄNGE 1994). Blutmonozyten stellen etwa 0.1 % der Leukozyten (ELLIS et al. 1989) und ähneln morphologisch den Monozyten der Säugetiere. Es sind relativ große Zellen von 5-10 x 14-16 µm. Der Nukleus besitzt eine exzentrische Lage, seine Gestalt ist polymorph; es kommen ovale, eingebuchtete oder hirnförmig gestaltete Kerne vor oder es wird das typische Erscheinungsbild der Säugetiermonozyten mit hufeisenförmigem Kern beschrieben. Das Zytoplasma erscheint je nach Färbemethode und Fischart flockenartig, mit feinen Granula durchsetzt, gänzlich ohne Granulation, mit Vakuolen ("white spots"), homogen oder es besitzt fein-staubartige azidophile Granula (= primäre Lysosomen); die Farbe variiert von blau bis grünlich (BLÜM et al. 1988, HOUSTON 1990, AMIN et al. 1992). Daneben werden große Makrophagen im Blut beschrieben, erkennbar an ihrem basophilen Zytoplasma und der Akkumulation von verdauter partikulärer Substanz.

Die Monozyten der Regenbogenforellen besitzen einen Durchmesser von 9-25 µm und gehören zu den größten Zellen des Blutes (BLÜM et al. 1988, AMIN et al. 1992). Sie varrieren in ihrem Erscheinungsbild und können aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit den Metagranulozyten verwechselt werden (BLÜM et al. 1988). Die Monozyten reagieren jedoch im Gegensatz zu den Granulozyten peroxidase-negativ (HAMERS 1995b). Das Zytoplasma färbt sich in der DIFF-QUICK-Färbemethode heller blau als das der Lymphozyten und zeigt oftmals eine feine Granulation (AMIN et al. 1992). In der Pappenheimfärbung ist die Basophilie des Zytoplasmas wechselhaft, enthält häufig kleine Vakuolen und besitzt keine Granulation (BLÜM et al. 1988). Der Zellkern ist von polymorpher Gestalt, das locker und feinmaschige Chromatingerüst besitzt in der panoptischen Anfärbung eine violette Farbe. Neutrophile und Monozyten verändern bei erhöhter Phagozytoseaktivität derart ihr Erscheinungsbild, daß eine weitere Differenzierung nicht mehr möglich ist. Solche Zellen werden dann allgemein als Makrophagen bezeichnet; das Zytoplasma der Zellen ist stark vakuolisiert und der Zellkern zeigt Erscheinungen der Karyolyse

(BLÜM et al. 1988). Bei Bachforellen sind Monozyten nicht beschrieben worden (BLAXHALL und DAISLEA 1973).

Makrophagen besitzen eine hohe Phagozytoseaktivität und stellen beim Fisch die wichtigste Zellen für die Eliminierung von eingedrungenen Bakterien dar (SECOMBES 1990).

In Tabelle 3 sind die Monozytenzahlen unterschiedlicher Knochenfischarten nach verschiedenen Autoren aufgelistet.

**Tabelle 3:** Normalwerte für Monozyten nach verschiedenen Autoren

Fischart	Größe	Anzahl	Autor
Karpfen	75 - 116 g	0,48 x10 <sup>4</sup> /µl (12,44 %)	LEHMANN et al. 1994
Regenbogenforellen	50 g	0,14 - 0,25 x10 <sup>4</sup> /µl	BRUNO und MUNRO 1986
	o.A.	4 %	DEUFEL und PÖLLNITZ 1977
Atlantische Lachse	20 g	0,14 - 0,25 x10 <sup>4</sup> /µl	BRUNO und MUNRO 1986
Schollen	o.A.	0,1 %	ELLIS 1976

### 2.1.1.3 THROMBOZYTEN

Definitionsgemäß werden die an der Hämostase beteiligten Zellen aller Wirbeltiere als Thrombozyten bezeichnet. Bei Säugetieren nennt man diese Zellen "Blutplättchen", um hiermit den deutlichen morphologischen Unterschied zu den Thrombozyten der anderen Wirbeltiere zum Ausdruck zu bringen (HAWKEY und DENNETT 1990). Da die Blutplättchen der Säuger keine Kerne enthalten, sind sie im engeren Sinne keine Zellen, da sie aus kernhaltigen Megakaryozyten durch Zerfall entstehen. Im Gegensatz zu den Blutplättchen der Säuger sind die Thrombozyten der Vögel, Reptilien und Fische deutlich größer und kernhaltig (HAWKEY und DENNETT 1990, AMIN et al. 1992). Wie bei allen anderen Wirbeltiergruppen nehmen die Thrombozyten der Fische an der Blutgerinnung teil (ELLIS 1977, AMIN et al. 1992), der genaue Mechanismus der Blutgerinnung ist bei Fischen nicht bekannt (FÄNGE 1994).

Ohne Anwendung eines Koagulans und in nach Romanowsky gefärbten und fixierten Blutausrichen unterscheidet ELLIS (1977) vier verschiedene Thrombozytenformen: stachelförmige, spindelförmige und ovale Formen mit erhaltenem Zytoplasma sowie Thrombozyten ohne Zytoplasma. Bei dieser Form ist nur noch der Kern sichtbar ("lone nucleus"). Thrombozyten von ovaler oder tränentropfenartiger Gestalt stellen Jugendformen dar, lange spindelförmige Zellen sind alte, ausgereifte Zellen (ELLIS 1977). In der Romanowskyfärbung sind im Zytoplasma der Jugendformen tiefblaue und runde, bei alten Thrombozyten rosafarbene

Granula sichtbar. Zwischenformen enthalten lichthellblaue Granula. ELLIS (1977) macht darauf aufmerksam, daß die diagnostische Interpretation solcher Granulationen nicht überbewertet werden darf, auf Mikrophotographien sind sie zum großen Teil nicht sichtbar.

HOUSTON (1990) teilt die in der Literatur beschriebenen Thrombozyten in zwei Grundformen ein: zum einen kleine, runde bis ovale Formtypen, die Jugendstadien darstellen und zum anderen die reifen, spindelförmigen oder tränentropfenähnlichen, etwa 5 x 15 µm großen Thrombozyten. In der Romanowskyfärbung besitzen die runden Zellen einen dunkel-violetten Zellkern mit einem schmalen, rosafarbenen Zytoplasmasaum. Diese Stadien werden häufig mit Lymphozyten verwechselt. Das Zytoplasma ausgereifter Zellen erscheint demgegenüber hellblau, die Granula färben sich azurophil an. Die Kernformen der Thrombozyten variieren. Bei Welsen (*Ictalurus punctatus*) konnten WILLIAMS und WARNER (1976) runde, ovale, eingebuchtete, zweifach gelappte oder U-förmige Kernformen feststellen.

Bei Regenbogenforellen existieren runde oder ovale Thrombozyten, die als Blastenstadien angesehen werden. Sie besitzen einen schmalen Zytoplasmasaum und einen in der Pappenheimfärbung dunkelvioletten Zellkern, der oftmals eine leichte Einkerbung besitzt (BLÜM et al. 1988). Mit zunehmender Reifung strecken sich die Zellen und nehmen dann die typische, spindelförmige Gestalt an. Oftmals werden pseudopodienartige oder dünn-fadenförmige Fortsätze ausgebildet, die bei Wundschließung ein dichtes Netz ausbilden. Spindelförmige Thrombozyten können verschieden lange Fortsätze ausbilden, die wahrscheinlich verschiedenen Funktionszuständen entsprechen (BLÜM et al. 1988). AMIN et al. (1992) unterscheiden bei Regenbogenforellen runde, ovale und langgestreckte Thrombozyten, in seltenen Fällen sind Thrombozyten mit langen, schwanzförmigen Zytoplasmaausläufern im fixierten Blutausschlag sichtbar. Der Durchmesser der runden Thrombozyten beträgt 5 - 8 µm, der Zellkern ähnelt dem der Erythrozyten.

Bei den Karpfen existieren zwei unterschiedliche Formen, der runde bzw. ovale sowie der langgestreckte spindelförmige Thrombozyt (LEHMANN et al. 1994).

Der Bildungsort der Fischthrombozyten ist unbekannt, vermutlich werden sie in der Milz herangebildet (ELLIS 1977). Thrombozyten und Lymphozyten sollen zum einen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (Hämoblast) hervorgehen (HOUSTON 1990). Zum anderen folgerte McLEAY (1973) aufgrund der gleichen Beeinflussung der Thrombozytenzahlen durch Glukokortikoide, daß kleine Lymphozyten Vorläuferzellen der Thrombozyten darstellen. ELLIS (1977) sieht aufgrund der unterschiedlichen Funktion dieser beiden Zelltypen keinen Grund, einen gemeinsamen Ursprung anzunehmen.

Da die Thrombozyten oftmals mit den Lymphozyten verwechselt werden, schwanken die Angaben ihrer Anzahl im Fischblut (ELLIS 1977, BLÜM et al. 1988, HOUSTON 1990, ANIM et al. 1992). Zudem wird die Zuordnung der Thrombozyten zu den Leukozyten unterschiedlich gehandhabt.

Den Fisch-Thrombozyten wurde eine phagozytotische Aktivität, ähnlich wie bei den Blutplättchen der Säugetiere, zugesprochen (FÄNGE 1968, FERGUSON 1976). ELLIS (1977) konnte jedoch zeigen, daß eine Phagozytose von Kohlenstoffpartikeln aufgrund einer passiven

Einlagerung in die intraplasmatischen Kanälchen vorgetäuscht wurde; Fischthrombozyten sind von feinsten kommunizierenden Kanälchen durchsetzt, die an der äußeren Membran in Fenestras münden. Tabelle 4 zeigt einen Überblick über die Zahl der Thrombozyten bei verschiedenen Fischarten.

Die Zuordnung der Thrombozyten zu den Blutzellen wird unterschiedlich gehandhabt: HOUSTON (1990), LAGLER et al. (1977) sowie BOND (1996) zählen die Thrombozyten zu den Leukozyten. AMIN et al. (1992) fassen die Thrombozyten neben Erythrozyten und Leukozyten als eigenständige Zellpopulation auf. Auch LEHMANN et al. (1994) berechnet die prozentuale Verteilung der Leukozyten ohne die Thrombozyten.

**Tabelle 4:** Normwerte für Thrombozyten nach verschiedenen Autoren.

Fischart	Größe	Anzahl	Autor
Regenbogenforellen	junge Fische	1 - 6 %	AMIN et al. 1992
	50 g	0,05 - 0,14 x10 <sup>4</sup> /µl	BRUNO und MUNRO 1986
	o.A.	3,40 x10 <sup>4</sup> /µl	DEUFEL und PÖLLNITZ 1977
Atlantische Lachse	20 g	0,003 - 0,070 x10 <sup>4</sup> /µl	BRUNO und MUNRO 1986
	50 g	1 %, bezogen auf Leukozyten	ESPELID et al. 1996
Karpfen	75 - 116 g	2,00 x10 <sup>4</sup> /µl	LEHMANN et al. 1994

o.A. ohne Angaben

### 2.1.2 BLUTPLASMA

Das Fischplasma bzw. -serum besitzt eine ähnliche Zusammensetzung wie die der anderen Vertebratengruppen (AMIN et al. 1992). Die physiologischen Konzentrationen im Sinne von "Normalwerten" variieren stark und sind von verschiedenen Faktoren abhängig. HILLE (1982) gibt für Regenbogenforellen eine Übersicht über die Normalwerte verschiedener Blutplasmametabolite. So ist z.B. die Plasmaprotein- bzw. Serumkonzentration von der Fischart, dem Ernährungszustand, der Fangmethode, der Art der Blutentnahme und von der Einwirkung von Stressoren abhängig (BOUCK und BALL 1966, CUNJAK 1988, LAIDLEY und LEATHERLAND 1988, SCHÄPERCLAUS et al. 1990). Sie schwankt bei Knochenfischen zwischen 2 und 6 g/100 ml Blut (ELLIS et al. 1989), wobei die Konzentrationen für Albumin 1.40, für Fibrinogen 1.17 bis 2.43 g/100 ml ausmachen (HILLE 1982). Für die Feststellung von Konditionsmängeln hat sich die Bestimmung der Gesamtserumproteine besonders bewährt, da sie viel früher auf Mängel hinweist als die äußere Begutachtung (SCHÄPERCLAUS et al. 1990). Je schlechter der Ernährungszustand ist, desto geringer sind die Gesamtserum-Eiweißkonzentrationen. SCHÄPERCLAUS et al. (1990) geben für gut ernährte

Regenbogenforellen 5, für mittelgradig ernährte Tiere 4.0 bis 4.9 und für Tiere mit schlechtem Ernährungszustand < 4 g Gesamteiweiß/100 ml Serum an.

Die Plasma-Aminosäurekonzentrationen bei Salmoniden sind etwa dreimal so hoch wie beim Menschen (STEFFENS 1985, PETRIDES 1990). Sie betragen für Regenbogenforellen 6.43 mmol/l (essentielle Aminosäuren), der Gesamtgehalt beträgt 10 bis 11 mmol/l (HILLE 1982).

Die ionale Zusammensetzung des Fischserums entspricht weitgehend der des Menschen, die Schwankungsbreite der wichtigsten Elektrolyte als essentielle bzw. lebensnotwendige Bausteine ist gering (HILLE 1982). Tabelle 5 zeigt beispielhaft die Serumzusammensetzung von Bachforellen, Regenbogenforellen und Großen Maränen (*Coregonus lavaretus*) (HILLE 1982, PUND 1983, ELLIS et al. 1989, WEDEMEYER et al. 1990, RIVA und FLOS 1993).

**Tabelle 5:** Ionale Zusammensetzung von Fischblut

Elektrolyt-Konzentrationen [mg/100 ml Blut]	Bachforellen	Maränen	Regenbogenforellen
Chlorid	424	410 ± 16	298 - 468
Natrium	358	337 ± 29	292 - 375
Magnesium	2,3	-	1,34 - 5,10
Kalium	20,10	17,3 ± 4,1	4,1 - 44,18
Kalzium	12,5	-	5,2 - 25,7

Die Energiemetaboliten Glucose und Laktat zeigen eine starke Variation, die Standardabweichung beträgt für Regenbogenforellen oftmals 50 % des Mittelwertes (HILLE 1982). Für Regenbogenforellen variieren sie für Glucose zwischen 26 und 128, für Laktat zwischen 1,4 und 17,3 mg/100 ml Plasma. Bachforellen zeigen eine Plasmaglukosekonzentration von 71 mg/100 ml Plasma. Die Ketonkörper- und Pyruvatkonzentrationen liegen für Regenbogenforellen zwischen 0,3 und 1,0 bzw. 0,29 und 0,45 mg/100 ml Plasma.

Über die Fettkonzentrationen existieren nur wenige Angaben (HILLE 1982). Sie schwanken bei Regenbogenforellen zwischen 960 und 4700 mg/100 ml Blutplasma. Im Gegensatz zu Säugern besitzen Forellen höhere Phospholipidkonzentrationen, sie liegen zwischen 461 und 825 mg/100 ml Plasma. Für dieselbe Fischart gibt HILLE (1982) Normalwertkonzentrationen für Cholesterin von 161 bis 365 sowie für Triglyceride von 107 bis 603 mg/100 ml Blutplasma an.

Die Osmolalität beträgt für Bachforellen 306, für Große Maränen 274 und für Regenbogenforellen 288 bis 339 mosm/kg (PUND 1983, ELLIS et al. 1989, WEDEMEYER et al. 1990, RIVA und FLOS 1993).

Der Blut-pH-Wert bei Fischen wird wie bei Säugetieren über das Bikarbonat/Kohlendioxid-System reguliert. HILLE (1982) gibt für Regenbogenforellenplasma Normal-pH-Werte zwischen 7.1 und 7.9 an, HEMING (1989) 8,03.

Die Plasma-Metabolitkonzentrationen schwanken in Abhängigkeit von Umweltfaktoren, Versuchsbedingungen, endogen-circadianen Rhythmen sowie Stressoren. HILLE (1982) zählt diejenigen Umweltfaktoren und endogenen Rhythmen auf, die die Plasmakonzentrationen verschiedener Metabolite beeinflussen können. Hierzu gehören das Gewicht, Geschlecht, Photoperiode, Ernährung und endogen circadiane Rhythmen.

## 2.2 METHODEN DER BLUTUNTERSUCHUNGEN BEI FISCHEN

### 2.2.1 BLUTENTNAHMETECHNIKEN BEI FISCHEN

Für die routinemäßige Blutentnahme wird die Blutentnahme aus der A. et V. caudalis oder dem Herzventrikel bevorzugt. Daneben werden je nach Versuchszweck verschiedene Methoden angewendet. LEHMANN und STÜRENBERG (1980), HOUSTON (1990) sowie IWAMA und ISHIMATSU (1994) geben hierüber Übersichtsdarstellungen.

SCHÄPERCLAUS et al. (1990) geben an, daß pro 100 g Fischgewicht maximal 1 ml Blut entnommen werden darf (1 %), nach ROWLEY (1990) sollte 0.5 - 1 ml Blut pro 200 g Gewicht und Woche (= 0.25 - 0.50 %) nicht überschritten werden. LEHMANN und STÜRENBERG (1980) geben Werte von maximal 1 - 1.5 ml bei 10 cm langen Fischen an, 250 - 300 g schwere Tiere vertragen die Entnahme von 2 - 3.5 ml Blut (0.80 - 1,75 %). CAIRNS und CHRISTIAN (1978) fanden, daß bei einer täglichen oder wöchentlichen Blutentnahme von 0,2 % des Körpergewichtes bei demselben Fisch (Regenbogenforellen) Anämien und schwere Schäden auftreten. HOFFMANN und LOMMEL (1984) entnahmen 27 cm großen Regenbogenforellen über einen Zeitraum von 22 Tagen in wöchentlichem Abstand 0,5 ml Blut. Sie konnten nur eine milde Anämie feststellen. Entnimmt man Fischen mehr als 50 % des Blutvolumen, sterben sie (BOUCK und BALL 1966).

### 2.2.2 ZÄHLUNG DER BLUTZELLEN

BARNHART (1969) und BLAXHALL und DAISLEA (1973) machten schon frühzeitig darauf aufmerksam, daß in der Fischhämatologie keine standardisierten Methoden wie in der Säugerhämatologie existieren. Die Folge ist, daß je nach gewählter Methode eine starke Variation der gemessenen bzw. berechneten Werte vorliegt.

Bei der Zählung von Leukozyten des Menschen werden die kernlosen Erythrozyten durch die in der Verdünnungslösung enthaltene Essigsäure zerstört, gezählt werden nur die Kerne der Leukozyten. Da die Erythrozyten bei Fischen kernhaltig sind, würden bei diesem Verfahren die Kerne der Erythrozyten mitgezählt werden (HOUSTON 1990, AMLACHER 1992). Aus diesem

Grunde sind elektronische Zählverfahren (Coulter Counter) bei Fischblut nicht anwendbar, man ist auf die Zählung in Hämozytometern angewiesen (HOUSTON 1990).

LEHMANN und STÜRENBERG (1981) schlagen vor, daß für die Zellzählung die Verdünnung des Blutes mit MEM (Minimal Essential Medium) erfolgen sollte, die Auswertung mit einem Phasenkontrastmikroskop. In einer späteren Untersuchung verwendeten LEHMANN et al. 1989 eine nach SHAW (1930) modifizierte Verdünnungslösung für die gleichzeitige Zählung und Differenzierung der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten.

ROBERTS und SCHLOTFELDT (1985) weisen darauf hin, daß die Standardisierung der Blutzellzählung bei Fischen mit der Färbelösung nach Dacies vorgenommen werden sollte, damit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben ist. BLAXHALL und DAISLEA (1973), BLAXHALL und HOOD (1985) sowie BRUNO und MUNRO (1986) verwendeten die Dacies'sche Verdünnungslösung für die gleichzeitige Zählung von Thrombozyten und Lymphozyten. KLONTZ (1994) verdünnte Fischblut in der Rees-Ecker-Lösung, eine geringfügig veränderte Dacies'sche Differenzierungslösung. Diese wurde von WEDEMEYER und YASUTAKE (1977) für die gleichzeitige Zählung von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten verwendet.

HUNN et al. (1992) differenzierten Thrombo-, Leuko- und Erythrozyten im Blut der Goldforelle (*Oncorhynchus aguabonita*) mit Hilfe einer aus Essigsäure und Methylgrün bestehenden Verdünnungslösung.

Für die Erythrozytenzählung kann die Verdünnungslösung nach Hendrick oder die Hayemsche Lösung verwendet werden, für die gleichzeitige Zählung der Leukozyten und Erythrozyten diejenige nach SHAW (HESSER 1960, HOUSTON 1990, SCHÄPERCLAUS et al. 1990, AMLACHER 1992). SHAW (1930) entwickelte die Färbelösung für die direkte Bestimmung bzw. Unterscheidung der Blutzellen bei Vögeln, da eine Differenzierung - ähnlich wie bei Fischen - zwischen Leuko- und Thrombozyten nur schwer möglich ist.

SECOMBES et al. (1991) benutzten als Verdünnungslösung eine heparinisierte, phosphatgepufferte Salzlösung für die Differenzierung von Erythrozyten und Leukozyten.

### 2.2.3 BESTIMMUNG DES HÄMATOKRITWERTES

Die Bestimmung des Hämatokritwertes erfolgt hauptsächlich durch die Mikrohämatokritmethode, bei der wenige µl Blut fassende Mikrokapillaren in Spezialzentrifugen zentrifugiert werden. Bei dem WINTROBE-Verfahren werden etwa 0,5 ml fassende und kalibrierte Röhrchen mit Blut gefüllt und zentrifugiert. Nach NIEPAGE (1989) sollten vor Bestimmung des Hämatokritwertes die Zentrifugationsbedingungen (Zeitdauer und Umdrehungszahlen) festgelegt werden, da sich aufgrund tierartlich unterschiedlicher Senkungsgeschwindigkeit der Blutkörperchen Unterschiede ergeben; zudem ist die Sedimentationsrate der zellulären Bestandteile des Blutes von der Erythrozytengröße sowie Dichte und Viskosität des Blutplasmas und der Zellen abhängig. PUND (1983) verwendete bei der Bestimmung des Mikro-Hämatokritwertes der Großen Maräne Umdrehungszahlen von 10000 pro Minute für 7 - 10 Minuten. KJARTANSSON et al. (1988) wählten 10000 U/min bei Atlantischen Lachsen. SCHÄPERCLAUS et al. (1990) geben für Fische drei Minuten bei 3000 U/min an.

Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über physiologische Hämatokrit- und Hämoglobinwerte bei wichtigen Nutzfischarten.

**Tabelle 6:** Hämatokrit- und Hämoglobinwerte bei verschiedenen Nutzfischarten

Fischart	Hämatokrit [%]	Hämoglobin [g/100 ml]	Autor
Karpfen	31,3 (26 - 39)	10,5 (7,1 - 13,0)	KLONTZ 1994
	30,5 ± 4,7	8,1 ± 1,6	LEHMANN et al. 1994
	33 - 35	9,7	SCHÄPERCLAUS et al. 1990
Regenbogenforellen	27,2 (13 - 42)	8,5 (5,7 - 10,3)	KLONTZ 1994
	30 - 33 (50 g)	7,9 - 9,0	BRUNO und MUNRO 1986
	41,6 (30 - 40 g)	-	WALCZAK et al. 1987
	-	9,60	LARSEN und SNIESZKO 1961
	26,3 (10-15 cm)	5,7	RIVA und FLOS 1993
Bachforellen	32,0 ± 5,5 (240 g)	5,0 ± 1,6	MILLER et al. 1983
	-	7,0	BLÜM et al. 1988
	36 - 38	8,90	SCHÄPERCLAUS et al. 1990
	32,0 (20-43) 160 g	6,9 (4,1 - 10,3) 160 g	BLAXHALL und DAISLEA 1973
Amerikanische Gelbbarsche	-	9,2	LARSEN und SNIESZKO 1961
	35,3 (24-43)	5,9-11,0	KLONTZ 1994
Atlantische Lachse	33 - 37	9,5 - 10,2	BRUNO und MUNRO 1986
Aale	35 - 45	9,0 - 11,5	SCHÄPERCLAUS et al. 1990
Große Maränen	45,0 ± 5,7	-	PUND 1983

## 2.2.4 BESTIMMUNG DER HÄMOGLOBINKONZENTRATION

Die Bestimmung erfolgt wie in der Humanmedizin einheitlich mit der Zyan-Methämoglobinmethode. Mit der Hämatinbestimmungsmethode nach SAHLI werden aufgrund der Kernhaltigkeit der Erythrozyten und der damit verbundenen Trübung bis zu 50 % höhere Werte gegenüber der Zyan-Methämoglobinmethode oder der Bestimmung des Eisens gemessen (LARSEN und SNIESZKO 1961). Die Genauigkeit der Zyan-Methämoglobinmethode beträgt 2 % im Gegensatz zur Sahli-Methode, die 40 % beträgt (HOUSTON 1990, SCHÄPERCLAUS et al. 1990).

## 2.2.5 DIE HÄMATOLOGISCHEN KENNWERTE

Anhand der Hämoglobin-Konzentration, des Hämatokritwertes und der Erythrozytenanzahl lassen sich die Erythrozytenindizes (hämatologische Kennwerte) errechnen, die eine Differenzierung verschiedener Anämieformen zulassen (PLONAIT 1980, BEGEMANN und BEGEMANN 1989, RICK 1990, KLONTZ 1994). Die Einteilung der Anämie beim Fisch erfolgt in ähnlicher Weise wie bei den Säugetieren aufgrund pathophysiologischer Mechanismen, d.h. Anämien durch Blutverluste (hämorrhagische Anämie, akut oder chronisch), hämolytische Anämien oder Anämien infolge Verringerung der Erythrozytenbildung (hypoplastische Form). Weiterhin kann eine Einteilung nach regenerativer oder nicht-regenerativer Form vorgenommen werden (FERGUSON 1989).

Es existieren drei verschiedene Kennwerte:

### **MCV (Mittleres Volumen der einzelnen Erythrozyten; Mean corpuscular volume)**

Das MCV stellt das durchschnittliche Erythrozytenvolumen des Einzelerythrozyten dar und ist somit ein Maß für die mittlere Größe (Durchmesser) des Erythrozyten. Er wird aus dem Verhältnis von Hämatokritwert und Erythrozytenanzahl errechnet. Da das mittlere Erythrozytenvolumen bei bekannter Erythrozytenzahl sowohl den Hämoglobingehalt als auch den absoluten Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten (MCH) widerspiegelt, hat sich in der angloamerikanischen Literatur das MCV als wichtigste Angabe über den aktuellen Stand des roten Blutbildes durchgesetzt (BEGEMANN und BEGEMANN 1989). Das MCV gibt Hinweise auf krankhafte Vergrößerung bzw. Verkleinerung der Erythrozyten. Nach NIEPAGE (1989) und KLONTZ (1994) lassen sich die Anämien bei Säugetieren bzw. Fischen aufgrund des Wertes in mikro-, normo- und makrozytäre Anämien einteilen.

### **MCH (Mittlerer Hämoglobingehalt der einzelnen Erythrozyten; Mean corpuscular hemoglobin)**

Der MCH drückt den mittleren Hämoglobingehalt des Einzelerthrozyten aus und wird aus dem Verhältnis der Hämoglobinkonzentration zur Erythrozytenanzahl errechnet. Nach diesem Wert werden die Anämien in hypo-, normo- und hyperchrome Anämien eingeteilt (BEGEMANN und BEGEMANN 1989, RICK 1990). Bei Anämieformen, bei denen sich der MCH nicht proportional mit dem MCV-Wert ändert, ist der MCHC ein zuverlässigerer Indikator für die Diagnose der Anämie (KLONTZ 1994).

### **MCHC (Mittlere Hämoglobin-Konzentration in den Erythrozyten; Mean corpuscular hemoglobin concentration)**

Neben dem MCH stellt der MCHC einen wichtigen Kennwert für die Diagnostik hypochromer Anämien dar (RICK 1990, KLONTZ 1994). Bei diesem Wert wird der Hämoglobingehalt in Beziehung zum Erythrozytenvolumen gesetzt, woraus sich die mittlere Sättigung des Einzel-Erythrozyten mit Hämoglobin ergibt: der Hämoglobinsättigungsindex oder die mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration der Erythrozyten (BEGEMANN und BEGEMANN 1989). Sind bei einer hypochromen Anämie der durchschnittliche Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrozyten (MCH) und das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) gleichzeitig vermindert, so kann der MCHC-Wert innerhalb physiologischer Grenzen liegen; eine erniedrigte mittlere Hämoglobinkonzentration (MCHC) ist durch ein herabgesetztes MCH bei physiologischem oder weniger stark vermindertem mittlerem Erythrozytenvolumen bedingt (RICK 1990). Denn Untersuchungen dieses Wertes bei verschiedenen Anämien zeigten, daß bei einer Reihe von hypochromen Formen die Verminderung des mittleren Hämoglobingehaltes des Einzelerthrozyten (MCH) mit einer Verkleinerung der Einzelzellen einhergehen kann, so daß die mittlere Hämoglobinsättigung (MCHC) der Einzelzelle gleichbleibt (BEGEMANN und BEGEMANN 1989).

Der MCHC-Wert stellt ein Maß für die Größe der Erythrozyten dar. Veränderungen über die Norm können eine Erythrozytenschwellung anzeigen (BOLLARD et al. 1993). Bei hyperchromen Anämien ist die mittlere Hämoglobinkonzentration in den Erythrozyten nicht erhöht, da die Anordnung der Hämoglobinmoleküle in einem definierten Zellvolumen nicht über die Norm ansteigen kann (RICK 1990). Übermäßig hohe MCHC-Werte kommen dadurch zustande, daß bei Hämolyse das Hämoglobin im Plasma mitgemessen wird, wodurch sich ein zu hoher MCHC-Betrag errechnet (PLONAIT 1980).

Nach PLONAIT (1980) werden der MCV- und MCH-Wert in der Veterinärmedizin wenig verwandt, da sie von der relativ ungenauen Erythrozytenzählung abhängig sind. Eine praktische Bedeutung hat der schnell und exakt bestimmbare MCHC-Wert. In der angloamerikanischen humanmedizinischen Literatur stellt der MCV-Wert den für die Differenzierung der verschiedenen Anämieformen bedeutendsten Kennwert dar (BEGEMANN und BEGEMANN

1989). KLONTZ (1994) sieht bei Fischen den MCHC als diagnostisch zuverlässigeren Parameter als den MCH-Wert an. Dies spielt vor allem eine Rolle, wenn die MCV- und MCH-Werte unverändert sind.

Typische Erythrozytenindizes von gesunden Fischen zeigt Tabelle 7.

**Tabelle 7:** Hämatologische Kennwerte (Erythrozytenindizes) für Fische nach verschiedenen Autoren.

Hämatologische Kennwerte		Fischart	Autor
MCV [fl]	320 ± 55	Bachforellen	WALCZAK et al. 1987
	322	Bachforellen	BLAXHALL und DAISLEA 1973
	277 ± 36	Regenbogenforellen	RIVA und FLOS 1993
	373	Karpfen	KLONTZ 1994
	200 ± 29	Karpfen	LEHMANN et al. 1994
	MCH [pg]	60,4 ± 6,3	Regenbogenforellen
	69	Bachforellen	BLAXHALL und DAISLEA 1973
	125	Karpfen	KLONTZ 1994
	52,8 ± 6,85	Karpfen	LEHMANN et al. 1994
	MCHC [g/100 ml]	22,0 ± 2,3	Regenbogenforellen
	21,4	Bachforellen	BLAXHALL und DAISLEA 1973
	33,5	Karpfen	KLONTZ 1994
	26,6 ± 3,5	Karpfen	LEHMANN et al. 1994

## 2.3 BEEINFLUSSUNG DES BLUTBILDES UND IMMUNSYSTEMS DURCH STRESSOREN

### 2.3.1 THEORETISCHE KONZEPTE ZUM STRESSPHÄNOMEN

1914 beschrieb CANNON aufgrund tierexperimenteller Beobachtungen die Mechanismen, die bei Konfrontation des Organismus mit physischen oder psychischen Belastungen einhergehen. Auf unterschiedliche Anforderungssituationen reagiert der Organismus mit einer Erregung des sympathischen Nervensystems bei gleichzeitiger Hemmung des Parasympathikus. Die Erregung führt zu einer Ausschüttung des lokal wirksamen Hormons Adrenalin, zu einer Erhöhung der Herzfrequenz, zu einer Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Körpers, einer Erhöhung der Blutversorgung von Muskulatur und Leber und der Freisetzung von Glukose durch die Leber.

Der Endokrinologe SELYE (SELYE 1936, 1950, 1956) erweiterte den Ansatz von CANNON, indem er auch längerfristige körperliche Veränderungen nach Dauerbelastung in seine Betrachtungen einbezog. SEYLE unterschied zwischen einem schädigenden Reiz, dem Stressor, und dem **Zustand** des Lebewesens unter Einwirkung dieses Reizes, dem Stress. Anhand tierexperimenteller Befunde beschrieb er das Allgemeine Adaptations-Syndrom (AAS) mit identischen morphologischen, funktionellen und biochemischen Veränderungen als Reaktion des

Körpers auf Stressoren unterschiedlichster Art (Kälte, Hitze, Intoxikationen). Die Stressreaktion verläuft in drei Phasen: Alarmphase, Widerstandsphase und Erschöpfungsphase (SELYE 1950).

Ein Wandel der Seyle'schen Stress-Definition erfolgte in der für Warmblüter 1966 entwickelten kognitiven Stresstheorie von LAZARUS (SCHEDLOWSKI 1994). Hierbei wurde Stress als jedes Ereignis definiert, in dem exogene und endogene Anforderungen die Anpassungsfähigkeiten eines organischen Systems beanspruchen oder übersteigen. Der Begriff Stress kennzeichnet somit den **Prozeß der Anpassung an externe oder interne Stimuli**, wobei der subjektiven Bewertung von Situationsanforderungen sowie der Einschätzung der eigenen Kapazität zur Bewältigung der Anforderung eine zentrale Rolle zukommt. LEVINE und URSIN (1991) versuchten, Stress aus endokrinologischer (Seyle), neurophysiologischer und kognitiver (Lazarus) Sicht als integralen Bestandteil eines adaptiven biologischen Systems zu definieren. Um der terminologischen Verwirrung in der Verwendung des Streßbegriffs zu entgehen, differenzierten URSIN und OLFF (1993) den **Streßstimulus**, das **stressverarbeitende System** und die **Streßantwort**. Dieses Streßkonzept orientiert sich hauptsächlich an psychisch-emotionalen Belastungssituationen beim Menschen. Innerhalb von Millisekunden ändert sich der Aktivierungszustand des Gehirns mit nachfolgender Erhöhung des Sympathikotonus und der Sezernierung von Katecholaminen. Nach wenigen Sekunden erreichen Releasinghormone vom Hypophysenvorderlappen die Hypophyse und regen sie zur Ausschüttung von Hormonen an. Voll ausgeprägt ist die endokrin vermittelte Streßantwort 10 Minuten nach dem Streßstimulus, noch später reagieren immunologische Funktionen (SCHEDLOWSKI 1994). In diesem von URSIN entwickeltem Streßmodell stellt Stress ein Prozeß von Transaktionen dar. Die Streßantwort aktiviert den Organismus, die Quelle der Belastung durch adäquates Verhalten zu beseitigen. Die stressverursachte Aktivierung braucht per se nicht zu pathologischen Prozessen führen; nur wenn die Aktivierung länger andauert, führt dies zu einer Störung der Homöostase, zu einer Verringerung der Widerstandskraft und zu somatischen Konsequenzen (SCHEDLOWSKI 1994).

SCHEDLOWSKI (1994) zog in seinen Untersuchungen zum Streßkonzept neben den klassisch endokrinologischen und neuronalen Untersuchungen die Veränderungen des zellulären Immunsystems mit ein (psychoneuroimmunologischer Ansatz). Akuter Stress führte hierbei über die Katecholaminwirkung zu einem sprunghaften Anstieg der Natural Killer Cells (NKC), der T-Zellen im peripheren Blut sowie des funktionellen Zustandes der NKC (erhöhte zytotoxische Aktivität). Katecholamine scheinen hierbei die Migration der NKC rezeptorvermittelt zu beeinflussen, wobei indirekte Effekte von Zytokinen und Neuropeptiden nicht auszuschließen sind. Die katecholamininduzierte Stimulierung der NKC scheint über alpha-adrenerge Rezeptoren auf die Lymphozyten vermittelt zu werden. Eine Stunde nach einem akuten Streßgeschehen fällt die Aktivität der Lymphozyten auf die Ausgangswert ab und kann noch bis zu 3 Tagen vermindert sein.

Die beobachtete Sezernierung von NKC aus der Milz und lymphatischen Organen in das periphere Blut sowie die erhöhte zytotoxische Aktivität interpretiert SCHEDLOWSKI (1994) als

Teil des von SEYLE erarbeiteten Streßkonzeptes. Der Organismus wird so auf eine potentielle Verletzung während eines Kampfes oder auf der Flucht vorbereitet, zumal NKC als Teil des unspezifischen Abwehrsystems die erste Linie gegenüber eingedrungenen Pathogenen darstellt. SCHEDLOWSKI (1994) wies durch Katecholaminapplikationen nach, daß immunmodulatorische Wirkungen durch diese Botenstoffe schon nach Minuten bzw. Sekunden auftreten können, und nicht wie bisher angenommen, nach Stunden oder Tagen. Auch die Verminderung der Lymphozytenzahlen und ihrer Funktion, die noch Tage nach einem akuten Streßgeschehen festzustellen sind, sind nicht im Zusammenhang mit einer gleichzeitig erhöhten Krankheitsinzidenz zu sehen. Genausogut könnte durch eine Streßsituation eine größere Flexibilität des Immunsystems erreicht werden, das sich dann leichter an veränderte Umweltkonstellationen anpaßt, womit langfristig die Immunkompetenz gestärkt würde.

### 2.3.2 STRESSKONZEPTE UND STRESSDEFINITIONEN BEI FISCHEN

GRONOW (1974) verglich in eigenen Untersuchungen und anhand von Literaturdaten die Reaktionen von Knochenfischen und Säugetieren auf extreme Reize (Stressoren). Er kam zu dem Schluß, daß der für die Säuger erarbeitete Seyle'sche Streßbegriff auch für Fische anwendbar ist. Die Reaktionen des sympathiko-adrenalen Systems und der Hypothalamus-Hypophysen-Interrenal-Achse bei Konfrontation von Knochenfischen mit einem Stressor verläuft prinzipiell ähnlich wie bei Säugetieren. In Anlehnung an die von SEYLE entwickelte Streßtheorie definiert GRONOW (1974) Stress als **Belastungszustand** eines Knochenfisches unter dem Einfluß extremer endogener und exogener Reize; als Streßeffekte bezeichnete er die durch einen erhöhten Sympathikotonus und Aktivitätszustand der Hypophysen-Interrenal-Achse verursachten Symptome.

GRONOW (1974) und SINDERMANN (1984) machten darauf aufmerksam, daß die Definition von Stress in der Literatur oft mißverstanden oder mißinterpretiert wurde. Der Terminus "Stress" wird oftmals dem Begriff "Stressor" gleichgesetzt oder wird als die Antwort des Fisches auf einen Stressor verstanden (WEDEMEYER und McLEAY 1981).

In seiner ursprünglichsten Definition, die erstmals von SELYE (1950) aufgestellt wurde, stellt Stress einen **Zustand** des Organismus dar, der aufgrund von auf das Tier einwirkenden Reizen entsteht. Es werden kompensatorische Mechanismen wirksam, die der Organismus einsetzt, um sein "Gleichgewicht" gegenüber veränderter Umweltbedingungen aufrechtzuerhalten: Stress kann als die Summe aller physiologischen Reaktionen des Körpers auf jede an ihn gestellte Anforderung (physikalischer und chemischer Natur) aufgefaßt werden, um den "normalen" Metabolismus aufrechtzuerhalten bzw. wiederherzustellen (SELYE 1950). BRETT (1958) definierte Stress als einen **Zustand**, der durch die Umwelt oder andere Faktoren hervorgerufen wird, die die adaptiven Mechanismen des Organismus soweit überbeanspruchen oder stören, daß das Überleben signifikant gefährdet ist. ESCH et al. (1975) kritisierten die von SELYE (1950) aufgestellte Definition, da sie u.a. biotische Faktoren, wie Populationsdichte oder

interspezifisch auftretende Aggressionen der Organismen vernachlässigte. Zudem ging SELYE nach ihrer Meinung nicht auf das Vorkommen von Stress in Populationen oder Ökosystemen ein. ESCH et al. (1975) definierten Stress deshalb als eine **Wirkung** von Kräften, die das innere Gleichgewicht oder stabilisierende Mechanismen des Organismus überbeanspruchen, unabhängig von der biologischen Organisation (Pflanzen, Pilze, Tiere). GRONOW (1974) vereinfachte den Begriff Stress und definierte ihn als eine auf das Tier extrem einwirkende **Belastung**, die äußerlichen oder endogenen Ursprungs sein kann (s.o.). Nach PETERS et al. (1980) stellt Stress eine **körperliche Störung** des Tieres dar, die infolge ungünstiger chemischer, physikalischer, psychisch-emotionaler oder ernährungsphysiologischer Bedingungen entsteht. WEDEMEYER und McLEAY (1981) kritisierten, daß der Selye'sche Streßbegriff nur die negativen Auswirkungen auf das Individuum beschreibt, nicht aber die Vorteile für eine Population. Überbesatz kann zu stressinduzierter erhöhter Mortalität führen, so daß mehr Raum und Futter für die übrigen Individuen der Population zur Verfügung steht. Dies wiederum erhöht die Überlebensrate. WEDEMEYER und McLEAY (1981) definieren Stress, im speziellen Fall den "Umweltstress", als die **Wirkung** von Veränderungen der Umwelt, die die Regulativen für die Stabilisierung der Homöostase stören. Stressoren wiederum sind Änderungen der Umweltbedingungen, die in Abhängigkeit von ihrer Stärke, eine "physiologische" Antwort des Individuums, einer Population oder Ökosystems hervorrufen. SINDERMANN (1983, 1984) faßt den Begriff Stress als die **Summe morphologischer und biochemischer Veränderungen** sowie Verhaltensveränderungen auf, die durch Stressoren hervorgerufen werden. Der Begriff "Stressor" oder "Stressfaktor" sollte nach PICKERING (1981) nur diejenigen Faktoren darstellen, die eine kompensatorisch-regulative Antwort des Organismus hervorrufen.

BARTON und IWAMA (1991) faßten die bis heute verwendeten Streßdefinitionen bei Fischen zusammen. Stress umfasst zum einen nur die biochemischen, physiologischen Änderungen und Verhaltensveränderungen gegenüber physikalischen, chemischen oder biologischen Umweltfaktoren. Zum anderen wird Stress als solche **Reaktionen** des Organismus verstanden, die das Überleben der Art reduzieren. Eine allgemeingültige Definition des Phänomens Stress beinhaltet die Reaktion bzw. Antwort des Tieres auf einen Stimulus, wobei diese Antwort die Homöostase des Fisches verändern kann. KORT (1994) veranschaulichte, daß Stress, unter dem Aspekt pathophysiologischer Untersuchungen als **Reaktion** des Körpers gegenüber Infektionen oder verschiedener schädlicher Einflüsse zu interpretieren ist, um seine Homöostase ("physiologisches Gleichgewicht") aufrecht zu erhalten. BARTON und IWAMA (1991) und KORT (1994) verwenden zwei unterschiedliche Konzepte der Streßdefinition. Der Stimulus, der eine Reaktion hervorruft, wird "Stressor" oder "Stress" genannt; dies beinhaltet, daß nicht nur die Reaktion des Organismus als Stress verstanden werden muß, sondern den Stimulus darstellt, der zu einer Belastung des Organismus oder Ungleichgewicht der Homöostase führt.

Stress stellt einen **Zustand** dar, der durch den Stressor hervorgerufen wird und die Homöostase beeinflußt (BARTON und IWAMA 1991). Der Zustand "Stress" kann nicht quantifiziert werden, aber die Antwort auf diesen. Stress selber ist ein **Zustand der verminderten Fitness**, induziert durch einen Stressor. Eine Streßantwort ist eine Veränderung

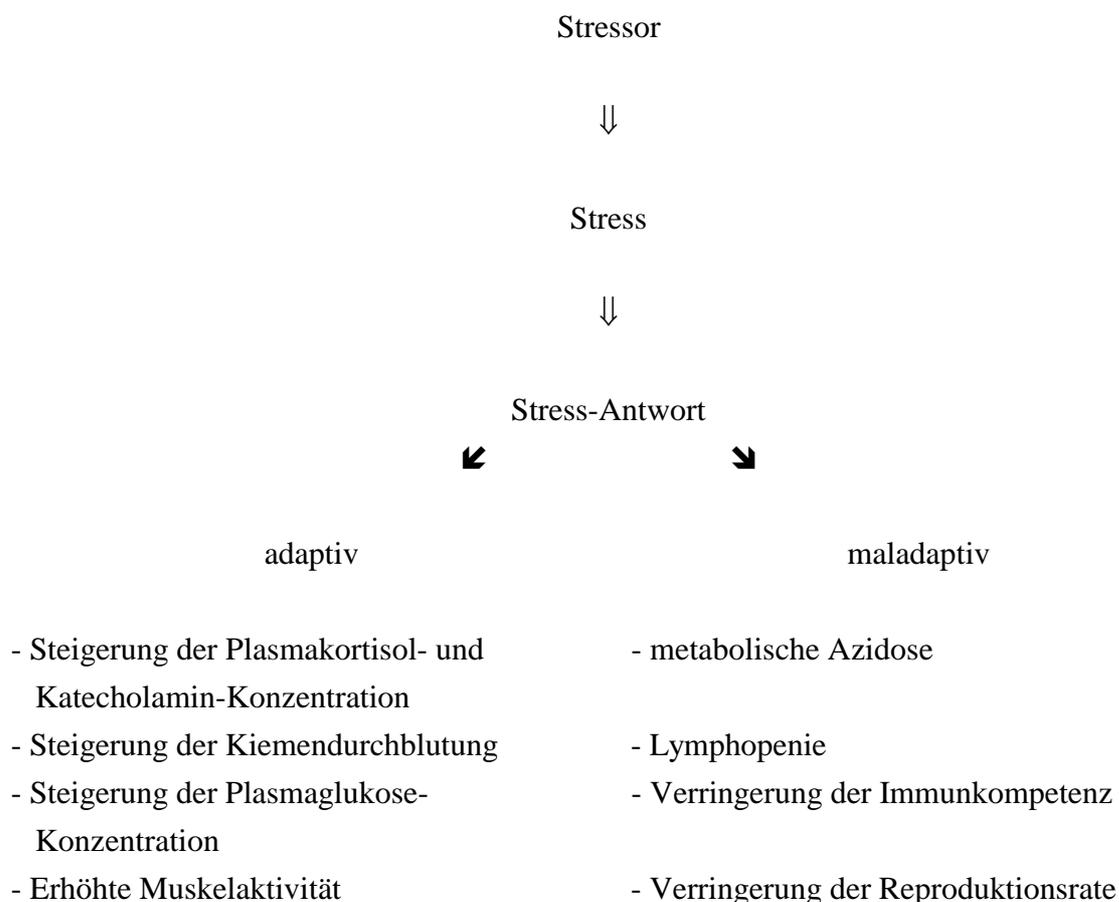
des biologischen Zustandes über den Gleichgewichtszustand hinaus, der eine Bedrohung für die Gesundheit und das Wohlempfinden des Fisches darstellt und die Homöostase belastet.

Die Wirkung eines Stressors hängt von der Intensität der Anforderung ab, die an die Anpassungsfähigkeit des Körpers gestellt wird. Werden die Adaptationsmechanismen des Organismus überlastet, so ist die Antwort auf den Stressor von Nachteil für das Tier, d.h. sie ist maladaptiv. Meßbar sind hierbei Verlust von Ionen, metabolische Acidose, Abnahme der Blut-Lymphozyten, verminderte Immunkompetenz oder Wachstumsverlangsamung (BARTON und IWAMA 1991). Ist die Anpassungsfähigkeit erschöpft, stirbt das Individuum. Typische adaptive Reaktionsmuster der Fische sind nach BARTON und IWAMA (1991) ansteigende Plasmakortisolwerte, Katecholaminausschüttung mit erhöhter Kiemendurchblutung, steigende Blutglukose-Konzentrationen (Hyperglycämie) und Muskelaktivität.

Die Streßreaktion ermöglicht also dem Organismus, sich an eine belastende Situation anzupassen. Ein Stressor kann diese Fähigkeit jedoch einschränken und dann nahezu ungehindert wirken (OIDTMANN 1994). Bei Fischen spielen artifizielle, d.h. vom Menschen verursachte Stressoren eine besondere Rolle (ANDERSON 1990). Beispiele hierzu sind Transport, Sortieren, Umsetzen oder die Masthaltung von Fischen. Hier kann es notwendig sein, Fische durch geeignete Maßnahmen, z.B. durch Sedation, vor ihrer eigenen Streßreaktionen zu schützen (OIDTMANN 1994).

Abb. 1 (S. 41) stellt das Beziehungsgefüge zwischen Stressor, Stress und der adaptiven bzw. maladaptiven Antwort des Fischorganismus dar (nach BARTON und IWAMA 1991).

Abb. 1: Beziehungsgefüge zwischen Stressor, Stress und der adaptiven bzw. maladaptiven Antwort des Fischorganismus.



### 2.3.3 DAS ALLGEMEINE ADAPTATIONSSYNDROM

Ein Fischorganismus, auf den Stressoren einwirken, durchläuft ebenso wie die höheren Vertebraten nach dem Seyle'schen Streßkonzept drei verschiedene Phasen, die im Allgemeinen Adaptationssyndrom (AAS) zusammengefaßt werden (WEDEMEYER 1970, GRONOW 1974, ROBERTS 1989, WEDEMEYER et al. 1990, BARTON und IWAMA 1991):

1. Alarmphase
2. Resistenzphase mit Anstieg der Widerstandsfähigkeit
3. Erschöpfungsphase

Das Einwirken eines Stressors in der Alarmphase führt zu einer Aktivierung des Hypothalamus (HT), nachfolgend reagiert der Organismus auf zweierlei Weise (SINDERMANN 1984, PETERS 1988, WEDEMEYER et al. 1990): Zum einen kommt es über die Stimulierung des HT zu einer Steigerung des Sympatikotonus, die nach Überschreiten einer gewissen Intensität zur erhöhten Ausschüttung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmarkäquivalent führt.

Diese Zellen sind je nach Fischart in verschiedenen Geweben lokalisiert, hauptsächlich in der Kopfniere (chromaffine Zellen der Vor- bzw. Kopfniere, Interrenalgewebe). Die chromaffinen Zellen sind sympathisch innerviert und geben innerhalb kürzester Zeit Adrenalin in das periphere Blut ab. Dieser Mechanismus, einem Stressor zu begegnen, entspricht dem Cannon'schen Modell der Notfallreaktion. Zum anderen führt ein Stressor zur Aktivierung des Hypothalamus (PETERS 1988). Dieser Teil des Mesencephalon sezerniert über die Blutbahn das Corticotropin Releasing Hormon (CRH), das die  $\epsilon$ -Zellen der Hypophyse zur Abgabe des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) veranlaßt. GRONOW (1974) spricht bei Fischen von der Aktivierung des präoptiko-hypophysären Systems, entsprechend dem hypothalamo-hypophysären Systems der Säuger. ACTH als gonadotropes Hormon stimuliert wiederum die Abgabe von Kortikosteroiden aus dem Interrenalorgan (Suprarenalorgan), dem Nebennierenrindenäquivalent der Fische. Das überwiegende Sekretionsprodukt des Interrenalorgans ist bei Knochenfischen Kortisol (HANKE 1970). Neben der Aktivierung der CRH-ACTH-Kortisol Achse wird bei Fischen eine Mitbeteiligung der TRH (Thyrotropin Releasing Hormon)-MSH (melanozytenstimulierendes Hormon) -Kortisol-Achse im Streßgeschehen diskutiert (SUMPTER et al. 1985, 1986, VERBURG-KEMENADE et al. 1994). VERBURG-KEMENADE et al. (1994) wiesen für Karpfen nach, daß die CRH-ACTH-Achse vor allem bei kurz einwirkenden Stressoren, bei chronischem Stress jedoch die TRH-MSH-Achse aktiviert wird. Ein von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildetes IL-1 ähnliches Molekül stimuliert die Sezernierung von MSH über einen Rückkopplungsmechanismus; aufgrund dessen nimmt die Kortisolkonzentration im Organismus zu. Die Kortisolkonzentration wird also nicht nur über die ACTH-Regulation geregelt, sondern auch über MSH. SCHRECK et al. (1989) postulieren eine weitere Kortisolregulation über Gonadotropine, die wie ACTH eine starke Wirkung auf das Interrenalgewebe, des Bildungsortes der Steroide, besitzen. Es existieren zwischen den einzelnen Hormonen Wechselbeziehungen (PICKERING 1990). Es wird eine Regulation der Kortikosteroid-Konzentration über Katecholamine angenommen (AXELROD und REISINE 1984, BARTON und IWAMA 1991). Der Thyroxinanstieg, der bei Fischen nach akut einwirkenden Stressoren beobachtet wird, wird auf die Wirkung steigender Katecholaminkonzentration zurückgeführt (EALES et al. 1986). Kortisol stimuliert die Ausschüttung des Wachstumshormons GH (growth hormone) aus der Hypophyse von Tilapien (*Oreochromis mossambicus*) (NISHIOKA et al. 1985) in vitro, währenddessen das Growth Hormone (GH) wiederum das Interrenalgewebe gegenüber ACTH sensibilisieren kann (YOUNG et al. 1989). Die bei Säugern über Kortisol vermittelte erhöhte Prolaktinausschüttung bei Stress wurde bei Fischen nicht beobachtet (PICKERING 1990).

In der Alarmphase werden durch die Katecholaminwirkung die Herzschlag- und Atemfrequenz erhöht, die die Angriffs- und Fluchtreaktionen ermöglichen (PETERS 1988). Kortisol bewirkt eine Aktivierung des Kohlenhydratstoffwechsels, indem vermehrt Glukose aus den Glykogenreserven der Leber als Energiespender zur Verfügung gestellt wird.

Dauert die Einwirkung des Stressors an, so kommt es über kompensatorische Mechanismen zu einer Steigerung der Widerstandsfähigkeit und zu einer Adaptation des Organismus an die

Anforderungssituation. In dieser Resistenzphase kann jedoch die Adaptationskapazität des Organismus überfordert werden (WEDEMEYER et al. 1990).

Bei lang andauernder, sehr starker oder wiederholter Belastung des Organismus können in der Erschöpfungsphase die Mechanismen, die die Homöostase aufrechterhalten, nachteilig für das Tier sein, die kompensatorischen Veränderungen werden "maladaptiv" (FLOS et al. 1988, WEDEMEYER et al. 1990, BARTON und IWAMA 1991). schließlich führt dies zu für das Tier physiologisch wie verhaltensbiologisch negativen Effekten (WEDEMEYER et al. 1990, BARTON und IWAMA 1991). Typische Beispiele hierfür sind Abnahme der Blutlymphozyten, verminderte Immunkompetenz oder Wachstumsreduktion (BARTON und IWAMA 1991).

Die auf Stressoren folgenden neuroendokrinen Veränderungen werden als primäre, die Folgen der Hormonwirkung auf den Intermediär-Stoffwechsel als sekundäre Antworten des Organismus bezeichnet (MAZEAUD et al. 1977). Die tertiäre Streßantwort stellt die Folgen der primären und sekundären Wirkungen dar (WEDEMEYER et al. 1990).

#### 2.3.4 EINTEILUNG VON STRESS BZW. STRESSOREN

Neben den unspezifischen Reaktionen des Organismus, die bei jeder Einwirkung von Stressoren auftreten, gibt es spezifische Antworten, die von der Art des Stressors abhängen (SELYE 1950, KORT 1994). Daneben wird Stress nach der Natur und Schwere eingeteilt; so kann akuter vom chronischen Stress unterschieden werden, vermeidbarer und unvermeidbarer sowie schwerer und milder Stress (KORT 1994). Unvermeidbare Stressoren stellen z.B. in der Natur vorkommende Temperaturschwankungen in Seen oder endogene Rhythmen dar, wie z.B. das Laichen oder Abwandern der Salmoniden in das Meer. Für BARTON und IWAMA (1991) sind solche Ereignisse keine Stressoren im eigentlichen Sinne, nach ANDERSON (1990) sind sie "natürliche" Stressoren. Akute Streßreaktionen sind nach ADAMS (1990) die Folge einzelner oder mehrfacher Exposition auf einen Stressor. Chronischer Stress sei dagegen häufiger und resultiere aus einer kontinuierlichen oder immer wiederkehrenden Auseinandersetzung gegenüber milden Stressoren über eine gewisse Zeit oder Jahren. Chronisch auf Fische einwirkender Stress ist z.B. die Haltung von Fischen im Wasser mit unzureichender Qualität oder Überbesatz. Fische, die in Gefangenschaft gehalten werden, zeigen im allgemeinen höhere Kortisolwerte (BOLLARD et al. 1993). Nicht vermeidbare Stressoren, wie z.B. das in der Praxis häufig vorkommende Umsetzen oder Sortieren der Fische ("handling stress") stellen akute Stressoren dar (PICKERING et al. 1982, FLOS et al. 1988).

In der Literatur wird oftmals eine Benennung nach der Art des Stimulus bzw. Stressors gegeben: Eine häufige Blutentnahme bei Fischen stellt einen "hämorrhagischen" Stress dar (CAIRNS und CHRISTIAN 1978), die Einwirkung von Wasserschadstoffen auf den Fischorganismus "chemischer Stress" oder "Schadstoff-Stress" (SINDERMANN 1984, BARTON

und IWAMA 1991, SIWICKI und STUDNICKA 1992). Ein plötzliches Umsetzen von Fischen in kaltes Wasser ist "Kältestress" (AGRAWAL und SRIVASTAVA 1978), eine progrediente Temperaturerhöhung "Hitze stress" (HOUSTON und KOSS 1984). GILES et al. (1984) sprechen bei Haltung von Fischen in übersäuertem Wasser von "Säure stress". Weiterhin gibt es Formen, hervorgerufen durch traumatische Einwirkungen (traumatischer Stress), Manipulationen am Fisch (Herauskeschern, an der Luft liegenlassen, Transport = "handling stress") oder Stress infolge von Infektionen. Finden Veränderungen der Temperatur oder Verschlechterung der Wasserqualität in naturam statt, so werden sie als "Umwelt stress" zusammengefaßt (SNIESZKO 1974, WEDEMEYER und McLEAY 1981, PICKERING 1982, ELLSAESSER und CLEM 1986, SUMPTER et al. 1986, FLOS et al. 1988, ANDERSON 1990). PETERS (1988), PETERS et al. (1980) und AHMEND et al. (1987) sprechen z.B. bei Rangordnungskämpfen zwischen Regenbogenforellen von "emotionalem" Stress oder "social stress" (PETERS et al. 1991). Ein weiteres Einteilungskriterium ist das Hungern der Fische ("Hunger stress"), wie es z.B. bei in Gefangenschaft gehaltenen Fischen vorkommt (SOIVIO und OIKARI 1976, DURGA PRASAD et al. 1989).

ANDERSON (1990) teilt Stress in natürliche und artifizielle, d.h. durch menschliches Handeln verursachte Kategorien ein. Beide Formen können zum Ausbruch von Krankheiten führen, sind also maladaptiv. DONALDSON (1981) unterteilt die Antworten der Fische auf Stressoren in drei Kategorien: Die Antwort auf Krankheiten; Veränderungen, die aus der Haltung der Tiere in der Aquakultur resultieren (nicht vermeidbare Manipulationen am Fisch) und die Antwort der Tiere auf Wasserverschmutzung.

### 2.3.5 PRINZIPIELLE ANTWORTEN DES FISCHORGANISMUS AUF STRESSOREN:

#### PRIMÄRE, SEKUNDÄRE UND TERTIÄRE STRESSEFFEKTE

Die durch Stressoren unterschiedlichster Art verursachte Erhöhung der Stresshormone ACTH, Kortisol und Adrenalin (= primäre Stressantwort) sowie die Folgen der Hormonwirkungen (= sekundäre und tertiäre Antworten) sind meßbar und werden als Parameter für die Bewertung des Ausmaßes von Stressoren herangezogen (MAZEAUD und MAZEAUD 1981, SINDERMANN 1984, FLOS et al. 1988, WEDEMEYER et al. 1990, BARTON und IWAMA 1991). Zum einen können derartige Veränderungen ein direktes Maß für die Schwere von Stressoren darstellen, zum anderen reflektieren sie die genetisch festgelegte Kapazität einer Fischart, gegenüber Stressoren reagieren zu können (BARTON und IWAMA 1991).

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die in der Literatur relevanten Meßgrößen für die Bewertung von Stressoren bei Fischen mit Beispielen (nach SINDERMANN 1984, WEDEMEYER und McLEAY 1981, STAVE und ROBERSON 1985, BARTON et al. 1987, PICKERING 1990, WEDEMEYER et al. 1990 und BARTON und IWAMA 1991).

**Tabelle 8:** Hormonelle und biochemisch-physiologische Veränderungen bei Einwirkungen von Stressoren auf den Fischorganismus mit Beispielen.

Streßantwort	Meßgrößen bzw. Veränderungen
Primär	Erhöhung der ACTH-, MSH-, Kortisol- und Katecholamin-Konzentrationen im Blutplasma
Sekundär	<p>Metabolisch: Plasmakonzentrationen von Glukose, Laktat und Cholesterin, Leber und Muskel- Glycogenkonzentrationen.</p> <p>Beispiel: Hyperglykämie, Hyperlaktämie. Abfall der Leberglykogenkonzentrationen und des Gehaltes an Vitamin C des Interrenalgewebes.</p>
	<p>Hämatologisch: Hämatokrit, Leukrit, Hämoglobin, Erythrozyten-, Leukozyten-, und Thrombozytenzahlen</p> <p>Beispiel: Leukopenie, reduzierte Blutkoagulation</p>
	<p>Osmoregulation: Plasmakonzentrationen von Natrium, Kalium, Chlorid, Protein und Osmolalität</p> <p>Beispiel: Hypochlorämie, Diurese mit Elektrolytverlusten, osmoregulatorische Imbalanz</p>
	<p>Morphologisch: Zell- und Zellkerngröße der kortisolproduzierenden Zellen, Konditionsfaktor, Morphologie des Magens</p>
	<p>Immunologisch: Messung der Lymphozytenproliferationsrate, Antikörperproduktion oder der Chemiluminizenz der Phagozyten</p>
Tertiär	Reproduktionsrate, Wachstum, Anfälligkeit gegenüber Krankheiten, Toleranz gegenüber Hypoxien oder extremen Temperaturenveränderungen, Stoffwechselrate

### 2.3.5.1 DIE PRIMÄRE STRESSANTWORT

Erste Reaktionen des Fischorganismus auf einen starken Stimulus sind die Steigerung des Sympatikotonus sowie die Ausschüttung von Hormonen, dem CRH und TRH. Diese Hormone regen wiederum die Ausschüttung von ACTH und MSH aus dem Hypophysenvorder bzw. -zwischenlappen an. Letztendlich werden bei diesem Prozess die klassischen "Stresshormone" Kortisol und Adrenalin in die Blutbahn ausgeschüttet (MAZEAUD et al. 1977, DONALDSON 1981, MAZEAUD und MAZEAUD 1981, SCHRECK 1981, SINDERMANN 1984, WEDEMEYER et al. 1990, BARTON und IWAMA 1991). Kortisol wirkt in einem feed-back Mechanismus wiederum hemmend auf die Sekretion von ACTH (FRYER und PETER 1977, SUMPTER et al. 1986, BARTON et al. 1987).

Für die Stärke oder Dauer eines Stressors wird deshalb der Anstieg bzw. der Abfall besonders der Kortisolkonzentrationen im Blutserum gemessen und ist auch bei Fischen das Leithormon für die Abschätzung für das Ausmaß eines Stressors (MAZEAUD et al. 1977, DONALDSON 1981, MAZEAUD und MAZEAUD 1981, SCHRECK 1981, BARTON et al. 1987, FLOS et al. 1988, PICKERING und POTTINGER 1989, BARTON und IWAMA 1991, ESPELID et al. 1996).

Andere Nicht-Stressoren und endogene Rhythmen verursachen eine starke Fluktuation der Basiskonzentrationen von Kortisol (BARTON und IWAMA 1991, ZAPATA et al. 1992). Hierzu gehören Temperaturänderungen, Art der Ernährung, Tageszeit (BARTON und IWAMA 1991), Fischart, Fischstamm (PICKERING und POTTINGER 1989), Herkunft bzw. "genetischer background" (FEVOLDEN et al. 1991, 1992, 1993, POTTINGER et al. 1994) sowie die Smoltifikation anadromer Salmoniden (YOUNG et al. 1989, BARTON et al. 1985).

Erhöhte Kortisolkonzentrationen müssen somit nicht zwangsweise einen Stresszustand anzeigen, denn aufgrund der zahlreichen Einflußfaktoren auf die Kortisolkonzentration zeigt ein veränderter Kortisolspiegel im Blut vielfach nur einen veränderten Metabolismus und nicht einen Stresszustand auf (LAIDLEY und LEATHERLAND 1988). Zudem existieren nach YOUNG et al. (1989) bei Pazifischen Lachsen (*Oncorhynchus kisutch*) endogen-saisonale rhythmische Schwankungen der Kortisolkonzentrationen, die einen Stresszustand vortäuschen können. KLINGER et al (1983) bewerten das Vorliegen einer physiologischen Kortisolkonzentration trotz auf den Fisch einwirkender Stressoren bei veränderten zellulären sekundären Stressparametern als Übergang von der Alarmphase in die Adaptationsphase.

Eine milde Sedation mit Tricain, das in den USA oftmals zur Stressminderung bei Fischen eingesetzt wird, bewirkt demgegenüber eine Erhöhung der Kortisolwerte, wie sie bei Vorliegen von akut einwirkenden Stressoren charakteristisch ist (BARTON und PETER 1982, STRANGE und SCHRECK 1978). Umgekehrt verhindern hohe Tricaindosen eine Steigerung der Plasmakortisolwerte (STRANGE und SCHRECK 1978).

BARTON und GROSH (1991) konnten zeigen, daß der Anstieg der Kortisolkonzentration von der Fischart abhängig ist und daß primäre und sekundäre Streßreaktionen nicht notwendigerweise mit der Veränderung der Kortisolkonzentrationen korreliert sind. Amerikanische Seesaiblinge (*Salvelinus namaycush*) wiesen drei Stunden nach akut einwirkenden Stressoren ("handling") die höchsten Kortisolkonzentrationen im Blutplasma auf (150 ng/ml). In der Reihenfolge Bachforelle, Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*) und Regenbogenforelle nahmen die Konzentrationen von 120 auf 30 ng/ml Blutplasma ab. Die amerikanischen Seesaiblinge wiesen bei hohen Kortisolkonzentrationen die geringsten Glukosekonzentrationen im Blut auf, bei den anderen Fischarten korrelierte die Höhe der Kortisol- und Glukosekonzentration. BARTON und IWAMA (1991) sind der Ansicht, daß die Schwere eines Stressors nicht aufgrund eines einzigen Streßparameters abgeschätzt werden könne. PICKERING et al. (1982) konnten bei Bachforellen zeigen, daß ein Zusammenhang zwischen Kortisolkonzentration im Blutplasma und Veränderungen der Blutglukosekonzentrationen sowie Lymphozytenanzahl nur begrenzt existiert. Hinweise für eine Nicht-Korrelierbarkeit des Kortisolblutspiegels und sekundärer Streßparameter finden sich bei PICKERING und POTTINGER (1985) sowie WOO et al. (1987). Sie stellten bei Bach- und Regenbogenforellen trotz erhöhter Kortisolkonzentrationen keinen Abfall der Blutlymphozyten, jedoch eine auf diese ursächlich zurückführbare Infektionsanfälligkeit fest. WOO et al. (1987) vermuten deshalb, daß möglicherweise die Höhe der Glukokortikoidkonzentration ausschlaggebend für eine Lymphozytopenie sein kann. PICKERING und POTTINGER (1987) geben an, daß bei Einwirkung von chronischen Stressoren auf Salmoniden eine von der Kortisolkonzentration unabhängige Lymphopenie infolge einer "prolongierten" Wirkung des Hormons zustande kommen könnte.

Die in Verbindung mit Stressoren einhergehende Glukokortikoiderhöhung kann das Immunsystem beeinflussen (NAGAE et al. 1994). TRIPP et al. (1987) fanden, daß Kortisol die mitogeninduzierte Proliferation von Milz- und Vordernierenlymphozyten von Silberlachsen in vitro hemmte. Sie vermuteten eine Hemmung der Lymphokinproduktion durch Glukokortikoide, da die Zugabe von Überständen, die von antigenstimulierten Pronephros-Lymphozyten stammten, die hemmende Wirkung des Kortisols aufhob. Zu den gleichen Ergebnissen kamen ESPELID et al. (1996); sie wiesen bei Lachsen (*Salmo salar*) eine Suppression der mitogeninduzierten Antwort der Lymphozyten mit Lipopolysacchariden von *Salmonella typhimurium* nach Kortisoladministration nach. MAULE et al. (1989) gehen davon aus, daß es bei Fischen ähnliche Beziehungen wie bei Säugern zwischen Glukokortikoiden und dem Immunsystem nach Einwirkung akuter Stressoren existieren. So können Glukokortikoide in Abhängigkeit von ihrer Konzentration den immunologischen Status der Tiere und die Immunantwort entweder verschlechtern oder verbessern.

Die Konzentrationen von ACTH, Throxin, Prolactin,  $\alpha$ -MSH oder Endorphinen variieren zwar unter der Einwirkung von Stressoren (SUMPTER et al. 1985, SUMPTER und DONALDSON 1986, PICKERING et al. 1987, BARTON und IWAMA 1991), stellen aber nach

WEDEMEYER et al. (1990) im engeren Sinne keine Streßhormone dar. Die Bedeutung der Konzentrationsveränderungen dieser Hormone bei Streßeinwirkung auf den Fischorganismus ist noch nicht geklärt (BARTON und IWAMA 1991, NAGAE et al. 1994).

BARTON und IWAMA (1991) sind der Meinung, daß Fische ähnliche Regulationsmechanismen zwischen Katecholaminen und Kortikosteroiden besitzen können wie höhere Wirbeltiere; Katecholamine bewirken bei Säugern eine Stimulation des ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen, Kortikosteroide regulieren wiederum über die Beeinflussung der Enzyme die Synthese der Katecholamine (AXELROD und REISINE 1984).

Die primäre Antwort ist bei auf Fische akut oder chronisch einwirkenden Stressoren unterschiedlich. PICKERING (1990) faßt die hormonellen Mechanismen zusammen. Akuter Stress führt zu einem nur über zwei Minuten andauernden Anstieg der ACTH-Werte im Blutplasma, gefolgt von einem mehrstündigen Anstieg der Kortisolkonzentrationen. Im allgemeinen werden die Basalwerte wieder innerhalb 24 Stunden erreicht. Werden Knochenfische chronischem Stress ausgesetzt, so ist der Kortisolspiegel für mehrere Tage oder Wochen erhöht, bis zu 25 Tagen bei Bachforellen und 6 Monaten bei Saiblingen (*Salvelinus fontinalis*) (PICKERING und STEWARD 1984, TAM et al. 1987). Auch die bei chronischem Stress beobachteten geringen Kortisolkonzentrationen, die mit Werten von ungestressten Tieren vergleichbar sind, werden durch eine erhöhte Hormonclearance bei noch aktivem hypothalamisch-hypophysären System erklärt (REDDING et al. 1984), die Anzahl der Kortisolrezeptoren nimmt signifikant ab (PICKERING 1990). Im allgemeinen führt akuter Stress zu einer katecholamininduzierten Erhöhung, chronischer Stress zu einer Verminderung des Thyroxinblutspiegels.

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Kortisolkonzentration nicht immer als Meßparameter für das Vorliegen von Stressoren geeignet ist (FEVOLDEN et al. 1991, POTTINGER et al. 1992, FEVOLDEN und ROED 1993, FEVOLDEN et al. 1994)

#### 2.3.5.2 DIE SEKUNDÄRE STRESSANTWORT

Die in Verbindung mit den primär hormonellen Veränderungen (Erhöhung der Kortisol- und AdrenalinKonzentrationen) einhergehenden Variationen biochemischer und zellulärer Blutparameter sowie die dabei auftretenden Gewebsalterationen stellen geeignete Meßparameter für die Schwere von Stressoren dar (WEDEMEYER et al. 1990, BARTON und IWAMA 1991).

Charakteristische Veränderungen bei Einwirkung von Stressoren sind Erhöhung der Blutglukose- und Laktatkonzentrationen, verminderte Blutgerinnungszeit und erhöhte Diurese, gefolgt von einem Elektrolytverlust und Verschlechterung der osmoregulatorischen Mechanismen. Veränderungen des roten und weißen Blutbildes, wie z.B. eine Lymphozytopenie, Granulozytose oder Hämokonzentration sind hierfür Beispiele (MAZEAUD et al. 1977,

DONALDSON 1981, MAZEAUD und MAZEAUD 1981, SCHRECK 1981, PICKERIN et al. 1982, KLINGER et al. 1983). Akute Stressoren resultieren in einer Veränderung verschiedener stoffwechselfysiologisch relevanter Schlüsselenzyme, die in den Aminosäure- und Kohlenhydrathaushalt eingreifen; es wird vermutet, daß u.a. die veränderten Kortisolkonzentrationen hierfür verantwortlich sind (MORALES et al. 1990).

Veränderungen der sekundären Streßparameter können eine direkte Folge der Kortikosteroid- oder AdrenalinKonzentrationen darstellen (MAZEAUD et al. 1977), erkennbar an der oftmals gleichsinnigen Veränderungen der Hormone und der biochemischen oder zellulären Parameter. Dies impliziert jedoch nicht, daß eine enge Korrelation im Sinne eines direkten Ursache-Wirkung-Prinzips existieren muß (PICKERING et al. 1982, LEATHERLAND 1985, BARTON und IWAMA 1991). Daneben können "Nicht-Stressoren" (Salinität, Temperatur, Wasserqualität, Kondition) sowie "endogene Stressoren" (Smoltifikation, Geschlechtsreife) das Ausmaß der stressinduzierten physiologischen Veränderungen beeinflussen (BARTON und IWAMA 1991, ZAPATA et al. 1992).

BARTON und IWAMA (1991) teilen die stressinduzierten sekundären Antworten der Fische in vier unterschiedliche Kategorien ein:

1. Metabolische Veränderungen
2. Hämatologische Veränderungen
3. Osmoregulatorische Veränderungen
4. Morphologische Veränderungen

#### ad 1. Metabolische Veränderungen

Die Blutglukosekonzentration ist für die Abschätzung der Schwere von Stressoren sowie der Streßtoleranz ein bei Fischen häufig gemessener Parameter, da sie leicht und schnell bestimmbar ist (WEDEMEYER et al. 1990). Daneben stellen im Blutplasma die Konzentrationen von Laktat und Cholesterin sowie der Glycogengehalt der Leber geeignete Meßparameter für die Bewertung von Stressoren dar (BARTON und IWAMA 1991). Für die Interpretation stressbedingter erhöhter Blutglukose-Konzentrationen müssen Faktoren wie Nahrung, Alter der Fische, Zeitpunkt der letzten Fütterung, Temperatur und Jahreszeit in die Betrachtungen miteinbezogen werden, da sie die Glycogenspeicher der Leber und damit die stressinduzierte Erhöhung der Blutglukose-Konzentrationen beeinflussen (McLEAY 1977, WEDEMEYER und YASUTAKE 1977, GORDON und McLEAY 1978, BARTON et al. 1988). Erhöhte Blutlaktatwerte sind ein Indikator für das Vorliegen einer anaeroben Stoffwechsellage, wie sie z.B. nach starker Schwimmbelastung oder Aufregung der Tiere auftritt (WEDEMEYER et al. 1990).

## ad 2: Hämatologische Veränderungen

Die hämatologische Untersuchung stellt ein wichtiges Kriterium dar, den Gesundheitszustand eines Fischbestandes zu kontrollieren und ist ein wichtiges Hilfsmittel für die Wirkung und Bewertung der akuten sowie chronischen Toxizität von Wasserschadstoffen (abiotische Stressoren) (McLEAY und GORDON 1977, CYRIAC et al. 1989). Wichtigste Indikatoren, die hinweisend für das Vorliegen von Stress sind, sind der Hämatokrit, Leukrit und die absolute sowie relative Anzahl der einzelnen Blutzellpopulationen. Weitere Biomarker sind blutbiochemische Parameter, wie z.B. die Blutglukose- oder die Laktatkonzentrationen (McLEAY 1975, ELLSAESSER und CLEM 1986, ELLSAESSER et al. 1987, AINSWORTH et al. 1991, PETERS et al. 1991, GILL und EPPLE 1993).

Die Zu- oder Abnahme der Hämatokritwerte oder der Hämoglobinkonzentrationen zeigen eine Hämokonzentration bzw. eine Verdünnung des Blutes an (WEDEMEYER et al. 1990). Auf stressinduzierte Anämien reagiert der Fischorganismus mit einer Erhöhung der Erythrozytenanzahl oder mit einer Schwellung der Zellen (WELLS et al. 1984), die durch eine Katecholaminwirkung zustande kommen soll (WELLS et al. 1986). Charakteristische Veränderungen des zellulären Blutbildes nach Einwirkung akuter Stressoren sind eine Leukozytopenie (McLEAY und GORDON 1977, WEDEMEYER und McLEAY 1981, BARTON et al. 1987, WEDEMEYER et al. 1990). Einer der sensitivsten Indikatoren für das Vorliegen von akuten oder chronischen Stressoren ist die Feststellung der Blutgerinnungszeit, des Differentialblutbildes und des Leukrit bzw. Hämatokritwertes (McLEAY 1975, ANDERSON 1990, WEDEMEYER und McLEAY 1981, BARTON et al. 1987). RAM BHASKAR und RAO (1990) bewerteten die Veränderungen des Differentialblutbildes als einen besseren Indikator für das Vorliegen von chronischem Stress (Hungerstress) als die absolute Anzahl der Erythrozyten oder Leukozyten. Der Leukritwert kann als Indikator besonders für Hitzestress sowie das Vorliegen von chronischem Stress verwendet werden, als Hinweis für das Vorkommen subklinischer Infektionen ist er nicht geeignet (WEDEMEYER et al. 1983). Die Erhöhung des Leukritwertes basiert auf der Zunahme der großvolumigen Granulozyten. FLOS et al. (1988) sind der Meinung, daß die Messung der Kortisolkonzentration ein geeigneter Indikator für das Vorliegen von akut auf Regenbogenforellen einwirkender Stressoren ist, BARTON et al. (1987) machen die erhöhten Kortisolkonzentrationen nach chronisch auf Regenbogenforellen einwirkender Stressoren für die Veränderungen hämatologischer Parameter verantwortlich. SMITH und RAMOS (1976) sowie ISAACSON und MORRISON (1980) bewerteten den Nachweis von okkultem Hämoglobin im Mukus als eine schnelle und sichere Methode, Stress bei Fischen aufzudecken.

Im allgemeinen resultiert Stress in einer Lymphopenie, Monozytopenie und Neutrophilie (PETERS et al. 1980, HLAVEK und BULKLEY 1980, JUJENA und MAHAJAN 1983), assoziiert ist hiermit eine Immunsuppression mit erhöhter Empfänglichkeit gegenüber Infektionskrankheiten (SNIESZKO 1974, ELLIS 1981, BARTON et al. 1987, MAULE et al.

1989, WESTER et al. 1994). Nur in seltenen Fällen ist eine Lymphozytose festzustellen (WEDEMEYER et al. 1990). WOO et al. (1987) stellten mit einer Erhöhung der Kortisolkonzentration eine erhöhte Infektionsanfälligkeit gegenüber experimenteller Infektionen mit *Cryptobia salmositica* bei Regenbogenforellen fest, ohne daß eine Lymphopenie beobachtet werden konnte. Ein Hinweis für die ursächliche Wirkung von Glukokortikoiden auf das Blutbild erbrachte McLEAY (1973), der Pazifischen Lachsen (*Oncorhynchus kisutch*) Kortisol oder Dexamethason in verschiedenen Konzentrationen verabreichte. Neben degenerativen Veränderungen des Interrenalgewebes stellte er eine Vakuolisierung und Kernpyknose der Lymphozyten im hämatopoetischen Nierengewebe sowie eine Abnahme der absoluten Lymphozyten- und Thrombozytenzahlen im Blut fest. Die Erythrozytenanzahl wurde hiervon nicht beeinflußt. McLEAY (1973) sieht den biologischen Sinn des Zelluntergangs in der Ernährung anderer Zellen im Fischorganismus.

PICKERING und POTTINGER (1987) fanden, daß die zelluläre Blutzusammensetzung, insbesondere die Lymphozytenanzahl als Indikator für chronischen Stress, ein sensitiverer Parameter als die Kortisolkonzentration darstellt. Sie stellten bei Bach- sowie Regenbogenforellen fest, daß bei hohen Besatzdichten die Kortisolwerte schnell wieder auf ihre Basalwerte abfielen, die Thrombo- und Lymphozytenzahlen während der 3 Wochen andauernden Versuchszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch konstant niedrig blieben. Gegensätzliche Ergebnisse fanden PICKERING und STEWARD (1984), die bei Überbesatz eine über 28 Tage andauernde Kortisolwerterhöhung bei Bachforellen fanden. PICKERING und POTTINGER (1987) vermuten, daß die verschiedenen Fischstämme, das unterschiedliche Versuchsdesign sowie eine erhöhte Kortisolclearance zu den beobachteten Unterschieden führten.

### ad 3. Osmoregulatorische Veränderungen

Wie die Blutglukose-Konzentration ist die Feststellung der Höhe des Chloridwertes ein häufig gemessener Streßparameter (WEDEMEYER et al. 1990). Eine stressassoziierte Hypochlorämie kommt durch die Wirkung von Adrenalin zustande. Infolge der erhöhten Kiemenperfusion und des Gasaustausches wird vermehrt Wasser über die Kiemenlamellen ausgeschieden. Als Folge steigt die Osmolalität des Blutes an (PIC et al. 1974). Gleichermaßen erhöht sich die Urinproduktion, damit ist ein Chloridverlust verbunden. Plasmachlorid-Konzentrationen kleiner oder gleich 90 mmol/l sind für Salmoniden schädlich (WEDEMEYER et al. 1990). Wirken auf Fische, die im Süßwasser gehalten werden, akute oder chronische Stressoren ein, so reagiert der Organismus mit einer Blutverdünnung und erhöhter Diurese (WEDEMEYER et al. 1990) Der damit verbundene Elektrolytverlust (infolge Steigerung der Diurese) resultiert in einer Verminderung der Serum- oder Plasmaosmolalität und einem Abfall der Natrium- sowie Chloridionen-Konzentration (MAZEAUD et al. 1977). Unterliegen Fische, die im Salzwasser aufgezogen werden, Stressoren, so entsteht eine Hämokonzentration (WEDEMEYER et al. 1990).

#### ad 4. Morphologische Veränderungen

BARTON und IWAMA (1991) stellen die stressassoziierten morphologischen Veränderungen der inneren Organe zu den sekundären Streßeffekten, WEDEMEYER et al. (1990) sowie OIDTMANN (1994) zu den tertiären Antworten des Organismus auf Stressoren.

##### 2.3.5.3 DIE TERTIÄRE STRESSANTWORT ("WHOLE ANIMAL RESPONS")

Die Erfassung der tertiären Streßantworten stellt einen adäquaten Indikator für die Bewertung von (Umwelt-) Stressoren dar (WEDEMEYER und McLEAY 1981). Zu den tertiären Antworten zählen BARTON und IWAMA (1991) und WEDEMEYER und McLEAY (1981) die Verschlechterung der Reproduktionsrate, des Wachstums, der Stoffwechselrate, eine Veränderung des Verhaltens sowie eine erhöhte Anfälligkeit der Fische gegenüber Infektionserregern (siehe Tabelle 8; S. 45). Stressoren führen zudem zu histologisch erfaßbaren Veränderungen der inneren Organen, die PETERS (1979) als tertiäre Streßantworten zusammenfaßte. Typische Gewebsalterationen, die infolge von akuten oder chronischen Stressoren auftreten, sind atrophische Veränderungen der Magenmukosa (PETERS 1982), Hypertrophie der Interrenalzellen sowie Zunahme ihrer Zell- und Kerngröße (FAGERLUND et al. 1981, BROWN et al. 1984, WEDEMEYER et al. 1990) und Veränderungen im blutbildenden Gewebe der Kopfnieren und der Milz (PETERS und SCHWARZER 1985, WLASOW et al. 1990, PETERS et al. 1991). Stressoren führen in Abhängigkeit von dem Stadium des AAS zu einer Aktivierung (Alarmphase) oder zu degenerativen Erscheinungen (Erschöpfungsphase) des hämatopoetischen Gewebes. Mit der Degeneration von Makrophagen wird eine Verschlechterung der Immunabwehr vermutet, was sich in einer erhöhten Empfänglichkeit der Fische gegenüber opportunistischen Krankheitserregern manifestiert (AHMEN et al. 1987, PETERS et al. 1991).

In der Praxis spielt vor allem die stressinduzierte Reduktion der Wachstumsrate eine Rolle. Sie kann infolge einer kortisolinduzierten Stoffwechsellage (DAVIS et al. 1985) oder einer verminderten Nahrungsaufnahme durch Erhöhung der Besatzdichte vermindert sein (STRANGE et al. 1978, PICKERING und STEWARD 1984). Weiterhin spielt für die Wachstumsverminderung die Abnahme der Verdauungskapazität aufgrund einer Zelldegeneration der Magenmukosa eine Rolle (BARTON et al. 1987). PICKERING (1990) faßt das hormonelle Wirkgefüge, das zu einer Verringerung des Wachstums bei gestressten Fischen führt, zusammen. Das bei Stress sezernierte Hormon Kortisol bewirkt eine katabole Stoffwechsellage und die Wirkungen der anabolen Hormone Testosteron, 11-Ketotestosteron sowie GH (Growth Hormone) werden gehemmt.

Einen der empfindlichsten Indikatoren für Stress ist die Krankheitsinzidenz. Fischkrankheiten sind nicht das Ergebnis eines monokausalen Geschehens, sondern sind das Resultat einer engen Wechselbeziehung zwischen Pathogen, Umwelt und Fisch (SNIESZKO 1974, WEDEMEYER und McLEAY 1981). Nur wenn dieses Gleichgewicht gestört wird, kommt es zu einem gehäuften Auftreten von Infektionskrankheiten. Typische Beispiele von stressassoziierten Infektionskrankheiten sind die Furunkulose, Pseudomonasinfektionen oder die Myxobakteriose (WEDEMEYER und McLEAY 1981). Bei Regenbogen- und Bachforellen ist das Auftreten von Krankheiten mit einer stressinduzierten erhöhten Kortisolkonzentration korreliert. Eine chronische Erhöhung der Kortisolkonzentration auf 10 µg/ml Blutplasma disponiert die Fische für bakterielle Infektionen (PICKERING und POTTINGER 1989).

WEDEMEYER und YASUTAKE (1977), WEDEMEYER und McLEAY (1981) sowie WEDEMEYER et al. (1990) geben über diejenigen Blutparameter, die sich bei Umweltstress verändern, zusammenfassende Darstellungen.

### 2.3.6 UNTERSUCHUNGEN DER WIRKUNGEN VON STRESSOREN

Im Folgenden werden die Untersuchungsergebnisse zu stressassoziierten Veränderungen des Blutbildes sowie des Immunsystems eingehender besprochen. Hierbei wird die Unterteilung in primäre, sekundäre und tertiäre Streßantworten nicht mehr beibehalten, da diese drei Parameter aufgrund ihrer engen Wechselbeziehungen oftmals gemeinsam untersucht wurden (PICKERING et al. 1982, BARTON et al. 1987). Zudem wird die Einteilung der verschiedenen Antworten des Fischorganismus auf Stressoren unterschiedlich gehandhabt.

Die Einteilung erfolgt nach der Art der auf die Fische einwirkenden Stressoren: exogene Streßfaktoren und Faktoren, die eine stressähnliche Antwort beim Fisch hervorrufen (endogene Faktoren). Exogen auf Fische einwirkende Stressoren stellen z.B. chemische, d.h. über die Wasserqualität auf den Fischorganismus wirkende Faktoren dar, sowie Stressoren, die durch Manipulationen an Fischen hervorgerufen werden. Die "endogenen Faktoren" stellen Einflüsse auf den Fischorganismus dar, die beispielsweise mit der Heranreifung der Geschlechtsprodukte oder, bei anadromen Fischarten, mit dem Übergang vom Süßwasser- in die Salzwasserphase assoziiert sind (Smoltifikation). Sie ziehen in ähnlicher Weise wie exogene Stressoren Veränderungen des zellulären Blutbildes oder der biochemischen Blutparameter nach sich.

## 2.3.6.1 EXOGENE STRESSFAKTOREN

### 2.3.6.1.1 CHEMISCH-PHYSIKALISCHE STRESSFAKTOREN

Eine schlechte bzw. suboptimale Wasserqualität (chemisch-physikalische Wasserparameter) stellt für Fische einen Streßfaktor dar, der zu einer Suppression der unspezifischen Abwehr führt und in der Folge zu erhöhter Krankheitsinzidenz (McLEAY 1975, WALTERS und PLUMB 1980, KLINGER et al. 1983, WLASOW et al. 1990, SECOMBES et al. 1991, JENEY et al. 1992, MYSZKOWSKI und SIWICKI 1994, OIDTMANN 1994).

OIDTMANN (1994) untersuchte bei Regenbogenforellen die Beeinflussung verschiedener Blutvariablen durch 12 verschiedene Wasserqualitätsparameter. Bei hohen Phosphat- und Ammoniak-Konzentrationen war ein charakteristischer Rückgang der Erythrozytenzahlen, eine Leuko- und Lymphopenie, relative Neutrophilie sowie eine Zunahme der Segmentkernigenzahl festzustellen, wie es bei akutem Stress vorkommt. 12 - 18 cm große Tiere zeigten verminderte Hämatokritwerte bei hohen Phosphat- und Ammoniak-Konzentrationen ( $> 0,001$  mg  $\text{NH}_3/\text{l}$ ). Das gleichzeitige Vorliegen einer Lymphopenie und Neutrophilie wertete OIDTMANN (1994) als das Vorliegen von Dauerstress, obwohl Vergleichswerte bei Einwirkungen chronischer Streßfaktoren in der von ihr gesichteten Literatur nicht vorliegen.

Bei einer 5 Wochen andauernden, chronisch auf Karpfen einwirkenden subletalen Ammoniak-Konzentration von  $0,33$  mg /l Wasser stellten WLASOW et al. (1990) unspezifische Streßsymptome wie Thrombozytose, Lymphopenie, Eosinophilie, Erythrozytenschwellung und Störungen der Erythropoese fest. In der Kopfniere und Milz waren eine Abnahme der Myeloblasten und des lymphoretikulären Gewebes sowie eine Aktivierung der Lymphoblasten und Plasmozyten in der Kopfniere feststellbar. Nach 10 Wochen langer Exposition verschwanden die Streßsymptome, es wurde aber eine vermehrte erythroblastäre Regeneration mit Verminderung des Hämoglobingehaltes des Blutes festgestellt; die kleinen Lymphozyten in der Niere nahmen ab. WLASOW et al. (1990) kommen zu dem Schluß, daß eine chronische Exposition subletaler  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentrationen die Abwehrmechanismen infolge einer Depression immunkompetenter Zellen vermindert (Abnahme der kleinen Lymphozyten und lymphoider Zellen der Niere) trotz physiologischer Leukozytenzahlen des Blutes. Die Reduktion der immunkompetenten Zellen führte in den Untersuchungen zu einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen. DONALDSON (1981) konnte bei chronischer Ammoniakexposition ( $80$   $\mu\text{g}/\text{l}$  Wasser) bei Pazifischen Lachsen eine Erhöhung der Kortisolkonzentrationen auf etwa  $160$  ng/ml Blut im Gegensatz zur Kontrolle ( $20$ - $40$  ng Kortisol /ml Blutplasma) feststellen.

Akut auf Fische einwirkende Ammoniak-Konzentrationen in subletaler Dosierung führen ebenfalls zu Veränderung des hämatopoetischen Gewebes und des Blutbildes, wobei Ammoniumchlorid und Ammoniumnitrat unterschiedlich wirken. WLASOW und DABROWSKA (1990) konnten für  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in einer Konzentration von  $1,78$  mg  $\text{NH}_3/\text{l}$  Wasser für Karpfen eine Zunahme der Erythrozytenanzahl, Hämatokritwerte und der

Hämoglobinkonzentrationen feststellen. Weiterhin ermittelten sie eine Neutrophilie mit gleichzeitiger Erhöhung der neutrophilen Granulozyten in der Milz sowie eine Leukopenie mit einer Reduktion der Zellen von 0,028 auf 0,005 G/l im Blut. Die Jugendformen der Granulozyten nahmen in der Milz ab. Die Erythrozytenzahlen sowie die Morphologie dieser Zellen wurde von beiden Giftstoffen nicht beeinflusst. Die Autoren sind der Ansicht, daß akute Ammoniakintoxikationen im Gegensatz zu chronisch-subletalen Ammoniakwirkungen stärker auf das periphere Blut als auf die hämatopoetischen Organe (Milz, Niere) wirken, und die Leukozyten hierbei einen besseren Indikator darstellen als die Erythrozyten. Ähnliche Ergebnisse fanden bei Karpfen WALUGA und FLIS (1971) bei Ammoniakexposition: sie stellten eine signifikante Abnahme der Leukozyten im Blut von Karpfen fest.

JENEY et al. (1992) untersuchten bei 40-50 g schweren Karpfen über 4 Tage die akute Wirkung subletaler Ammoniak-Konzentrationen in einem Bereich von 0,020 bis 2,0 mg NH<sub>3</sub>/l Wasser. Bei Konzentrationen größer als 1 mg NH<sub>3</sub>/l erreichten die Glutamatdehydrogenase (GIDH)-Aktivitäten im Blutplasma hohe Werte, insbesondere bei pH 9 und einer Sauerstoffkonzentration von etwa 8 mg/l Wasser. Die hohe Aktivität dieses ammoniakfixierenden Enzyms weist auf eine erhöhte Ammoniakdetoxifizierung in der Leber hin. Eine erhöhte GIDH-Aktivität aber führt zu einer Verarmung von Ketoglutarat, das dem Citratcyclus nicht mehr zur Verfügung steht. Zudem bedingen erhöhte GIDH-Aktivitäten eine Verminderung von reduziertem Nikotinsäureamid-dinucleotid (NADH). Dies führt insgesamt zu einer reduzierten Synthese von ATP. Zusammen mit den durch Ammoniak verursachten Kiemennekrosen sinkt die Sauerstoffaufnahme, so daß sich der Energiemangel noch verstärkt. Dies resultiert in ein Energiemangelsyndrom (PUND und BERNOTH 1992).

MYSZKOWSKI und SIWICKI (1994) stellten bei akut auf Karpfen einwirkenden Nitritkonzentrationen (20 mg/l Wasser) eine drastische Abnahme der Leukozytenzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe fest. Daneben war eine Suppression der humoralen und zellvermittelten Immunität zu verzeichnen. MAZIK et al. (1991) wiesen für Felsenbarsche (*Morone saxatilis*) und CARBALLO et al. (1995) bei Regenbogenforellen eine mit Erhöhung der Nitritkonzentration steigende Blutkortisolkonzentration nach. Weitere Veränderungen hoher Nitritexpositionen (0,45 mg NO<sub>2</sub>-N/l Wasser) waren eine Erhöhung der Methämoglobinkonzentrationen (Methämoglobinämie) auf über 50 % des Gesamtbluthämoglobingehaltes bei Regenbogenforellen (MARGIOCCO et al. 1983). TUCKER et al. (1989) fanden bei Welsen (*Ictalurus punctatus*) bei Nitritkonzentrationen von 1,89 bis 2,88 mg NO<sub>2</sub>-N/l Wasser eine Reduktion der funktionellen Hämoglobinkonzentrationen mit einer ausgeprägten Methämoglobinämie (> 50 % MetHb) sowie eine milde Anämie, erkennbar an abfallenden Hämatokritwerten. Die Anämie erklärten die Autoren durch den hohen Energieaufwand bei dem Detoxifizierungsprozess durch das NADH-Methämoglobin-Reduktasesystem in den Erythrozyten. Weitere Folgen waren eine verkürzte Lebensspanne und eine steigende Hämolyse der roten Blutzellen (hämolytische Anämie). PUND und BERNOTH (1992) fassten zusammen, daß dem Nitrit die wichtigste toxikologische Bedeutung als

Methämoglobinbildner bei Forellen zukommt, während MARGIOCCO et al. (1983) eine direkt schädigende Wirkung des Nitrits auf die inneren Organe postulierten. Liegen > 5 % des Gesamthämoglobins als Methämoglobin vor, so spricht MATTHEIS (1989) von einer Methämoglobinämie. Erst ab 50 % Methämoglobin sind schädigende Effekte zu erwarten (LEWIS und MORRIS 1986): Hypoxien, Anämien und daraus resultierende Symptome (Apathie, Braunverfärbungen der Kiemen). Letztendlich entsteht hier wiederum ein Energiedefizit im Fisch. PALACKOVA und ADAMEK (1992) untersuchten in einer Feldstudie bei Regenbogen- und Bachforellen die Methämoglobinkonzentrationen bei verschiedenen Nitritkonzentrationen und kamen zu dem Schluß, daß zwischen 0,099 und 0,122 mg Nitrit/l Wasser eine Methämoglobinkonzentration von 20 % (11g/l Methämoglobin) als physiologisch bei Regenbogenforellen akzeptiert werden müsse. Für Bachforellen kann davon ausgegangen werden, daß die Nitritaffinität zum Hämoglobin geringer ist als bei der Regenbogenforelle, so daß eine geringere Methämoglobinbildung bei erhöhten Nitritkonzentrationen zu erwarten ist und somit Bachforellen im allgemeinen eine höhere Nitritkonzentration tolerieren (PALACKOVA und ADAMEK 1992).

Eine Sauerstoffsättigung zwischen 78 und 90 % im Ablaufwasser beeinträchtigte das Immunsystem bei Regenbogenforellen am wenigsten, denn bei einer Sauerstoffkonzentration größer als 90 und kleiner als 70 % waren die Leukozytenzahlen erniedrigt (OIDTMANN 1994). Eine Sauerstoffkonzentration zwischen 5 und 8 mg/l Wasser beeinflusste die Blutzusammensetzung von Fischen, die größer als 12 cm waren, nicht. Höhere Konzentrationen resultierten in geringeren Leuko- und Lymphozytenzahlen (OIDTMANN 1994). 5 mg O<sub>2</sub>/l Wasser werden als die Grenzkonzentration für Salmoniden angegeben, verminderte Werte verursachen eine Abnahme der Wachstumspotenz und steigern die Mortalitätsrate (SPEECE 1973, ALABASTER et al. 1979, MORRISON und PIPER 1986, BROMAGE und SHEPHERD 1988).

Plötzliche Temperaturveränderungen sowie Temperaturen außerhalb des Optimalbereichs stellen Stressoren für den Fisch dar, erkennbar an Veränderungen des Blutbildes (McLEAY 1975, SRIVASTAVA und AGRAWAL 1977, AGRAWAL und SRIVASTAVA 1978, OIDTMANN 1994). Liegen die Temperaturen außerhalb des Optimalbereiches für Regenbogenforellen, so drückt sich dies in einem Rückgang der Leuko- und Lymphozytenzahlen aus (OIDTMANN 1994). Erhöhte Neutrophilenzahlen bei suboptimal hohen Temperaturen sind Folgen einer Stimulation der phagozytären Leistung des Immunsystems (OIDTMANN 1994). Dies trägt zudem der Tatsache Rechnung, daß fischoptimale Temperaturen oftmals auch Infektionserregern optimale Bedingungen bieten (REICHENBACH-KLINKE 1980, SCHÄPERCLAUS et al. 1990, OIDTMANN 1994). Progrediente Temperaturerhöhung ("Hitze stress") kann aufgrund des erhöhten Sauerstoffbedarfs bei Regenbogenforellen zu einer gesteigerten Erythropoese und einem Anstieg der erythrozytären Hämoglobinkonzentration führen (HOUSTON und KOSS 1984). Temperaturerhöhungen bewirkten bei Seebrassen (*Chrysophrys major*) eine Hämokonzentration

und Anstieg der Kortisol- und Glukosekonzentrationen. Kältestress rief eine Abnahme der Hämatokritwerte, der Hämoglobinkonzentrationen sowie eine Hyperglykämie und der Kortisolkonzentrationen hervor (ISHIOKA 1980).

Ein Kälteschock verursachte bei *Colisa fasciatus*, einem tropischen Süßwasserfisch, eine Aktivierung des hypothalamisch-hypophysären Systems mit einer Catecholaminausschüttung aus den chromaffinen Zellen des Interrenalgewebes (SRIVASTAVA und AGRAWAL 1977, AGRAWAL und SRIVASTAVA 1978). Die Folge war eine Leukozytose nach etwa 4 bis 5 Stunden nach Transfer der Tiere in das kalte Wasser. Die intraabdominale Kortisolgabe führte bei dieser Fischart zu einer initialen Leukozytose und nachfolgend zu einer Lymphopenie. Die Gabe des adrenocortikalen Blockers Metopiron hob die kälteinduzierte Leukozytose bzw. die kortisolinduzierte Leukopenie auf (SRIVASTAVA und AGRAWAL 1977, AGRAWAL und SRIVASTAVA 1978).

McLEAY (1975) überprüfte die Wirkung schneller Temperaturveränderungen auf das Blutbild von 9 g schweren Silberlachsen. Der Transfer der Fische aus 12 ° kaltem in 20 °C warmen Wasser bei gleichzeitiger Erhöhung der Besatzdichte auf 50 g/l Wasser resultierte in eine geringgradige Erhöhung der Erythrozytenzahlen und eine signifikante Verringerung der Leukozyten/Thrombozytenzahlen, die über 4 Tage andauerte.

Die Konzentrationen von Chlorid-, Kalzium- und Magnesium-Ionen im Wasser beeinflussen das Blutbild und Immunsystem von Regenbogenforellen (OIDTMANN 1994). Sie beobachtete bei Konzentrationen größer als 20 mgCl<sup>-</sup>/l Wasser eine absolute und relative Lymphopenie bei gleichzeitiger Neutrophilie und einen Rückgang der Erythrozytenzahlen. Niedrige Kalzium- und Magnesiumwerte (< 100 bzw. < 21 mg/l) sowie geringe Härtegrade (< 18° dH) des Wassers führten zu einer verminderten Immunitätslage, erkennbar an einer Leuko- und Lymphopenie (absolut und relativ). Weitere Befunde waren eine absolute und relative Neutrophilie sowie verminderte Nachbildung der Neutrophilen (Verminderung der Granuloblasten). OIDTMANN (1994) kommt zu dem Schluß, daß ausreichend hohe Kalzium- und Magnesium-Konzentrationen im Wasser eine nicht unwichtige Rolle für eine ungestörte Funktion der Immunabwehr zuzukommen scheint. Es existieren Hinweise bei Säugern, daß in vitro die mitogeninduzierte Proliferation und Aktivierung der Lymphozyten nur bei genügend hohen Kalziumkonzentrationen zustande kommen (LOOR 1980).

Die von OIDTMANN (1994) beobachtete Stimulation der zellvermittelten unspezifischen Abwehr durch hohe Nitratkonzentrationen im Wasser (> 26 mg/l) konnte durch eine Erhöhung (Linksverschiebung) der Granuloblastenzahlen im Blut von Regenbogenforellen verifiziert werden.

In ihren Untersuchungen stellten KLINGER et al. (1983) fest, daß mit Verschlechterung der Wasserqualität Veränderungen des roten und weißen Blutbildes bei Katzenwelsen (*Ictalurus punctatus*) auftraten. Die Fische wurden zum einen in einem Kreislaufsystem gehalten, als

Vergleich dienten in Durchlaufsystemen gehaltene Tiere. Verglichen mit der Wasserqualität im Wasserdurchlaufsystem waren die Konzentrationen der fischtoxisch wirkenden Stickstoffverbindungen Ammonium und Nitrit im Kreislaufsystem um das 80- bzw. 100-fache erhöht. Die Konzentration des mindergiftigen Nitrats nahm aufgrund der Nitrifikation im Kreislaufsystem auf 234 mg/l gegenüber 7.2 mg/l Wasser in der Durchlaufhaltung zu. Ebenso akkumulierten die ein- und zweiwertigen Ionen (Phosphat, Kalzium, Sulfat, Chlorid) im Kreislaufwasser. Die Autoren führen die festgestellte Hämokonzentration der im Kreislaufsystem gehaltenen Fische auf die schlechtere Wasserqualität zurück. Die Hämokonzentration ist ein charakteristisches Anzeichen für die Alarmphase des AAS und könnte durch folgende Faktoren hervorgerufen worden sein: (1) Störungen der ionalen Regulationsmechanismen mit Veränderungen des Wassergehaltes des Blutes, (2) Erythrozytenschwellung infolge erhöhter CO<sub>2</sub> - sowie Laktatkonzentrationen des Plasmas mit resultierendem Wassereinstrom in die Zellen und (3) Mobilisierung der Blutreserven aus den Erythrozytenspeichern (Milz). Die im Gegensatz zur Durchlaufhaltung festgestellten gleichbleibend hohen Lymphozyten- und Granulozytenzahlen bei schlechter Wasserqualität (Kreislaufsystem) könnten nach KLINGER et al. (1983) in einem immunstimulierenden Effekt zu suchen sein, obwohl die Autoren einen schädigenden Effekt der Wasserinhaltsstoffe nicht ausschließen.

SECOMBES et al. (1991) untersuchten die Wirkung von Abwässerschlämmen auf das Immunsystem der Kliesche (*Limanda limanda*), ohne die Inhaltsstoffe näher zu analysieren. Die Autoren fanden bei hoher Belastung (0,032 % Abwässerschlämme) eine signifikante prozentuale Erniedrigung der Thrombozyten und eine Erhöhung der absoluten neutrophilen Granulozytenzahlen. Eine Steigerung der Granulopoese ist ein charakteristisches Anzeichen für das Vorliegen von Stress (SECOMBES et al. 1991). ZIDAR et al. (1994) fanden bei chronischer Belastung von Karpfen mit dem Fungizid Methoxyethyl-Quecksilberazetat eine prozentuale Erniedrigung der Lymphozyten, die von einer morphologischen Veränderung begleitet war (Vakuolisierung des Plasmas). Die Autoren bewerteten das gehäufte Auftreten von Zytoplasma-Pseudopodien als einen zytopathogenen Effekt der Quecksilberverbindung.

McLEAY (1975) stellte fest, daß bei akuter Belastung von Silberlachsen mit Abwässern von Papierfabriken die Summe aus Leukozyten und Thrombozyten über vier Tage signifikant gegenüber der unbelasteten Kontrolle von  $5.6$  auf  $4.26 \times 10^4/\mu\text{l}$  abnahm. Bei 24-stündiger Exposition der Fische gegenüber verschiedenen subletalen Zinkkonzentrationen konnten die Autoren nur eine geringe Abnahme der Leukozyten/Thrombozytenzahlen feststellen. Die Anzahl der Erythrozyten änderte sich innerhalb dieses Zeitraumes nicht. Die Autoren weisen aufgrund dieser Ergebnisse darauf hin, daß die Leukozyten bzw. Thrombozytenzahlen als Indikator für akut auf Fische einwirkende Stressoren nur für bestimmte Wasserschadstoffe herangezogen werden könnten.

WEEKS und WARINNER (1984, 1986) fanden bei Umberfischen (*Leiostomus xanthurus*, *Trinectes maculatus*), die im verschmutzten Flußwasser lebten, eine im Vergleich zur Kontrolle verringerte chemotaktische sowie phagozytische Aktivität der Nierenmakrophagen. Sie

vermuteten als Ursache eine erhöhte Kontamination der Tiere mit aromatischen Hydrokarbonen, analysierten jedoch nicht die im Flußwasser oder im Fisch vorhandenen chemischen Bestandteile.

Schwermetalle ( $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Cr}^+$ ,  $\text{Hg}^+$ ) oder Insektizide rufen unterschiedliche Blutbildveränderungen hervor und bewirken im allgemeinen eine Suppression sowohl der unspezifischen wie auch spezifischen Abwehrmechanismen (GRANT und MEHRLE 1973, HAIDER 1977, SCHRECK und LORZ 1978, KNITTEL 1981, ZEEMAN und BRINDLEY 1981, JUJENA und MAHAJAN 1983, LAIDLEY et al. 1988, THUVANDER 1989, SIWICKI und STUDNICKA 1992, DUNIER et al. 1994, SIWICKI und DUNIER 1994, DUNIER und SIWICKI 1994).

pH-Wertveränderungen im Wasser führen bei Regenbogenforellen zu Veränderungen der primären, sekundären und tertiären Streßantworten. pH-Werte im sauren Bereich ( $\text{pH} < 5.20$ ) resultierten nach 8 Tage langer Exposition zu einer signifikanten Erhöhung der Plasma-Kortisolkonzentrationen mit Hyperplasie der Interrenalzellen, die Blutglukosewerte stiegen nach 4 Tagen signifikant an (BROWN et al. 1984). pH-Werte kleiner als 4.70 resultierten in einer Zunahme des  $\text{T}_4/\text{T}_3$ -Verhältnisses, eine histologische Veränderung der Thyreoidea konnte jedoch nicht festgestellt werden. Nach 18 Tage stellten BROWN et al. (1984) erhöhte Mortalitätsraten bei pH-Werten zwischen 4,7 und 5,2 fest. Chronische Exposition von pH-Werten kleiner als 5,5 führten bei Regenbogenforellen zu einer Hämokonzentration und Phosphatkonzentrations-Zunahme im Blutplasma, die Kalzium-, Magnesium-, Natrium- und Chloridkonzentrationen nahmen ab (GILES et al. 1984). In einem pH-Bereich von 6,0 bis 7,5 verringerte sich die Plasmaosmolalität von 295 auf 290 mosm/kg. Mit fallenden pH-Werten von 5,2 auf 4,5 nahm die Plasmaosmolalität linear von 290 auf 250 mosm/kg ab, im Schnitt fiel sie pro pH-Werteinheit um etwa 47 mosm/kg. Bei weiter sinkenden pH-Werten bis 4,2 wurde ein Anstieg der Plasmaosmolalität beobachtet, der nicht mit der Konzentrationsänderung der Elektrolyte, Glukose oder freien Aminosäuren erklärt werden konnte. GILES et al. (1984) nehmen deshalb die Ausschüttung eines noch unbekanntes Plasmafaktors an, der zu der beobachteten Osmolaltätserhöhung führte. Akute (McDONALD 1983) und chronische (FUGELLI und VISLIE 1982) Exposition von Fischen im sauren pH-Bereich führten zu einer Erhöhung der Plasmaamino-säuren.

Im allgemeinen wird die pH-wertabhängige Verminderung des osmotischen Druckes mit einer Hypoglykämie und Verminderung der Plasmaelektrolyte in Zusammenhang gebracht (LEE et al. 1983, BROWN et al. 1984, GILES et al. 1984). Die Abnahme wird vor allem mit einem Natriumionen-Nettoausstrom aus Kiemen, Haut und Niere (gesteigerte Exkretion) erklärt (McWILLIAMS 1980, McDONALD und WOOD 1981), wobei sich Fische an chronisch verminderte pH-Werte akklimatisieren können, erkennbar an einem reduzierten Natriumausstrom (GILES et al. 1984).

Es existiert eine sehr große Zahl von Studien, die Blutbildveränderungen durch chemische Stressoren beschreiben und die die Funktion des Immunsystems bei Fischen beeinflussen können (FAISAL und HUGGET 1993). MAWDESLEY-THOMAS (1971) machte schon frühzeitig darauf aufmerksam, daß die durch toxische Chemikalien verursachte Fischsterblichkeit näher untersucht werden müsse. Zusammenfassende Darstellungen hierüber finden sich bei KOLLER (1979), ZEEMAN und BRINDLEY (1981) sowie DUNIER und SIWICKI (1994).

Anästhetika zur Immobilisation von Fischen können per se Veränderungen des Blutbildes hervorrufen (HOUSTON et al. 1971a), die einen durch das Anästhetikum selbst erzeugten stressähnlichen Zustand anzeigen (SMIT et al. 1979a, KLINGER et al. 1983, HOUSTON 1990). Andererseits stehen Fische, die ohne Betäubung, z.B. für eine Blutentnahme, aus dem Wasser gekeschert werden und längere Zeit an der Luft liegen, unter Stress, was ebenfalls die Blutwerte verändert (BRALEY und ANDERSON 1992). Im allgemeinen können die stressassoziierten Reaktionen (z.B. Hyperglykämie, Anstieg des Kortisolspiegels) durch die Anwendung eines Anästhetikums aufgehoben bzw. vermindert werden (SOIVIO et al. 1977, LIMSUWAN et al. 1983, ISHIOKA 1984a, MORALES et al. 1990, LADU und ROSS 1992). Ausschlaggebend für eine Streßreduktion ist dabei die angewendete Dosis des Betäubungsmittels. LAIDLEY und LEATHERLAND (1988) konnten nachweisen, daß eine Betäubung die Streßantwort der Tiere (Plasmakortisol- und Blutglukosekonzentrationen) mit einer hohen MS-222 (Tricain)-Konzentration von 125 mg/l Wasser signifikant reduzierte, die Plasmaprotein- sowie die Plasmaionen-Konzentrationen stiegen an. Ähnliche Ergebnisse fanden STRANGE und SCHRECK (1978) sowie BARTON und PETER (1982): Eine milde Sedation mit Tricain bewirkte eine Erhöhung der Kortisolwerte, wie sie bei Vorliegen von akut einwirkenden Stressoren charakteristisch ist, währenddessen eine Steigerung der Kortisolwerte bei hohen Tricaindosen (> 100 mg/l Wasser) ausblieb. Demgegenüber stellte WEDEMEYER (1970a) eine Abnahme der Ascorbatkonzentration im Interrenalgewebe fest, was er als eine durch MS-222 (Tricain) per se hervorgerufene Streßwirkung interpretierte. Eine Anaesthesie mit 100 ppm Tricain für 10 Minuten verhinderte bei Japanischen Goldbrassen (*Pagrus major*) die stressassoziierte Glukose- und Kaliumkonzentrations-Erhöhung im Blut (ISHIOKA 1984a). Ein zweistündiger Transport dieser Fischart in engen und stark belüfteten Transportbehältern ohne eine Sedation führte zu einer Hyperglykämie, erhöhten Hämatokritwerten sowie zu einer Natriämie (ISHIOKA 1984b). Im Gegensatz dazu führten niedrigere Dosierungen über eine längere Einwirkzeit (30 Minuten, 50 ppm) zu einem starken Anstieg der Serumglukose- und Natriumkonzentrationen. LIMSUWAN et al. (1983) konnten bei Welsen mit 3 mg Etomidat/l Wasser eine Streßreduktion erzielen, erkennbar an einem geringeren Blutglukose- und Laktatanstieg im Vergleich zu nicht betäubten Kontrollfischen.

SOIVIO et al. (1977) wiesen für MS-222 (Tricain) und Benzocain nach, daß eine initiale Schwellung der Erythrozyten infolge der eintretenden Atemlähme mit einhergehendem erniedrigtem Blut-Sauerstoffpartialdruck auftrat. Erkennbar war dies an einer Abnahme der

MCHC-Werte gegenüber der Kontrollgruppe. Weitere Befunde waren ein Anstieg der Hämatokritwerte, Laktat- und Hämoglobinkonzentrationen. Die Veränderungen dauerten bis zu 12 Stunden an, nach dieser Zeit konnten wieder die Anfangswerte festgestellt werden. FERREIRA et al. (1981b) stellten eine Hämokonzentration bei Verwendung einer ungepufferten Benzocainhydrochloridlösung bis 80 mg/l Wasser bei Karpfen fest. Kennzeichen waren eine Steigerung der Erythrozytenzahlen, der Hämatokritwerte und Hämoglobinkonzentrationen. Sie erklärten ihre Ergebnisse mit der Freisetzung von Erythrozyten aus der Milz. Bei höheren Benzocainkonzentrationen fiel die Hämokonzentration nicht so drastisch aus. FERREIRA et al. (1981b) betonen, daß die Anwendung hoher Benzocainkonzentrationen stressmindernd wirke. LIMSUWAN et al. (1983) konnten bei Betäubung von Welsen (*Ictalurus punctatus*) mit 1-4 mg Etomidat/l Wasser, und HOUSTON et al. (1971) bei Betäubung mit Tricain bei Seesaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) ebenfalls eine Hämokonzentration beobachten. Die im allgemeinen bei Betäubung von Fischen beobachtete Hämokonzentration wird mit der Entspeicherung der Erythrozyten aus der Milz erklärt (HOUSTON et al. 1971, FERREIRA et al. 1981b, LADU und ROSS 1992), die dabei festgestellten verminderten MCH-(Mean Corpuscular Hemoglobin) sowie MCHC-(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) Werte mit dem geringeren Hämoglobingehalt der in den Blutstrom entlassenen jungen Erythrozyten bzw. erythroblastären Stadien (SOIVIO et al. 1977, LIMSUWAN et al. 1983).

KLINGER et al. (1983) fanden hohe Blutlaktatkonzentrationen bei Betäubung von Welsen (*Ictalurus punctatus*) mit Tricain (280 mg/l Wasser). Hohe Lactatwerte bei der Betäubung sind neben der Schwellung der Erythrozyten ein Zeichen für eine anaerobe Stoffwechsellage, die durch eine Atemlähme hervorgerufen wird.

LOWE-JINDE und NIIMI (1983) stellten bei Regenbogenforellen fest, daß eine 20-minütige Betäubung mit Tricain den Hämatokritwert signifikant beeinflusste, er stieg von 35 % (1-minütige Betäubung) auf 41 % (20-minütige Betäubung) an. LADU und ROSS (1992a) konnten bei Anwendung von Anaesthetika und Elektronarkose bei Regenbogenforellen außer einer Hämokonzentration keine Veränderungen des Blutbildes feststellen.

Bei der Anwendung von Metomidat als Anästhetikum ist keine Erhöhung der Kortisolkonzentration festzustellen, deshalb galt es lange Zeit als "stressloses" Anästhetikum. Es stellte sich heraus, daß das Fehlen der primären Streßantwort durch die Hemmung der Hydroxilierung von Cholesterin zustande kam, und nicht durch eine Verminderung der Streßantwort durch die eintretende Sedation (STOSKOPF 1993).

SMIT et al. (1979a) untersuchten die Beeinflussung von 19 Blutvariablen durch Tricain (0 - 150 mg/l Wasser) bei drei verschiedenen Fischarten, das entweder mit NaOH auf pH 7,0 abgepuffert oder unverändert angewendet wurde. Sie führten die beobachteten Blutveränderungen, die akut auf Fische einwirkenden Stressoren ähnelten, zum einen auf die

hohe Azidität des ungepufferten Tricains zurück ("chemischer Stress"), wobei die Dosiserhöhung infolge der schnelleren Induktionszeit bis Stadium III zu einer geringeren Variation der Blutwerte führte (SMIT et al. 1979b). Gepuffertes Tracain bewirkte demgegenüber geringere Veränderungen, was SMIT et al. (1979a) als eine Streßreduktion deuteten. Sie kommen zu dem Schluß, daß eine hohe Konzentration des Betäubungsmittels verwendet werden sollte, um den "handling stress" zu mindern und, im Fall von Tricain, eine gepufferte Lösung benutzt werden sollte. Die Untersuchungen von SMIT et al. (1978, 1979a, 1979b) zeigten, daß Tricain einerseits per se einen Streßzustand hervorruft, andererseits über die Verschlechterung der Wasserqualität zu stressinduzierten Blutbildveränderungen führt.

#### 2.3.6.1.2 HALTUNGSBEDINGUNGEN UND MANIPULATIONEN AM FISCH ALS STRESSFAKTOREN

Neben bestimmten, im Wasser gelösten Umweltgiften verändern unterschiedliche Haltungsfaktoren und Manipulationen am Fisch die Blutparameter. Neben einer Verringerung der Blutlymphozytenzahl sind Störungen der immunologischen Potenz der Lymphozyten Ausdruck einer immunsuppressiven Wirkung von derartigen auf Fische einwirkenden Stressoren (PETERS 1988). So konnten ELLSAESSER und CLEM (1986) eine Störung der Oberflächenimmunglobulin-Bildung der Lymphozyten nach einem viertelstündigen Transport von Welsen nachweisen. FLOS et al. (1988) untersuchten die in der Praxis nicht vermeidbaren Stressoren bei Regenbogenforellen in Form des Umsetzens und Sortierens der Fische bei einer Einwirkdauer von jeweils 20 Minuten. Sie stellten in beiden Versuchsgruppen einen signifikanten Anstieg der Plasmakortisolkonzentrationen nach einer Stunde fest, die nach 3 bis 10 Stunden nahezu auf Werte der Kontrollgruppe abfiel. Sie bewerteten den schnellen Abfall der Hormonkonzentrationen sowie den moderaten Anstieg der Hämoglobinkonzentrationen und der Hämatokrit- sowie MCHC-Werte als Zeichen eines auf die Fische geringgradig einwirkenden Stressors.

Nach starker, 6-minütiger körperlicher Belastung stellten WOOD et al. (1983) bei Regenbogenforellen eine Hämokonzentration (Zunahme von Hämatokrit, Hämoglobin, Plasmoaprotein, Natrium und Chloridionen) fest, sowie eine schnell kompensierte respiratorische, gefolgt von einer länger andauernden metabolischen Azidose. 4 bis 8 Stunden nach der Belastung trat die höchste Mortalität auf. Die Tiere starben nicht an einer in der Literatur oft vermutete Akkumulation von Laktat im Blut, sondern an einer intrazellulär auftretenden Azidose.

Die Wirkung der Fischbesatzdichte als Stressor ist von der Fischart abhängig. WEDEMEYER (1976) untersuchte bei Pazifischen Lachsen (*Oncorhynchus kisutch*) und Regenbogenforellen den Effekt unterschiedlicher Besatzdichten auf die Blutglukose- und Chloridkonzentrationen. Bei einer Steigerung der Fischdichten von 8,2 auf 16 bis 64 kg/m<sup>3</sup> Wasser stellten die Lachse die Nahrungsaufnahme ein, Veränderungen der beiden sekundären

Streßparameter konnte er über einen Zeitraum von 16 Tagen nicht feststellen. Erst bei Besatzdichten zwischen 96 bis 193 kg/m<sup>3</sup> Wasser ermittelte er eine Hyperglykämie ohne Veränderungen der Chloridkonzentrationen, zusätzlich trat eine latent vorliegende Corynebacterium-Infektion auf. Die Erhöhung der Besatzdichte bei Regenbogenforellen auf über 16,1 kg/m<sup>3</sup> Wasser führte demgegenüber zu einer Hyperglykämie, die Fische reduzierten jedoch nicht die Nahrungsaufnahme. WEDEMEYER (1976) faßt zusammen, daß für diese beiden Arten im allgemeinen eine Besatzdichte von 7 bis 14 kg/m<sup>3</sup> gewählt werden sollte, um Streßeffekte und die damit verbundene Infektanfälligkeit zu vermeiden. PICKERING und POTTINGER (1987) betrachten bei Regenbogen- und Bachforellen die zelluläre Blutzusammensetzung (Lymphozyten, Thrombozyten) als einen sensitiveren Indikator für das Vorliegen von chronischem Stress als die Kortisolkonzentration. Sie untersuchten über 3 Wochen die Auswirkungen von sehr hohen Besatzdichten (18 gegenüber 123 g/l Wasser) auf die Veränderungen der Blutzellbestandteile und Kortisolwerte. Während die Kortisolwerte nach 6 bis 10 Tagen auf die Basalwerte abfielen, konnten die Autoren noch nach 3 Wochen verminderte Thrombozyten- sowie Lymphozytenzahlen feststellen. Sie vermuten, daß chronischer Stress zu einer erhöhten Kortisolclearance führte. So ist die hypothalamisch-hypophysäre Achse trotz erniedrigter Kortisolkonzentration noch aktiviert.

KJARTANSSON et al. (1988) untersuchten bei adulten Atlantischen Lachsen die Wirkung unterschiedlicher Besatzdichten auf 14 verschiedene Blutparameter. Auffälligste Veränderung war ein signifikanter Anstieg der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte nach 100 Tagen bzw. 143 Tagen, wenn die Besatzdichte von von 35-45 auf 100-125 kg/m<sup>3</sup> Wasser gesteigert wurde. Die Autoren kommen zu dem Schluß, daß nicht die steigende Besatzdichten als Streßfaktor anzusehen ist, sondern die dadurch verursachte schlechtere Wasserqualität zu den Blutbildveränderungen führte. Ähnliches stellten LAIDLEY und LEATHERLAND (1988) für Regenbogenforellen fest. PICKERING und STEWARD (1984) fanden bei Bachforellen erhöhte Plasmakortisolkonzentrationen im Zusammenhang mit hohen Besatzdichten, die jedoch nach 4-5 Wochen wieder Normalwerte erreichten. KLINGER et al. (1983) stellten bei in Wasserdurchlaufsystemen gehaltenen 565 bis 740 g schweren Welsen (*Ictalurus punctatus*) fest, daß mit einer Erhöhung der Besatzdichte (18, 80 und 215 kg/m<sup>3</sup> Wasser) eine Hämokonzentration (steigende Hämatokritwerte und Hämoglobinwerte) und ein Rückgang der Thrombo-, Lympho- und Granulozytenzahlen auftrat. In Wasserkreislaufsystemen gehaltene Tiere zeigten mit Steigerung der Besatzdichte eine Reduktion der Thrombozytenzahlen, die Lymphozyten- und Granulozytenzahlen waren erhöht. Alle anderen biochemischen Blutparameter (Kortisol-, Glukose-, Laktatkonzentrationen) waren in beiden Gruppen nicht verändert. Die Autoren führten die Hämokonzentration auf die schlechtere Wasserqualität zurück. KLINGER et al. (1983) werteten die veränderten Zellparameter bei Vorliegen von physiologischen "ungestressten" Kortisolkonzentrationen als ein Zeichen des Übergangs von der Alarmphase in die Adaptationsphase. Die im Gegensatz zu anderen Untersuchungen aufgetretene Granulozytopenie bei steigender Besatzdichte erklärten die Autoren mit der Tatsache, daß die

verminderten Rangordnungskämpfe zu einem geringeren Verletzungsrisiko durch Bißwunden führten. Eine in Verbindung mit hoher Besatzdichte vermutete Immunsuppression wurde nach Meinung von KLINGER et al. (1983) durch den immunstimulierenden Effekt der bei hoher Fischdichte "schlechten" Wasserqualität kompensiert. Welche Wasserqualitätsparameter hierfür verantwortlich waren, wurde von den Autoren nicht angegeben.

Die optimale Besatzdichte kann sich in Abhängigkeit von der Fischgröße ändern. Bei Regenbogenforellen scheinen, gemessen an den Leukozyten- und Lymphozytenzahlen, kleine Tiere hohe und große Tiere geringe Besatzdichten zu bevorzugen (OIDTMANN 1994). Sie fand bei kleinen Fischen (< 12 cm) mit fallenden Besatzdichten bzw. bei großen Tieren (> 18 cm) bei hohen Besatzdichten eine Leuko- und Lymphopenie. KEBUS et al. (1992) konnten bei zwei unterschiedlichen Besatzdichten (56 und 267 g/l) keine Veränderungen der Wachstumsleistungen, der Zunahme des Kerndurchmessers der Interrenalzellen, Atrophie der Magenmukosazellen, der Kortisolkonzentrationen oder der Hämatokritwerte bei 150 g schweren Regenbogenforellen finden. Sie führten dies auf die gute Wasserqualität zurück. PICKERING und STEWARD (1984) und LAIDLEY und LEATHERLAND (1988) sind der Meinung, daß erhöhte Plasmakortisolwerte als Folge erhöhter Besatzdichten nicht gleichbedeutend mit einer Streßreaktion sind; kehren die Plasmakortisol-Konzentrationen wieder auf die Ausgangswerte zurück, können andere Variablen, wie z.B. die Wachstumsrate, weiterhin reduziert sein. Zudem konnten LEATHERLAND und CHO (1985) bei Regenbogenforellen nachweisen, daß der Kortisolspiegel umgekehrt mit der Besatzdichte korreliert. Da erhöhte Besatzdichten die Wasserqualität verschlechtern, scheinen primär diese Faktoren infolge Veränderungen des Stoffwechsels das Wachstum negativ zu beeinflussen (LAIDLEY und LEATHERLAND 1988). LEATHERLAND (1993) kommt in seinen Untersuchungen zu dem Schluß, daß eine hohe Besatzdichte (150 kg/m<sup>3</sup>) ipso facto für Regenbogenforellen keinen Stressor darstellt. Die beobachtete Verschlechterung des Wachstums und die verminderten T<sub>3</sub>-Blutkonzentrationen bei hohen (150 kg/m<sup>3</sup>) im Vergleich zu niedrigen (60 kg/m<sup>3</sup>) Besatzdichten führte er auf die verminderte Nahrungsaufnahme zurück.

MURRAY (1980) und MURRAY und BURTON (1979) zeigten, daß eine Steigerung der Besatzdichte eine Veränderung der Erythrozytenmorphologie bei Welsen (*Ictalurus punctatus*) bzw. Goldfischen hervorrief. Je höher die Besatzdichte gewählt wurde, desto runder erschienen die Erythrozyten, die Anzahl der kleinen Normalgeformten nahm ab. Weiterhin konnten die Autoren eine Thrombozytopenie sowie Lympho- und Leukozytose ermitteln. RAM BHASKAR und RAO (1990) stellten bei Milchfischen (*Chanos chanos*) einen Abfall der Hämatokritwerte gegenüber der Kontrolle mit einer Steigerung der Besatzdichte oder im Hungerzustand fest.

Nach dem Fang von verschiedenen Sportfischarten konnten WELLS et al. (1986) starke Veränderungen der sekundärer Streßparameter feststellen. Neben einer Erhöhung der Elektrolyte (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Cl<sup>-</sup>) und der Plasmaosmolalität wurden eine Hämokonzentration sowie Hyperglykämie und -laktämie gefunden. Die Erhöhung verschiedener Muskel- und Leberenzyme wiesen auf Zerreissungen innerer Organe und der Muskulatur hin. Auffallend war eine hohe

Konzentration von Methämoglobin, was mit einer Erniedrigung des Blut-pH-Wertes interpretiert wurde; geringe pH-Werte erhöhen die Oxidation von Hämoglobin in das Methämoglobin (WELLS und DAVIE 1985, WELLS et al. 1986).

Der Fisch-Organismus reagiert unterschiedlich auf akute oder chronische Stressoren. Im allgemeinen scheint bei akutem Stress die Kortisolkonzentration als Stressindikator von Wichtigkeit zu sein; bei akut auf Fische einwirkenden Stressoren spielten vor allem Veränderungen des zellulären Blutbildes eine Rolle (PICKERING und POTTINGER 1987, FLOS et al. 1988). Die Einwirkung von chronischem Stress verursachte bei Bach- und Regenbogenforellen nur eine Thrombopenie und Lymphopenie, eine Beeinflussung der Erythrozyten oder Neutrophilenzahlen konnte nicht ermittelt werden (PICKERING und POTTINGER 1987). Die Autoren verwendeten als Stressmodell die Erhöhung der Besatzdichte von 18 auf 123 g/l Wasser. Demgegenüber konnten McLEAY (1973a) und McLEAY und BROWN (1974) keine Veränderungen der Thrombozytenzahl bei Einwirkung chronischer Stressoren feststellen. Ihr Modell basierte auf einer 25-tägigen Exposition von juvenilen Pazifischen Lachsen (*Oncorhynchus kisutch*) mit Abwässern aus Papierfabriken. Nach PICKERING und POTTINGER (1987) scheinen bei chronischen Stressoren andere, noch unbekannte Mechanismen zu existieren. VERBURG-KEMENADE et al. (1994) wiesen für Karpfen nach, daß die CRH-ACTH-Achse vor allem bei kurz einwirkenden Stressoren, bei chronischen Stress die TRH-MSH-Achse aktiviert wird. Akute Stressoren bewirkten nach PICKERING et al. (1982, 1987) und PICKERING (1984) **keine** Veränderungen der Thrombozytenanzahl. FLOS et al. (1988) fanden bei Regenbogenforellen, daß nach akut auf Fische einwirkenden Stressoren (Umsetzen und Sortieren der Fische) die Kortisolkonzentration einen sensitiveren Indikator als der Hämatokritwert, die Hämoglobin- oder die Glucose darstellt. Die Lymphozyten von Salmoniden reagierten sehr sensibel auf erhöhte Kortisolkonzentrationen (WEDEMEYER et al. 1983, PICKERING 1984). PICKERING und POTTINGER (1987) stellten bei Regenbogen- und Bachforellen eine von der Kortisolkonzentration unabhängige Lymphopenie bei Einwirkung von chronischen Stressoren fest. Sie vermuteten deshalb einen prolongierten Kortisoleffekt auf die Lymphozyten oder sog. "water-born immunosuppressive factor(s)". Welcher Natur diese Faktoren sein könnten, gaben die Autoren nicht an. WEDEMEYER et al. (1983) fanden nach Erhöhung der Besatzdichte von 40 g auf 200 oder 400 g/l nach drei Tagen eine signifikante Reduktion des Leukritwertes bei Pazifischen Lachsen (*Oncorhynchus kisutch*) und Regenbogenforellen von 1,6 bis 2,0 % auf etwa 1,20%.

Akuter Stress führte bei Fischen im Verlauf der Alarmreaktion beim AAS zu ähnlichen Veränderungen des zellulären Blutbildes wie bei Wärmblüter (MAULE et al. 1989, ANDERSON 1990). Oftmals wurde ein initialer Abfall der Leukozyten- und Thrombozytenanzahl im Blut sowie der Blutglukosekonzentrationen als Antwort auf akut einwirkende Stressoren gesehen (McLEAY 1975, McLEAY und BROWN 1975, PICKERING et al. 1982). Während McLEAY (1975) und PICKERING (1984) noch eine mögliche zytolytische Wirkung von Korticosteroiden

bei Fischen diskutierten, zeigten MAULE und SCHRECK (zit. in MAULE et al. 1989) und MAULE et al. (1989), daß akut auf Königslachse einwirkende Stressoren oder Verfütterung von Kortisol eine Umverteilung der Lymphozyten bewirkte. Die Anzahlen der Blut- und Milzleukozyten nahmen ab, diejenigen in Thymus und Vorderniere zu. Dieses Muster trat nach 3 Stunden auf und dauerte 2 bis 3 Tage an.

WEDEMEYER (1972) untersuchte bei Silberlachsen und Regenbogenforellen die Auswirkungen des Herauskescherns und des Transfers der Tiere in ein 25 m weiter abgelegenes Fischbecken auf verschiedene Blutparameter. Auffälligste Kennzeichen der akuten Streßeinwirkungen waren für beide Fischarten eine Hyperglykämie sowie Hypochlorämie. Maximale Blutglukosewerte traten 3 Stunden nach Streßeinwirkung auf, Ausgangswerte von etwa 60 mg/100 ml Blut wurden erst nach 24 h erreicht. Die Chloridwerte sanken innerhalb von 5 Stunden von 130 auf 110 mmol/l und erreichten nach 24 Stunden die Werte von ungestressten Tieren. Insgesamt entstand eine über 24 Stunden andauernde osmoregulatorische Imbalanz. Die Zugabe von 0,3 % NaCl (100 mosm/kg) zum Wasser reduzierte den Abfall der Chloridwerte und dämpfte die Hyperlycämie ab, was WEDEMEYER (1972) als eine Streßreduzierung interpretierte.

MELOTTI et al. (1992) überprüften die Auswirkungen von drei unterschiedlichen Fangmethoden (Angeln, Herauskeschern, direktes Ergreifen mit der Hand ) bei männlichen und weiblichen Bachforellen. Sie stellten fest, daß die Meßparameter je nach angewandter Fangmethode und Geschlecht unterschiedlich reagierten. Bei den männlichen Tieren stieg die Glukosekonzentration im Plasma nur beim Herauskeschern an, bei den weiblichen Tieren nach Herauskeschern und Angeln. Die Kortisolkonzentrationen nahmen bei den männlichen Fischen in Abhängigkeit der Fangmethode zu verschiedenen Zeiten zu: nach Ergreifen der Fische mit der Hand konnte ein sofortiger Kortisolanstieg festgestellt werden, bei den anderen Fangmethoden stieg die Konzentration zu unterschiedlichen Zeiten an. Bei den weiblichen Tieren konnte unabhängig von der Fangart ein sofortiger Kortisolanstieg gemessen werden, der 30 Stunden nach Einwirkung der Stressoren noch bemerkbar war. Die Androgenkonzentrationen fielen bei den männlichen Bachforellen unabhängig von der verwendeten Fangmethode über 30 Stunden stark ab, die weiblichen Tiere zeigten bei allen Fangmethoden unveränderte Androgen-Konzentrationen im Plasma.

GRAHAM et al. (1982) fanden, daß der Natrium- und Chloridgehalt im Plasma von Regenbogenforellen bei hoher Anstrengung zunahm; die durch Stressoren verursachte erhöhte Plasmalaktatkonzentration führte zu einem Einstrom von Wasser aus der Blutbahn in die Blutzellen und damit zu einer Hämokonzentration über eine Abnahme des Blutvolumens. Der beobachtete Anstieg von Kalium im Blutplasma konnte als Folge einer intrazellulären Azidose interpretiert werden.

Eine Hämokonzentration dient in erster Linie der Steigerung der Sauerstoffbereitstellung während oder nach Anstrengungen (PERSON und STEVENS 1991). Es existieren für die Hämokonzentration drei Mechanismen bei Fischen, wobei die vermehrte Ausschüttung von Erythrozyten aus der Milz eine echte Adaptation darstellt. Folgen sind eine Erhöhung des Hämatokritwertes und der Hämoglobinkonzentrationen. Die nach akuten Stressoren auftretende Erythrozytenschwellung oder der osmotisch regulierte Wassershift vom Blut in das Gewebe infolge erhöhter Laktatkonzentration in der Muskulatur (Abnahme des Plasmavolumens) trugen ebenfalls zu einer Steigerung beider Blutparameter bei, sind jedoch im eigentlichen Sinne keine Adaptationsmechanismen (PERSON und STEVENS 1991). Alle drei Vorgänge traten gemeinsam auf und waren schwer voneinander unterscheidbar.

CAIRNS und CHRISTIAN (1978) untersuchten die Wirkung der Blutentnahme ("hämorrhagischer Stress") auf das Blutbild von Regenbogenforellen. Bei täglicher Blutentnahme über eine Woche oder bei wöchentlicher Entnahme über einen Zeitraum von einem Monat stellten sie nach einem initialen Anstieg einen Abfall des Hämatokritwertes, sowie einen Anstieg der Lactatdehydrogenase und der Kreatininphosphatkinase im Plasma fest. Einen effektiven Indikator für die Streßeinwirkung stellte hierbei der Hämatokritwert dar, er verringerte sich bei täglicher Blutentnahme über eine Woche von 37,3 auf 12,6 %. CAIRNS und CHRISTIAN (1978) sowie ANDERSON (1990) sehen den Hämatokritwert neben der Erythrozytenzahl und Hämoglobinkonzentration als einen zuverlässigen Parameter an, Einwirkungen von chronischen Stressoren aufzuzeigen. CAIRNS und CHRISTIAN (1978) belegten in ihren Untersuchungen, daß wiederholte Blutentnahme im täglichen oder wöchentlichen Abstand von 0,2 % des Körpergewichtes eine schwere Anämie und den Tod der Tiere zur Folge haben kann. Werden große Mengen an Blut entnommen, so normalisieren sich die Erythrozytenwerte erst nach 4-6 Wochen, die Leukozytenzahlen nach 2 - 3 Wochen. HOFFMANN und LOMMEL (1984) fanden bei Regenbogenforellen, daß eine dreimaliger Blutentnahme im wöchentlichen Abstand keine signifikanten Veränderungen der Blutparameter verursachte. Sie konnten nur eine milde Anämie feststellen, erkennbar an einer geringgradigen Verringerung der Erythrozytenanzahl, der Hämoglobinkonzentrationen sowie der Hämatokritwerte. HOFFMANN et al. (1982) konnten nachweisen, daß die Art der Blutentnahme und Betäubung das rote Blutbild beeinflussten. So führte die Immobilisierung von Regenbogenforellen durch einen Schlag auf den Kopf zu erniedrigten Thrombo- und Erythrozytenzahlen sowie geringeren Hämatokrit- und Hämoglobinwerten. Die Blutentnahme mittels Durchschneiden des Schwanzstiels resultierte, verglichen mit der Herzpunktion, in einer Erhöhung dieser drei Blutparameter. Zudem konnte eine erhöhte Erythropoese festgestellt werden. Die Leukozytenzahlen waren nur bei Anwendung des Betäubungsmittels MS-222 verändert, das Differentialblutbild wurde durch die Art der Blutentnahme und Betäubung nicht verändert. Demgegenüber stellten RAILO et al. (1985) eine von der Blutentnahmetechnik abhängige Veränderung verschiedener Blutparameter fest. Sie verglichen den Hämatokritwert und die Natrium- sowie Kaliumkonzentrationen bei Regenbogenforellenblut, das durch Herzpunktion (Betäubung durch einen Schlag auf den Kopf)

und durch eine Dauerkanüle (ohne Betäubung) gewonnen wurde. Zeichen einer Erythrozytenschwellung war ein Anstieg des Hämatokrit- sowie MCHC-Wertes bei der Entnahme des Blutes durch Herzpunktion. Weitere stressinduzierte Veränderungen betrafen den Blut-pH-Wert, der von 7.9 auf 7.3 bei Entnahme durch Herzpunktion abfiel. Der Kaliumgehalt stieg demgegenüber an. Die Autoren führten die Blutveränderungen auf die während des handlings erhöhte Katecholaminkonzentrationen zurück. Der durch Adrenalin verursachte  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$ -Einstrom in die Erythrozyten führte zu einem Wasserinflux und zu der beobachteten Zellschwellung mit Zunahme des Hämatokritwertes. Der Protonenefflux aus den Erythrozyten und der Muskulatur oder der veränderte  $\text{CO}_2$ -Gehalt säuerten das Blut an. Nach starker physischer Belastung kann der pH-Wert stark abnehmen. WOOD et al. (1983) wiesen für Regenbogenforellen nach, daß kurz nach Belastung der Blut-pH-Wert von 7,8 auf 7,3 abnahm und sich nach 8 Stunden wieder normalisierte.

Rangordnungskämpfe stellten bei Fischen Stressoren dar (PETERS et al. 1980, PETERS 1988). So führte ein Zusammensetzen von zwei Regenbogenforellen zu ausgeprägten Rangordnungskämpfen, die nach PETERS et al. (1991) bei dem untergeordneten Tier sowohl zur Aktivierung als auch zu degenerativen Erscheinungen des hämatopoetischen Gewebes führten, je nachdem welche Phase des AAS vorlag. Als Zeichen einer Aktivierung (Alarmphase) wurden eine Proliferation, Hypertrophie, vermehrte Lysosomenbildung und Pseudopodienbildung der Phagozyten (Histiozyten, Retikulumzellen, polymorphkernige Granulozyten) in der Vorniere festgestellt. Als degenerative Erscheinungen in der Erschöpfungsphase wurden die erhöhte Autophagozytie der Erythrozyten und die Lysis der primären und sekundären Lysosomen von Makrophagen aufgrund einer lokal ausgebildeten Ischämie in der Vorniere bewertet. Die während der ausgetragenen Rangordnungskämpfe unterlegenen Fische zeigten auch nach Beendigung der Kämpfe Anzeichen von Stress, so z.B. beschleunigte Atemfrequenz und einen erhöhten Blutzuckerspiegel. Kann der Fisch nicht entweichen, so führen die adaptiven Mechanismen zu negativen Effekten (PETERS 1988). Bei Aalen existieren ähnliche Veränderungen bei sozialem Stress. Trotz einer Abnahme der Leukozytengesamtzahl stieg der Leukritwert an, was auf einer Vermehrung der relativ voluminösen Granulozyten basierte. Kennzeichnend war weiterhin eine Steigerung der Blutlaktat- und Glukosekonzentrationen. Die unterlegenen Tiere zeigten zudem eine höhere Variabilität der Blutwerte (PETERS et al. 1980). Die Autoren fassten zusammen, daß die Veränderungen als Teil des Selye'schen Streßkonzeptes zu sehen sind, wobei die hierarchische Ordnung zu klinisch faßbaren, teilweise irreversiblen Effekten bei den unterlegenen Tiere führte.

Steigende Hämatokritwerte bei der Kortisolverfütterung von 45 auf 56 % bei Regenbogenforellen konnten BARTON et al. (1987) auf eine (kortisolabhängige) Umverteilung der Extrazellulärflüssigkeit relativ zum Blutvolumen und nicht auf eine gesteigerte Erythropoese oder Schwellung der Erythrozyten zurückführen. Die von den Autoren beobachtete Lymphopenie ohne Veränderungen der Neutrophilen und Thrombozyten bei Kortisolverfütterung führten sie

wie McLEAY (1973) oder PICKERING (1984) auf eine direkte Kortisolwirkung zurück. Mit der Abnahme der Leukozytenanzahl infolge chronischem Stress oder ständig auf Fische einwirkenden akuten Stressoren kann eine funktionelle Änderung der Lymphozyten einhergehen (GRIMM 1985, ELLSAESSER und CLEM 1986), sodaß die Krankheitsinzidenz ansteigt (BARTON et al. 1987).

#### 2.3.6.1.3 IMMUNSYSTEM, INFEKTANFÄLLIGKEIT UND STRESSOREN

Wohlbefinden und Gesundheit der Nutzfische sind in hohem Maße von den aquatischen Milieubedingungen abhängig, die sich in Intensivzuchten als ein sensibles Gefüge von chemischen, physikalischen und biologischen Faktoren darstellen (SNIESZKO 1974, SINDERMANN 1983, AHMEN et al. 1987, PETERS 1988, 1990, MAULE et al. 1989, WLASOW et al. 1990). Störungen des Faktorengleichgewichtes resultieren in Verhaltensveränderungen, gesteigerter Infektanfälligkeit oder chronischen Gesundheitsschäden, die als eindeutige Kriterien für eine nicht artgemäße Haltung anzusehen sind (PETERS 1990).

Eine erhöhte Infektanfälligkeit kann durch folgende Faktoren ausgelöst werden (WEDEMEYER 1970, WEDEMEYER 1976, SNIESZKO 1974, WALTERS und PLUMB 1980, PETERS 1988, MAULE et al. 1989, WLASOW et al. 1990, BARTON und IWAMA 1991, WESTER et al. 1994, ESPELID et al. 1996):

- Erhöhung der Besatzdichte
- Temperaturveränderungen
- Änderungen des Sauerstoff- und Stickstoffpartialdrucks
- Eutrophierung der Gewässer
- Verschmutzung der Gewässer mit Abwässern aus Industrie und Haushalt
- Erhöhung der fischtoxischen Stickstoffverbindungen Ammoniak, Nitrit und Nitrat
- Erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentrationen im Wasser
- Transport
- Rangordnungskämpfe
- Kurzzeitige (Minuten) Manipulationen am Fisch ("handling stress")
- orale Hydrokortisongaben, Kortisolimplantate

Die durch Stressoren verursachte Immunsuppression kann zum Teil mit einer Erhöhung der Kortisolkonzentrationen erklärt werden, da es die Entstehung von antikörperproduzierenden Zellen in der Vorniere und Milz und damit die Bildung von spezifischen Antikörpern in vitro und in vivo hemmt (KAATTARI und TRIPP 1987, TRIPP et al. 1987, MAULE et al. 1989, ANDERSON 1990, WESTER et al. 1994). Die immunsuppressive Wirkung manifestiert sich u.a. in einer verminderten bakteriziden Aktivität der Phagozyten (ROHBOM und NITKOWSKY

1974, STAVE und ROBERSON 1985), einer verminderten Abwanderung der Leukozyten aus den Geweben (WESTER et al. 1994), einer (kortisolinduzierten) Lymphozytopenie (PICKERING 1982, 1984), einer Hemmung der mitogeninduzierten Proliferation von Milz- und Nierenlymphozyten (TRIPP et al. 1987) und einer Abnahme der Dichte der Melanomakrophagenzentren in der Leber (WESTER et al. 1994). PULSFORD et al. (1995) untersuchten verschiedene Einflußvariablen (Krankheit, Kortisol, Kupferexposition und Vitamin E) auf das Immunsystem von Plattfischen. Kortisol reduzierte in einer Konzentration von 320 ng/ml in der Zellsuspension die Phagozytoseaktivität von aus der Milz und Niere gewonnenen Zellen der Kliesche (*Limanda limanda*) in vitro. Bei 150 ng/ml wiesen sie einen stimulatorischen Effekt nach. Der Phorbolmyristat-induzierte "respiratory burst" der Milz- und Nierenphagozyten wurden ebenfalls bei 320 ng Kortisol/ml Zellsuspension gehemmt, erhöhte jedoch den Grundlevel. Die proliferative Antwort von Lymphozyten, die in vitro durch B- und T-Zellstimulatoren behandelt wurden, wurde durch Kortisolgaben dosisabhängig gehemmt.

An Hautulzera unklarer Genese erkrankte Flundern (*Platichthys flesus*) sowie Seezungen (*Solea solea*) zeigten einen geringeren Hämatokritwert, höheren Leukritwert, geringere Serumproteinkonzentrationen und einen höheren Anteil an Blutphagozyten im Vergleich zu gesunden Tieren. EVENBERG et al. (1986) stellten bei der ulzerativen Form einer *Aeromonas salmonicida*-Infektion ähnliche Ergebnisse bei Karpfen fest. WEEKS et al. (1986) sowie PULSFORD et al. (1995) kamen zu dem Schluß, daß die Messung nur eines einzelnen Biomarkers, der zur Abschätzung einer Immunsuppression herangezogen wird, nicht ausreichte, den Gesundheitszustand eines Fischbestandes zu beschreiben. So konnte bei Stress eine Stimulierung der Pinozytoserate von Phagozyten gemessen werden (Neutralrotaufnahme) bei gleichzeitiger Hemmung der Phagozytose. Je nachdem welcher Zustand innerhalb des AAS durchlaufen wird, reagiert das Immunsystem unterschiedlich.

PICKERING und POTTINGER (1989) sind nach Durchsicht der Literatur der Ansicht, daß eine chronische Erhöhung der Kortisolkonzentrationen auf 10 µg/ml Blutplasma bei Bach- und Regenbogenforellen für bakterielle Infektionen disponiert. Dies tritt z.B. bei Überbesatz, über längere Zeit andauerndes Abfischen oder in der Phase der Heranbildung der Sexualprodukte ein. Die bei Kortisolverfütterung oder nach akutem oder chronischem Stress beobachtete Abnahme der Leukozytenanzahl kann mit einer funktionellen Änderung der Lymphozyten einhergehen (GRIMM 1985, ELLSAESSER und CLEM 1986), sodaß die Krankheitsinzidenz ansteigt (BARTON et al. 1987):

WEDEMEYER (1976) konnte bei Pazifischen Lachsen, die sich im Übergangsstadium von der Süßwasser- zur Salzwasserphase befanden (Smoltifikation), mit Erhöhung der Besatzdichte einen Ausbruch einer latent vorliegenden *Corynebakterium*-Infektion nachweisen. Die vorangehende Kupferexposition von Regenbogenforellen für 4 Tagen in einer Konzentration von 7 oder 10 µg/l Wasser erhöhte die Mortalitätsrate von mit *Yersinia ruckeri* experimentell

infizierten Regenbogenforellen (KNITTEL 1981). Er führte die hohe Sterblichkeit auf die durch Kupfer verursachte reduzierte Phagozytoseaktivität zurück. ANGELIDIS et al. (1987) stellten fest, daß bei experimenteller Infektion von Regenbogenforellen mit *Aeromonas salmonicida* die Mortalitätsrate von 40 % bei ungestressten auf 60 % bei gestressten Fischen anstieg. Ihr Streßmodell basierte auf einem 15- und 30-minütigen Aufenthalt der Fische in unbelüftetem seichem Wasser. Die Tiere zeigten zudem eine Lymphopenie. MAULE et al. (1989) konnten bei Königslachsen nachweisen, daß 4 Stunden nach Einwirkung von akuten Stressoren eine mit dem Kortisolpeak einhergehende verminderte Bildung von Antikörpern auftrat. Zu diesem Zeitpunkt war die Empfänglichkeit gegenüber experimentellen Infektion mit *Vibrio anguilla* über das Wasser erhöht. 24 Stunden nach gesetztem Stress jedoch konnten MAULE et al. (1989) eine erhöhte Resistenz gegenüber der Infektion feststellen. Die Kortisolkonzentration und die antikörperproduzierenden Zellen (APZ) normalisierten sich wieder. 7 Tage danach konnte bei physiologischen Kortisolkonzentrationen eine Verringerung der APZ festgestellt werden, obwohl keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Infektion auftrat. MAULE et al. (1989) interpretierten ihre Ergebnisse dahingehend, daß 7 Tage nach der Einwirkung akuter Stressoren die unspezifischen Immunmechanismen nicht beeinflußt waren und vermutlich sogar verstärkt wurden. Einen weiteren Hinweis für die Ungültigkeit der kortisol- bzw. stressinduzierten Immunsuppression lieferte ALFORD et al. (1994). Er setzte Welse (*Ictalurus punctatus*) akutem Stress aus, indem er die Fische mit einem Kescher direkt unter der Wasseroberfläche hielt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die gestressten Fische eine verringerte Apoptoserate der isolierten Blutlymphozyten, das Maß der Reduktion war von der Einwirkdauer des Stressors abhängig. Hydrokortison hatte keine Wirkung auf die Apoptoserate in vitro. Wurden die Lymphozyten mit dem Plasma der gestressten Fische in der Zellkultur inkubiert, so reduzierte sich die Absterberate durch Apoptose. Die Autoren propagierten aus diesem Grund einen bestimmten Plasmafaktor, der die Zellen vor dem programmierten Zelltod schützte.

ESPELID et al. (1996) sind deshalb der Auffassung, daß die Wirkung von durch Stressoren erhöhten Kortisolkonzentrationen auf das Immunsystem unklar ist. Es ist unbekannt, ob die bei Fischen durch Administration oder nach Einwirkung von Stressoren beobachtete Lymphozytopenie (und Neutrophilie) durch die direkte zytolytische Hormonwirkung oder durch eine Veränderung des Verteilungsmusters zustandekommt (PICKERING 1984, ELLSAESSER und CLEM 1986, 1987, ANGELIDIS et al. 1987, WIJK et al. 1989). ESPELID et al. (1996) untersuchten bei juvenilen Atlantischen Lachsen die Wirkung von intraabdominal injiziertem Kortisol und akut sowie chronisch auf die Tiere einwirkenden Stressoren auf verschiedene immunologische Parameter. Sie stellten fest, daß die Antwort des Organismus bei Administration von Kortisol oder bei Streßeinwirkung unterschiedlich ist. Die Injektion von 10 µg Kortisol resultierte in einer erhöhten Serum-Kortisolkonzentration mit einer nachfolgenden Thrombozytose und verminderten mitogenen Proliferationsraten der Lymphozyten. Die Anzahl der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten blieb im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Demgegenüber bewirkte der Einfluß von akuten Stressoren eine schnelle Clearance des im Blut erhöhten Kortisolspiegels, so daß sich die o.g. Parameter nach 1-2 Tagen wieder normalisierten.

Chronische Stressoren bewirkten weder eine Verminderung des Antikörpertiters von vakzinierten Tieren, noch erhöhten sie die Infektanfälligkeit. Eine erhöhte Kortisolkonzentration ist demnach nicht gleichbedeutend mit einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber pathogenen Erregern (CHEN et al. 1983, ESPELID et al. 1996). Demgegenüber stellten WIIK et al. (1983) bei Atlantischen Lachsen, MAULE et al. (1987) bei Pazifischen Lachsen sowie PICKERING und DUSTON (1983) und PICKERING und POTTINGER (1985) bei Bachforellen bei chronisch erhöhten Kortisolkonzentrationen (orale Gabe oder Implantate) eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber fischpathogenen bakteriellen Erregern fest. Eine Lymphopenie, die durch Einwirkung chronischer Stressoren verursacht wurde, führte nach PICKERING und POTTINGER (1987a) zu einer Phase der erhöhten Infektionsanfälligkeit und erhöhter Mortalität. PICKERING und POTTINGER (1987) sowie ESPELID et al. (1996) kamen zu dem Schluß, daß die Antwort des Organismus auf akute oder chronische Stressoren differenziert zu sehen ist und daß die in der Literatur gewonnenen Ergebnisse kaum vergleichbar sind. Die stressinduzierte Antwort ist abhängig von der Dauer, Art und Schwere des Stressors sowie von der Tierart. Akute Stressoren bewirkten eine Immunsuppression, chronisch auf Fische einwirkende Stressoren führten über eine erhöhte Kortisolclearance oder Akklimatisation an den Stressor **nicht** zu einer Veränderung immunologischer Parameter, z.B. Lymphopenie (REDDING et al. 1984, PICKERING und POTTINGER 1987, ESPELID et al. 1996). FEVOLDEN et al. (1991) konnten bei Regenbogenforellen und Atlantischen Lachsen zeigen, daß die Individuen unterschiedlich auf Stressoren reagierten, was sich in unterschiedlichen Kortisolkonzentrationen mit starken oder schwachen Veränderungen der sekundären Streßantwort ausdrückt (low und high Respondertiere; LR bzw. HR). Der Unterschied zwischen solchen Fischen war, daß die low responder (LR) gegenüber akuten Stressoren zwar geringere Anfangs-Kortisolkonzentrationen zeigten, die Hormonspiegel bei den high Respondertieren (HR) jedoch länger aufrecht erhalten blieben (POTTINGER et al. 1994). Die Leukozytenanzahl nahm innerhalb der ersten 24 Stunden in beiden Gruppen ab, die der LR erreichte nach 96 Stunden wieder die Ausgangswerte (ungestresst). Die Leuko- bzw. Lymphopenie der HR hielt jedoch über 14 Tage an.

Chronisch erhöhte Kortisolkonzentrationen (Kortisolimplantate) verursachten bei Pazifischen Lachsen (*Oncorhynchus kisutch*) eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber Infektionskrankheiten sowie eine verminderte Fähigkeit, antikörperproduzierende Zellen (APZ) in vivo zu bilden (MAULE et al. 1987, PICKERING und POTTINGER 1987, 1987a; WOO et al. 1987). Die Kortisolgabe zu Kulturmedien in physiologischen Konzentrationen konnte dosisabhängig die Bildung von antikörperproduzierenden Zellen (APZ) hemmen (TRIPP et al. 1987). Die beobachtete Immunsuppression 4 Stunden nach akuten Stressoren führten MAULE et al. (1989) auf die erhöhten Kortisolkonzentrationen zurück. Sie vermuten ähnliche Mechanismen, wie von TRIPP et al. (1987) sowie KAATTARI und TRIPP (1987) angegeben: Kortisol unterdrückt die Sekretion von Interleukin-1 (IL-1) ähnlichen Botenstoffen, die von makrophagenähnlichen Zellen ausgeschüttet werden. Die antigenspezifischen B-Zell-Vorläuferzellen können so nicht mehr aktiviert werden. MAULE et al. (1989) kommen zu dem Schluß, daß nach akuten Stress ähnliche immunologisch-hormonelle Wechselbeziehungen

zwischen Mäusen und Pazifischen Lachsen existieren: Akuter Stress führte zu einer funktionellen Änderung der Lymphozytenpopulationen in den Abwehrgeweben. Ähnliche Ergebnisse konnten ESPELID et al. (1996) für Atlantische Lachse ermitteln.

Kortisol kann zu einer funktionellen Änderung des Immunsystems führen, ohne daß die Lymphozytenanzahl im Blut verändert ist. WOO et al. (1987) stellten in Implantationsversuchen bei Regenbogenforellen fest, daß die chronisch erhöhte Kortisolkonzentration die Anfälligkeit gegenüber experimentell verursachten *Cryptobia salmositica*-Infektionen steigerte, eine Lymphopenie konnte jedoch nicht beobachtet werden. Gleichsam mit den erhöhten Kortisolkonzentrationen fiel der Antikörpertiter ab. PICKERING und POTTINGER (1985) wiesen bei erhöhten Serum-Kortisolkonzentrationen eine erhöhte Infektanfälligkeit gegenüber Furunkulose- und *Saprolegnia*-Infektionen nach, ohne daß eine Lymphopenie festgestellt werden konnte. Umgekehrt kann eine Reduktion der Lymphozyten ohne eine Kortisolerhöhung eintreten, die wahrscheinlich auf eine erhöhte Kortisolclearance zurückzuführen ist (PICKERING und POTTINGER 1987).

CARBALLO et al. (1995) konnten für 30 g schwere Regenbogenforellen nachweisen, daß mit der Exposition gegenüber subletalen Kupfer- (0,25 mg/l), Cyanid- (0,07 mg/l), Ammoniak-N (0,25 mg/l) und Nitritkonzentrationen (0,24 mg/l) die Kortisolkonzentrationen anstiegen. Lagen die Konzentrationen > 370 ng/ml, so konnte bei gleichzeitiger experimenteller Infektion mit *Saprolegnia parasitica*-Sporen die Krankheit bei allen Tieren (Saprolegniose) ausgelöst werden. Bei Kortisolkonzentrationen < 370 ng/ml konnte eine geringere Infektionsrate (24 %) festgestellt werden. Gemessen an der Infektionsrate, nahm die Empfänglichkeit gegenüber Saprolegnien in der Reihenfolge Ammoniak - Kupfer - Nitrit - Zyanid ab. Die Autoren führten die erhöhte Empfänglichkeit bei subletal auf die Fische einwirkenden Nitrit- und Zyanidkonzentrationen auf den chemischen Stress mit Erhöhung der Kortisol-Konzentrationen zurück. MAZIK et al. (1991) konnten bei hohen Nitritkonzentrationen im Wasser eine Erhöhung der Kortisolkonzentrationen bei Barschen (*Morone saxatilis*) feststellen. Die von CARBALLO et al. (1995) festgestellten erhöhten Infektionsraten bei Ammoniak- und Kupferexposition wurden auf die additive Wirkung von Stress (Kortisolwirkung) und toxikologischer Wirkung der Chemikalien zurückgeführt. Ammoniak bewirkt eine verminderte Mukusbildung. Die Schleimschicht eliminiert ansonsten die Sporen durch erhöhte Neubildung sowie durch ihre fungistatische Wirkung (LANG et al. 1988, MÖCK und PETERS 1990). Kupfer bewirkt eine humorale und zelluläre Immunsuppression mit Verminderung der Phagozytoseaktivität und Reduktion der Blutlymphozyten (DICK und DIXON 1985, ELLSAESSER und CLEM 1986). STAVE und ROBERSON (1985) vermuten, daß eine mögliche Erhöhung der Infektanfälligkeit aufgrund der kortisolinduzierten Suppression der Phagozyten zustandekommt. Sie setzten Pronephros-Phagozyten von Barschen (*Morone saxatilis*) in vitro verschiedenen Hydrokortison-Konzentrationen aus. Hierbei stellten sie eine dosisabhängige Suppression der "respiratory burst" Aktivität sowie eine verminderte bakterizide

Wirkung gegenüber *Aeromonas hydrophila* fest. Die Vitalität der Phagozyten wurde nicht beeinflusst.

PETERS (1988) hielt Regenbogenforellen paarweise über 12 Stunden in Wasser, das unterschiedliche Konzentrationen von *Aeromonas hydrophila* enthielt. Bei den während der Rangordnungskämpfe unterlegenen Fischen konnten die Bakterien vermehrt aus den inneren Organen reisoliert werden. PETERS (1988) ist der Meinung, daß emotionaler Stress eine Immunsuppression auslöst und das bei Fischen weniger stark ausgeprägte Schmerzempfinden überlagert.

Die Erkrankung von Fischen mit Cytophagaceen wurde oftmals im Zusammenhang mit einem multifaktoriellen Geschehen diskutiert. So brach die durch *Flexibacter columnaris* ausgelöste "Columnaris"-Krankheit bei in Kultur gehaltenen Fischen besonders bei Temperaturen > 18°C, hoher Wasserhärte, alkalischem pH-Wert und starker Belastung mit organischen Substanzen auf (FIJAN 1968, ROBERTS 1989). Die Schwere der Erkrankung wurde durch den Erregerstamm und die Wassertemperatur beeinflusst (ROBERTS 1989a). Im Gegensatz dazu trat die Kaltwasserkrankheit bei Salmoniden, verursacht durch *Flexibacter psychrophila*, ausschließlich zwischen 4-12°C auf. Besondere disponierende Faktoren sind hohe Besatzdichten oder ein hoher Anteil an organischen Stoffen (ROBERTS 1989).

WALTERS und PLUMB (1980) untersuchten die Langzeitwirkung (144 Stunden) von verschiedenen Kombinationen aus niedriger Sauerstoff- (1,5 mg/l), erhöhter Ammoniak- sowie Kohlendioxidkonzentration (Gesamtammoniakgehalt 1,2 mg/l, CO<sub>2</sub>-Gehalt 6,5 mg/l) auf die Infektanfälligkeit von Welsen (*Ictalurus punctatus*) gegenüber experimentellen *Aeromonas hydrophila*-Infektionen. Steigende Ammoniak- und / oder Kohlendioxidkonzentrationen führten zu einer stark erhöhten Mortalität der Fische. NH<sub>3</sub>-N Gehalte von 1,1 mg/l sowie CO<sub>2</sub>-Konzentrationen von 6,0 mg/l hatten einen ähnlichen Effekt. Die höchsten Mortalitätsraten konnten die Autoren mit der Kombination von niedrigem Sauerstoffpartialdruck, erhöhter Ammoniak- sowie CO<sub>2</sub>-Konzentrationen erzielen. Neben *Aeromonas hydrophila* konnten 6 weitere Bakterien bzw. Bakteriengruppen aus der Niere der gestressten Welse isoliert werden, wobei in 67 % der Fälle im Vergleich zur Kontrollgruppe (9 %) Aeromonaden im Fischgewebe nachgewiesen wurden. WALTERS und PLUMB (1980) führten die erhöhte Mortalität auf die starke Giftwirkung von Ammoniak bzw. der durch CO<sub>2</sub> bedingten verminderten Bindung von Sauerstoff an das Hämoglobin zurück.

Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Krankheiten, die typischerweise mit Umweltstressoren gesehen werden (WEDEMEYER und McLEAY 1981)

**Tabelle 9:** Streßassoziierte bakterielle Fischkrankheiten

Krankheit/Erreger	Prädisposition
Furunkulose ( <i>Aeromonas salmonicida</i> )	Geringe O <sub>2</sub> -Konzentrationen (< 4 mg/l), Manipulationen am Fisch
Bakterielle Kiemenerkrankung ( <i>Myxobacteria</i> spp)	Crowding, geringe O <sub>2</sub> -Konzentrationen, erhöhte NH <sub>3</sub> -Konzentrationen (0,02 mg/l), erhöhte Wasserschwebstoff-Konzentration
Columnaris-Krankheit ( <i>Flexibacter columnaris</i> )	Crowding, erhöhte Wassertemperaturen (> 15°C)
Bakterielle Nierenerkrankung ( <i>Renibacterium salmoninarum</i> )	Wasserhärten < 100 mg CaCO <sub>3</sub> /l
Hämorrhagische Septikämien ( <i>Aeromonas</i> und <i>Pseudomonas</i> spp.)	Costia- und Trichodina-Infektionen, erhöhte Bakterien- und Schwebstoff-Konzentrationen im Wasser, Handling, Crowding, geringer O <sub>2</sub> -Gehalt des Wassers, PCB's
Vibriose ( <i>Vibrio anguillarum</i> )	O <sub>2</sub> -Konzentrationen < 6 mg/l bei Wassertemperaturen zw. 10 und 15°C. Brackwasser (10 - 15 Promill.)

### 2.3.6.2 ENDOGENE FAKTOREN, DIE STRESSÄHNLICHE BLUTBILD- VERÄNDERUNGEN HERVORRUFEN

Neben Stressoren können endogene Faktoren und circadiane Rhythmen zu Veränderungen der Blutzusammensetzung oder des Wachstums führen (HILLE 1982, PICKERING 1990). Charakteristische, das Blutbild beeinflussende Größen sind die Heranreifung der Geschlechtsprodukte sowie die Smoltifikation, d.i. der Übergang von anadromen Fischarten (Forellen, Lachse) von der Süßwasser- in die Salzwasserlebensweise (WEDEMEYER 1976, BARTON et al. 1985, MAULE et al. 1987, YOUNG et al. 1989). Umweltstressoren können darüber hinaus die Wechselwirkungen zwischen Sexualhormonen und Streßantworten beeinflussen (PICKERING 1990).

So stiegen während der Smoltifikation bei Pazifischen Lachsen (*Oncorhynchus masou*) die Kortisol- sowie Wachstumshormon-Konzentrationen im Blut kontinuierlich an (YOUNG et al. 1989, NAGAE et al. 1994) und können bei Silberlachsen um das zehnfache ansteigen (BARTON et al. 1985, YOUNG et al. 1989). Nach BARTON et al. (1985) stellt der Übergang vom Süßwasser- in das Salzwassertstadium per se einen Stressor dar; größere Fische zeigen hierbei entweder eine erhöhte Sensitivität der Kortisolausschüttung als kleinere Tiere, oder die Sensitivität gegenüber Stressoren ist gesteigert. NAGAE et al. (1994) konnten bei Pazifischen Lachsen (*Oncorhynchus masou*) während der frühen Smoltifikationsphase (Mai bis Juli) einen Anstieg des IgM-Titers und der Kortisol- sowie Thyroxinkonzentration im Blut feststellen. Sie vermuteten, daß die erhöhte IgM-Synthese infolge der steigenden Wassertemperaturen oder der erhöhten T4-Synthese zustande kam. Der beobachtete Abfall des IgM-Titers trotz hoher Wassertemperaturen in der späten Smoltifikationsphase (August) kam durch die hohe Kortisol- und niedrige T4-Synthese zustande. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß die vermehrte Thyroxinsynthese während der frühen Smoltifikation das Immunsystem stimuliert, erkennbar an einem erhöhten IgM-Blutspiegel.

MAULE et al. (1987) konnten bei Silberlachsen nachweisen, daß während der drei Monate andauernden Smoltifikationsphase die Anzahl der Blutleukozyten, die relative Anzahl der Milzlymphozyten und die antikörperproduzierenden Zellen in der Milz abnahmen. Sie führten diese Veränderungen auf die Kortisolkonzentrationen zurück, die während der Smoltifikationsphase zunahmen. Kortisolimplantate hatten ähnliche Wirkungen. Korrespondierend mit den beobachteten Veränderungen nahm die Mortalitätsrate der Lachse gegenüber experimentellen Infektionen mit *Vibrio anguillarum* zu. Die Erhöhung der Mortalitätsrate bei Abwanderung von anadromen Fischarten wird mit der Auseinandersetzung der Fische mit Räubern ("flight and fight") bzw. Gefressenwerden sowie mit den sich stark verändernden Milieubedingungen zwischen Fluß- und Meerwasser gesehen (LARSSON 1985, JÄRVI 1990). JÄRVI (1990) stellte bei Atlantischen Lachsen fest, daß ein zum Fischblut hyper- oder hypoosmotisches Milieu und die Anwesenheit von Räubern in höheren Mortalitätsraten resultierte als die Faktoren alleine. Die stressassoziierten Erhöhungen der Chlorid-, Glukose- und

Laktatkonzentrationen als Zeichen von Stress konnte durch die visuelle Gewöhnung der Tiere vermindert werden.

Die Heranbildung der Sexualprodukte oder das Geschlecht beeinflusste bei Fischen das Blutbild bzw. Immunsystem (BARNHARDT 1969, PICKERING 1984, ROBERTS 1989, ZAPATA et al. 1992). Demgegenüber fand BARNHARDT (1969) bei juvenilen Regenbogenforellen, daß das Geschlecht das Blutbild nicht beeinflusste. Verglichen mit unreifen Tieren stellte PICKERING (1984) bei sexualreifen männlichen Bachforellen eine mit chronisch erhöhter Kortisolkonzentration assoziierte Reduktion der Blutlymphozytenanzahl von 3.36 auf  $1.98 \times 10^4/\mu\text{l}$  fest. Die Erythrozytenzahlen nahmen demgegenüber zu. Die erhöhte Empfänglichkeit von heranreifenden Salmoniden gegenüber Infektionserregern läßt sich z.T. mit der festgestellten Lymphopenie erklären (PICKERING 1984). Erhöhte Androgenkonzentrationen, wie sie bei der Heranreifung der männlichen Geschlechtsprodukte bei Bachforellen festgestellt werden, verursachte den beobachteten Anstieg der Erythrozytenzahlen, die biologische Wertigkeit ist unklar.

Eine Beteiligung der bei der Heranreifung der Geschlechtsprodukte erhöhten Testosteronkonzentrationen an der gesteigerten Infektanfälligkeit wird vermutet (KIME und MANNING 1982, PICKERING 1984): die höchsten Todesraten wurden bei Salmoniden während der Laichzeit gesehen (ROBERTS 1989). KIME und MANNING (1982) konnten für Bachforellen die höchsten Androgenhormon-Konzentrationen im Zeitraum von September bis November ermitteln, die mit der Spermiogenese sowie mit dem Ablaihvorgang einhergingen. Ursachen für die erhöhte Todesrate waren zum einen die gravierenden hormonellen Umstellungen, zum anderen werden Erschöpfungszustände und Gewebsalterationen während der Laichzeit als Erklärungsmöglichkeit angegeben (ROBERTS 1989). Untersuchungen ergaben, daß zusammen mit einer erhöhten Aktivität des Hypophysenvorderlappens und des renalen adrenergen Systems initial die 17-Hydrokorticosteroide im Blut anstiegen. Wird die Sexualreife erreicht, degeneriert die Hypophyse, und das Interrenalgewebe wird hyperplastisch. Die während der Sexualreife beobachteten erhöhten Konzentrationen bestimmter Androgenmetabolite (5-Dihydro-Testosteron) in der Epidermis erklärten die erhöhte Infektionsrate dieses Organs. Andere Veränderungen, die während der Sexualreife auftraten, z.B. degenerative Veränderungen an der Intima der Arterien oder Glomeruli trugen zu einer erhöhten Empfänglichkeit der Fische gegenüber Infektionserregern bei (ROBERTS 1989). ZAPATA et al. (1992) gaben an, daß die von Kortisol verursachten hämatologischen Veränderungen vom Stadium der Sexualreife abhängen.

PICKERING und POTTINGER (1987, 1987a) fanden bei Bachforellen, daß das Reifestadium oder das Geschlecht die Kortisolkonzentration nicht beeinflusste, daß jedoch im Vergleich zu juvenilen Tieren die Konzentrationen für männliche adulte Fische höher lagen (PICKERING und POTTINGER 1987). Stress führte zu einer über Kortisol vermittelten Suppression der Wachstumshormon-, Testosteron- und Östradiol-Ausschüttung bei männlichen bzw. weiblichen heranreifenden Bach- und Regenbogenforellen, was zu einer verminderten Wachstumsrate führte (CARRAGHER et al. 1989, PICKERING 1990).



### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 ALLGEMEINE HALTUNGSBEDINGUNGEN DER VERSUCHSFISCHE

Als Versuchsfische dienten Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) mit einem Körpergewicht zwischen 100 und 700 g. Die Tiere wurden als juvenile Tiere (6 - 8 cm, ca. 10 g) von einem als seuchenfrei anerkannten Betrieb im Solling (Forellenhof Fredelsloh, Niedersachsen) bezogen.

Die Haltung der Tiere erfolgte sowohl in Wasserdurchlaufsystemen als auch in einer Wasserkreislaufanlage in ungechlortem Berliner Leitungswasser. In Tabelle 10 ist die physikalische und chemische Qualität des Berliner Trinkwassers nach eigenen Messungen aufgelistet. Die Methoden der Wassermessungen sind in Kapitel 3.4 (S. 108) beschrieben.

**Tabelle 10:** Chemische und physikalische Qualität des Berliner Leitungswassers.

Wasserparameter	Berliner Leitungswasser
Temperatur [°C]	10 - 13
pH-Wert	7,50 - 7,63
Sauerstoff [% Sättigung]	45 - 50
NH <sub>3</sub> [mg/l]	< 0,0001
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	< 0,005
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	2,50 - 5,00
Karbonathärte [°dH]	10,2 - 13,2
SBV [mmol/l]	4,40
Gesamthärte [°dH]	15,3 - 18,4
Fe <sup>++</sup> [mg/l]	< 05
Ca <sup>++</sup> [mg/l]	100 - 116
Cl <sup>-</sup> [mg/l]	65 - 70
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mg/l]	80 - 95
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg/l]	1,5 - 2,0
Leitfähigkeit [µS/cm]	563 - 694
Osmolalität [mosm/kg]	8 - 11

SBV = Säurebindungsvermögen

### 3.1.1 HALTUNG IM WASSERDURCHLAUFSYSTEM

Die Fische wurden bei 12-15°C Wassertemperatur in etwa 600 Liter fassenden epoxydharzbeschichteten Kunststoff-Rundstrombecken gehalten, die mit einer Plexiglasplatte abgedeckt waren. Die Becken standen in einem mit 3 Fenstern und mit einer Zwangslüftung ausgestattetem kühlbaren Raum des Institutes, in dem auch die Becken für die Haltung der Fische im Durchlaufsystem untergebracht waren (s.u., Punkt 3.1.2). Die Raumbelichtung erfolgte über an der Decke angebrachte 10 Leuchtstoffröhren (40 Watt Lampen). Etwa 30 cm über den Abdeckplatten und 60 cm über der Wasseroberfläche der Fischbecken waren je eine 60 Watt Lampe (7000 Lumen/m<sup>2</sup>; Lux) angebracht. Die Beleuchtungsstärke betrug direkt über der Wasseroberfläche 290 Lumen/m<sup>2</sup>, direkt über der Plexiglasabdeckung 700 Lumen/m<sup>2</sup>. Die Raumbelichtungsstärke, gemessen in der Mitte des Raumes, betrug 490 Lumen/m<sup>2</sup> (Messung 1,50 m über dem Boden in Beckenhöhe). Die Beleuchtungsdauer betrug 9 Stunden von 7:30 bis 16:30 Uhr. Die Wasserdurchsatzrate wurde so eingestellt, daß am Wasserauslauf eine Sauerstoffkonzentration von 5 mg/l erreicht wurde. Die Belüftung erfolgte über drei 50 cm lange, walzenförmige Kermikbelüfter mittels komprimierter Luft direkt in den Fischhaltungseinheiten. Die Fische wurden mit 1.5 - 2 % des Körpergewichtes mit Trockenfutterpellets (Kronenfisch Fertigfutterpellets) je nach Körperlänge mit der Größe 2, 3 und 4 ein bis zweimal pro Tag gefüttert. Das Trockenfutter enthielt 45 % Rohprotein, 3 % Rohfaser, 11 % Rohfett und 10 % Rohasche.

### 3.1.2 HALTUNG IM WASSERKREISLAUFSYSTEM

Die Kreislaufanlage besaß eine Gesamtwassermenge von etwa 25 m<sup>3</sup>, 1/3 des Volumens nahmen die Fischhaltungseinheiten ein. Die restliche Wassermenge verteilte sich auf Absetzbecken, Biofilter, Pumpensumpf und Hochtank. Die Anlage war in einem kühlbaren Raum des Institutes integriert, so daß die Wassertemperatur im Mittel 15°C betrug. Die Fische wurden in etwa 600 Liter fassenden epoxydharzbeschichteten Kunststoff-Rundstrombecken gehalten, die mit einer Plexiglasplatte abgedeckt waren. Die Becken standen in einem mit 3 Fenstern und mit einer Zwangslüftung ausgestattetem Raum des Institutes. Die Raumbelichtung erfolgte über an der Decke angebrachte 10 Leuchtstoffröhren (40 Watt Lampen). Etwa 30 cm über den Abdeckplatten und 60 cm über der Wasseroberfläche der Fischbecken waren je eine 60 Watt Lampe (7000 Lumen/m<sup>2</sup>; Lux) angebracht. Die Beleuchtungsstärke betrug direkt über der Wasseroberfläche 290 Lumen/m<sup>2</sup>, direkt über der Plexiglasabdeckung 700 Lumen/m<sup>2</sup>. Die Raumbelichtungsstärke, gemessen in der Mitte des Raumes, betrug 490 Lumen/m<sup>2</sup> (Messung 1,50 m über dem Boden in Beckenhöhe). Die Beleuchtungsdauer betrug 9 Stunden von 7:30 bis 16:30 Uhr. Die Wasserdurchsatzrate wurde so eingestellt, daß am Wasserauslauf eine Sauerstoffkonzentration von 5 mg/l erreicht wurde. Die Belüftung erfolgte über drei 50 cm lange, walzenförmige Kermikbelüfter mittels komprimierter Luft direkt in den Fischhaltungseinheiten.

Die Fische wurden mit 1.5 - 2 % des Körpergewichtes mit Trockenfutterpellets (Kronenfisch Fertigfutterpellets) je nach Körperlänge mit der Größe 2, 3 und 4 ein bis zweimal pro Tag gefüttert. Das Trockenfutter enthielt 45 % Rohprotein, 3 % Rohfaser, 11 % Rohfett und 10 % Rohasche.

Das Wasser gelangte von den belüfteten Fischhaltungseinheiten mit einem Volumen von etwa 600 Liter in ein Absetzbecken. In dem den Fischbecken nachgeschalteten Absetzbecken wurden die im Wasser ungelösten organischen Partikel abgetrennt und von dort zu zwei Rieselfiltern (Biofilter) gepumpt, in denen die biologische Reinigung des Wassers stattfand. Dem biologischen Filter war ein weiteres Absetzbecken nachgeschaltet. Von hier aus wurde das Wasser wieder den Haltungseinheiten zugeleitet. Vor der Einleitung in die Aufzuchtbecken wurde das Wasser einmal im Monat 12 Stunden lang mit Ozon behandelt. Das Redoxpotential betrug 200 bis 300 mV, entsprechend einer Ozonkonzentration von etwa 5 bis 10 mg/100 l Wasser. Die Frischwasserzugabe betrug infolge Verdunstung und Spritzwasserverluste etwa 5 % pro Woche, bezogen auf das gesamte Anlagenvolumen.

## 3.2 HÄMATOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSVERFAHREN

Alle für die Blutuntersuchungen verwendeten Fische entstammten dem Wasserdurchlaufsystem (Haltungsbedingungen siehe Punkt 3.1.1; S. 81).

### 3.2.1 BETÄUBUNG UND BLUTENTNAHME

#### 3.2.1.1 BETÄUBUNG DER VERSUCHSFISCHE

Um die Zeitdauer zu ermitteln, bis eine Blutentnahme (BE) ohne Abwehrbewegung der Tiere durchgeführt werden konnte, wurde je eine Gruppe von 5 Tieren mit einem Körpergewicht (KGW) zwischen 400 und 500 g in 25 oder 50 mg Benzocain/l Wasser bzw. je 5 Tiere mit einem KGW zwischen 1000 und 1300 g in 50 mg Benzocain/l Wasser betäubt (Ethyl-p-Aminobenzoat = Benzocain, Fa. Sigma, # E-1501). Die Tiere wurden 24 Stunden vorher nicht mehr gefüttert. Für das Betäubungsbad wurden 250 bzw. 500 mg Benzocain nach ROBERTS und SCHLOTFELDT (1985) in 5 ml Azeton vorgelöst und zu 10 Liter Wasser gegeben. Nachfolgend wurden die Fische aus den Haltungsbecken in das Betäubungsbad gekeschert, es wurde ein Fisch pro 10 Liter Wasser verwendet. Als Beurteilungskriterien für die Betäubung wurden folgende Zeiten ermittelt:

1. Zeit, bis die Bachforellen eine Störung der Gleichgewichtslage zeigten (Seitenlage, Rückenlage).
2. Zeit, bis eine merkliche Ventilationsfrequenz-Abnahme sichtbar wurde (Verringerung der Opercularbewegung).
3. Zeit, bis eine merkliche Reduktion des Tieres auf externe Stimuli erreicht wurde. Hierzu wurden die Fische aus dem Bad entnommen und auf ein mit Jodophore getränktes Baumwolltuch gelegt. Zeigten die Tiere mittel- bis hochgradige Abwehrbewegungen, so wurden sie in das Betäubungsbad zurückgesetzt.
4. Zeit, bis die Tiere nach Herausnehmen aus dem Betäubungsbad außer geringgradigen Spontanbewegungen keine Abwehrbewegung zeigten.

Für die höchste Benzocainkonzentration (50 mg/l) wurde nach der Betäubung des ersten Fisches noch ein weiteres Tier im selben Bad betäubt und die o.g. Zeiten ermittelt. Die verschiedenen Zeiten wurden den von STOSKOPF (1993) angegebenen Betäubungsstadien bei Fischen zugeordnet.

Aufgrund der Ergebnisse wurden die Tiere für alle weiteren Versuche mit 50 mg Benzocain, vorgelöst in Azeton, betäubt, die wiederholte Betäubung im gleichen Narkosebad oder die Betäubung von zwei oder mehr Fische pro Betäubungsbad wurde vermieden.

#### 3.2.1.2 DIE BLUTENTNAHME

Für die Blutuntersuchung wurden die Versuchstiere 24 Stunden vor der Betäubung bzw. Blutentnahme nicht gefüttert. Nach Herauskeschern aus den Haltungsbecken wurden die Tiere in einem Benzocainbad betäubt (50 mg/l Wasser). Nach etwa 5 bis 10 Minuten erreichten die Tiere das III/1 bzw. III/2-Stadium. Anschließend wurden die Bachforellen dem Betäubungsbad entnommen und mit der linken Seite auf ein mit Jodophore (Lorasol L, Fa. TAD, Cuxhaven) getränktes Baumwolltuch gelegt. Eine Lage aus mit Wasser angefeuchtetem Fließpapier wurde zum Schutz vor Austrocknung über den Kopf und Kiemendeckel gelegt. Die Entnahmestellen wurden mit Jodophore desinfiziert.

Um eine Veränderung der Wasserqualität durch das Benzocain festzustellen, wurden von 5 Wasserproben (Doppelmessung) der pH-Wert, die Gesamt- sowie Karbonathärte und die Alkalität nach Zugabe von 0 (Kontrolle), 25 und 50 mg Benzocain/l Wasser gemessen (Messung der Wasserqualität siehe Kapitel 3.4; S. 108).

Abbildung 2 (S. 82) stellt schematisch das venöse Blutkreislaufsystem eines Knochenfisches dar; hierbei sind nur die für die Blutentnahme relevanten Gefäße dargestellt.

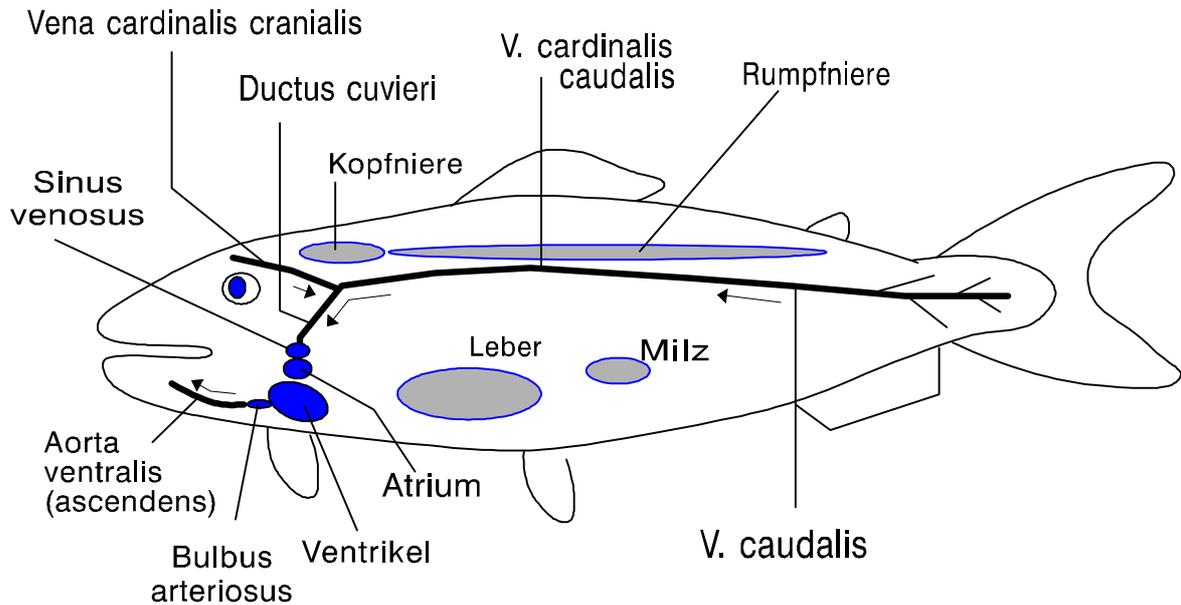


Abb.2: Schematische Darstellung des venösen Blutkreislaufsystems eines Knochenfisches. Es sind nur die für die Blutentnahme wichtigsten Gefäße eingezeichnet.

### 3.2.1.2.1 HERZPUNKTION (Abb. 3; S. 84)

Nach vorheriger Desinfektion der Punktionsstelle mit Jodophore (Lorasol L, Fa. TAD, Cuxhaven) wurde die Kanüle in die Mediane zwischen den Brustflossen eingestochen und langsam in craniodorsaler Richtung eingeführt. Nach Durchdringen der Haut wurde ein leichter Unterdruck ausgeübt, bis das Blut sichtbar in die sterile Plastik-Einmalspritzen eintrat. Für die Blutentnahme wurden sterile Einmalkanülen der Größe 0.45, 0.55, 0.6, 0.7 und 0.9 mm verwendet.

### 3.2.1.2.2 BLUTENTNAHME AUS DEM DUCTUS CUVIERI (Abb. 4; S. 85)

Die Ductorum Cuvieri (D.c.) dextri et sinistri sind der Zusammenfluß der rechten bzw. linken V. cardinalis anterior und V. cardinalis posterior, er mündet im Sinus venosus des Herzens. Er verläuft links und rechts von dorsal nach caudoventral neben dem 5. Kiemenbogen. Für die Blutentnahme wurde der Fisch auf die rechte Seite gelegt. Mit einem sterilen, abge-

flamnten Spatel wurde das Operculum vorsichtig nach oben gedrückt. Mit einer geraden anatomischen Pinzette wurde unter die vier Kiemenbögen gefaßt und diese in toto nach oben verlagert, so daß der 5. Kiemenbogen frei sichtbar ist. Das Gefäß (D.c. sinister) schimmert dunkelbläulich dorsocaudal des 5. Kiemenbogens durch das Kiemenseptum (Branchialmembran) hindurch. Die Kanüle wurde an dieser Stelle im spitzen Winkel von etwa 20° durch das Septum eingestochen (je nach Fischgröße 0,3 - maximal 1 cm) und langsam in craniodorsaler Richtung vorgeschoben. Vorher wurde die Einstichstelle mit einem in Jodophore (Lorasol L, Fa. TAD, Cuxhaven) getränkten Wattestäbchen desinfiziert. Beim Vorschieben der Kanüle wurde wieder ein leichter Unterdruck in der Spritze aufgebaut, bis das Blut deutlich sichtbar in die Spritze eintrat. Während der Blutentnahme wurde die Kanüle mit der Pinzette fixiert. Für die Punktion wurden sterile Einmalkanülen der Größe 0.45, 0.55, 0.6, 0.7 und 0.9 mm verwendet, das Blut wurde in sterilen Plastik-Einmalspritzen aufgefangen.

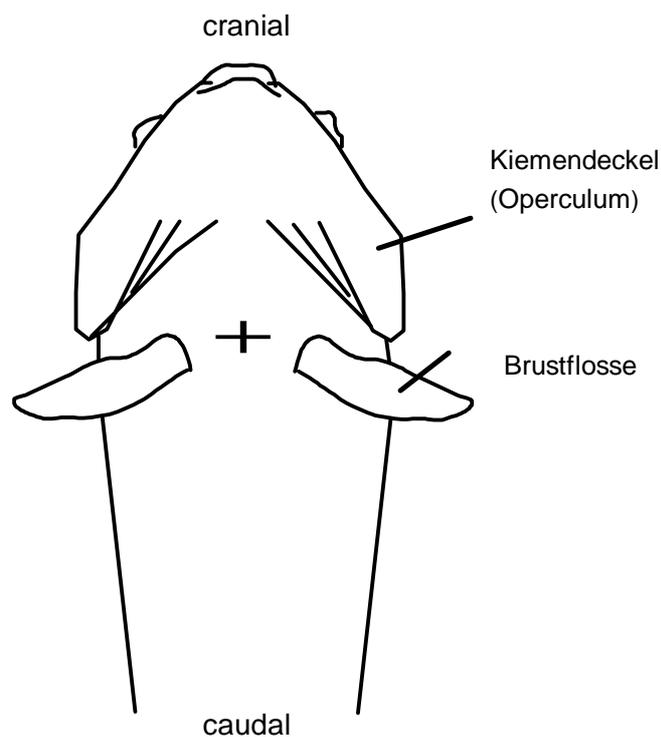


Abb.3: Darstellung des ventralen Bereiches für die Blutentnahme aus dem Herzen. Die Einstichstelle ist mit einem Kreuz gekennzeichnet.

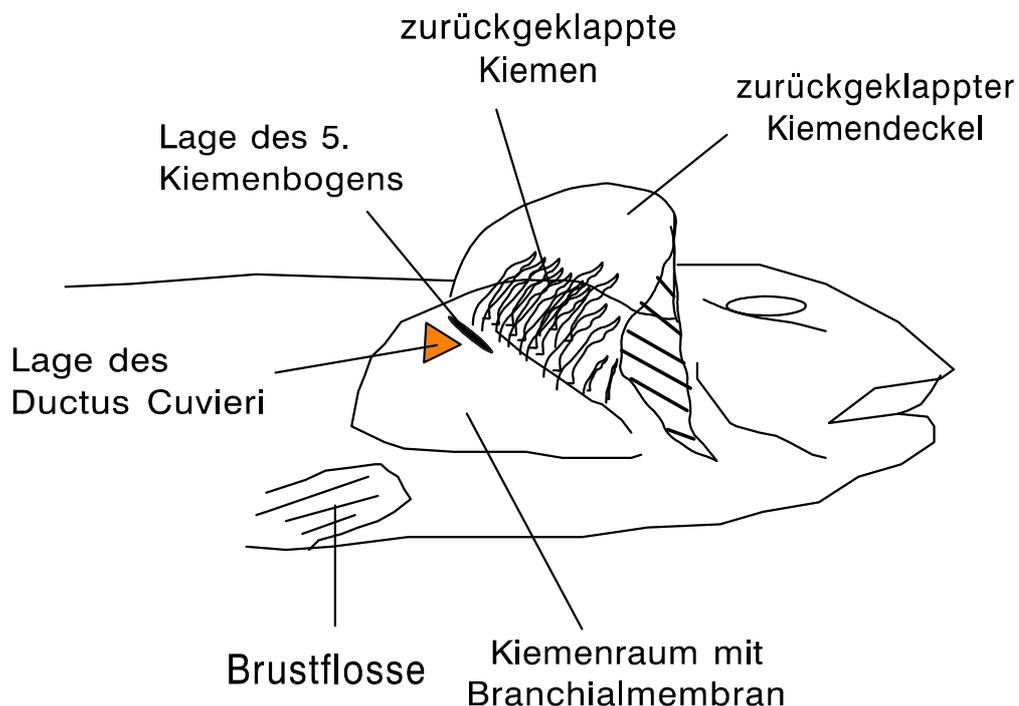


Abb.4: Blutentnahme aus dem Ductus Cuvieri im dorso-caudalen Bereich des fünften Kiemenbogens.

### 3.2.1.2.3 BLUTENTNAHME AUS DER A. ET V. CAUDALIS (Abb. 5; S. 86)

a.) Blutentnahme von Lateral: die Kanüle wurde von lateral etwa 0.3 mm ventral der Seitenlinie auf Höhe des caudalen Ansatzes der Analflosse in die Muskulatur des Schwanzstieles eingestochen und langsam kraniodorsal in Richtung der Wirbelsäule geführt.

b.) Blutentnahme von ventromedian: die Kanüle wurde ventromedian, etwa kleinfingerbreit caudal des Analflossenansatzes in die Muskulatur eingestochen und langsam kraniodorsal in Richtung der Wirbelsäule geführt.

Für die Punktion wurden je nach Körpergewicht der Fische sterile Einmalkanülen der Größe 0.45, 0.55, 0.6, 0.7 und 0.9 mm verwendet, das Blut wurde in sterilen Plastik-Einmalspritzen aufgefangen.

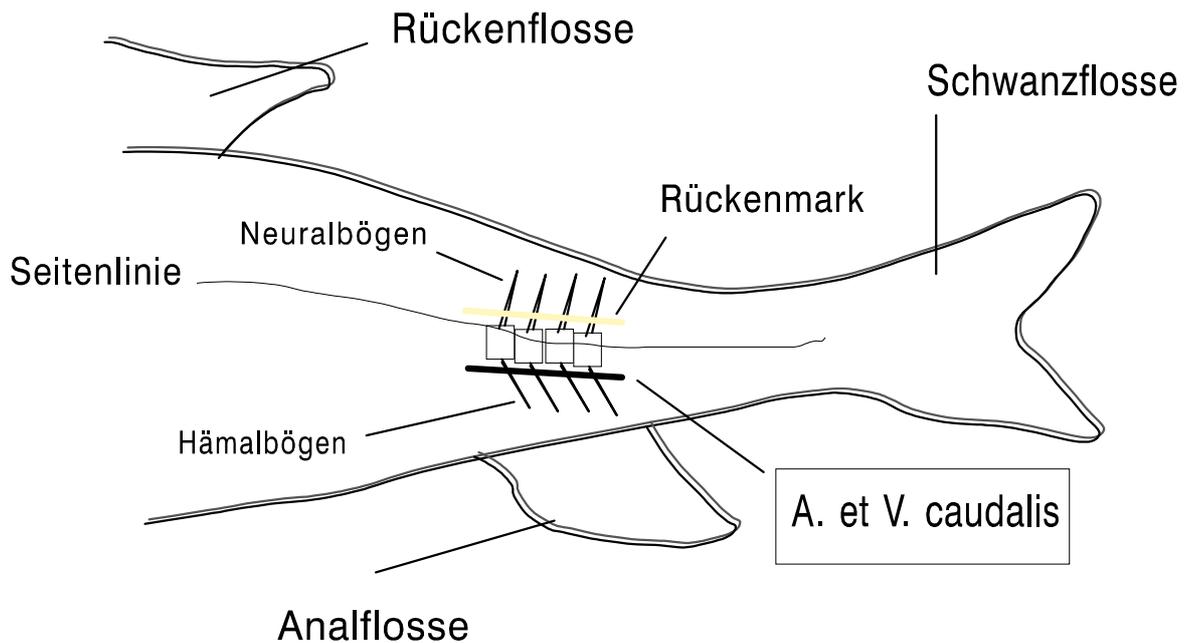


Abb.5: Darstellung der Schwanzregion für die Blutentnahme aus der A. et V. caudalis

### 3.2.2 HEMMUNG DER BLUTGERINNUNG DURCH HEPARIN

Als Antikoagulans wurde Lithium-Heparin (Fa. Sigma, # H-0878) mit einer Aktivität von 169.9 USP-units/mg verwendet (USP = U.S. Pharmacopeia, FORTH et al. 1992). Um die für die Hemmung der Blutgerinnung notwendige Heparinkonzentration zu ermitteln, wurde eine Heparin-Stammlösung mit 8 mg/ml PBS angesetzt (PBS = Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung, 0.15 M, pH 7.05, 290 mosm/kg; Gibco Life Technologies, # 14190-094). Die Stammlösung wurde durch Nalgene-Celluloseazetat-Einmalfiltereinheiten (0,20 µm Porenweite) sterilfiltriert. Hiervon wurden 0 (Kontrolle) bis 100 µl in 10 µl-Schritten in 1,5 ml fassende Eppendorfgefäße pipettiert. Anschließend wurden von sechs 400 bis 500 g schweren Bachforellen Blut entnommen und hiervon pro Fisch genau 1 ml zu den Gefäßen gegeben. Nach vorsichtiger Durchmischung wurde sofort im Anschluß daran je zwei mit Antikoagulans unbeschichtete 75 mm lange Mikrohämatokritkapillaren (Fa. Assistent, 75 mm, # 564) mit dem Blut befüllt und nach 30, 60, 120, 180, 240-minütiger sowie 6-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur vorsichtig in der Mitte durchgebrochen und langsam auseinandergezogen. Dabei wurde darauf geachtet, ob sich zwischen den Kapillarenden ein Strang bildete und inwieweit nach Kippen der Kapillaren das Blut aus der Kapillaren heraustropfte.

Folgendes Bewertungsschema wurde für die Verhinderung der Blutgerinnung gewählt:

- + Strangbildung zwischen den Kapillarenden, kein Herausfließen des Blutes aus der Kapillare: vollständige Blutgerinnung.
- (+) Keine Strangbildung, langsam-zähflüssiges Fließen des Blutes in der Kapillare.
- Keine Strangbildung, Heraustropfen des Blutes aus der Kapillare: vollständige Hemmung der Blutgerinnung.

Die entsprechenden Heparinkonzentrationen und -aktivitäten sind in Tabelle 11 angegeben.

**Tabelle 11:** Heparinkonzentrationen und -aktivitäten pro ml Blut (Endkonzentrationen) nach Zugabe verschiedener Volumina der Heparinstammlösung (8 mg / ml PBS). Zu den entsprechenden Volumina wurde 1 ml Blut gegeben.

Heparinmenge [µl]	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Heparin- Endkonzentration [mg/ml Blut]	0,04	0,08	0,16	0,24	0,32	0,40	0,48	0,56	0,64	0,72	0,80
Heparin-Aktivität [USP-u/ml Blut]	6,8	13,6	27,2	40,8	54,4	68,0	81,6	95,2	108,8	122,4	149,6

USP-u = U.S. Pharmacopeia-units

### 3.2.3 ZÄHLUNG DER BLUTZELLEN

Das aus dem D.c. gewonnene Blut wurde mit verschiedenen, in der Literatur angegebenen Differenzierungslösungen verdünnt, eine Neubauerkammer beschickt und die Anfärbung sowie Morphologie beurteilt und die Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenanzahl bestimmt. Es wurden Verdünnungslösungen nach SHAW, HUNN, HENDRICK, NATT-HERRICK und DACIE'S verwendet (SHAW 1930, HESSER 1960, BLAXHALL und DAISLEA 1973, ROBERTS 1989, SCHÄPERCLAUS et al. 1990, HOUSTON 1990, HUNN et al. 1992, OIDTMANN 1994). Weiterhin wurden einige der Lösungen in ihrer Zusammensetzung modifiziert (s.u.). Von jeder Färbelösung wurde der pH-Wert und die Osmolalität kontrolliert.

## Zusammensetzungen der Färbelösungen

a.) HENDRICK's Verdünnungslösung (HESSER 1960, HOUSTON 1990).

Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10.0 g	
NaCl	2.5 g	
Tri-Natrium-Citrat x 2H <sub>2</sub> O	1.5 g	
Eisessig	50 ml	
		ad 500 ml A. dest.

b.) Verdünnungs-Färbelösung nach SHAW (1930)

### Lösung A:

Neutralrot	0,025 g	
NaCl	0,9 g	
		ad 100 ml A. dest.

### Lösung B:

Kristallviolett	0,012 g	
Tri-Natrium-Citrat x 2H <sub>2</sub> O	3,8 g	
Neutrales Formalin (37 %)	0,4 ml	
		ad 100 ml A. dest.

Nach SHAW (1930) und SCHÄPERCLAUS et al. (1990) muß Lösung A immer frisch angesetzt werden, Lösung B einmal wöchentlich.

c.) Verdünnungs-Färbelösung nach DACIE's (BLAXHALL und DAISLEA 1973).

Formalin	1 ml	
Tri-Natrium-Citrat x 2H <sub>2</sub> O	3,13 g	
Brillant-Kresylblau	0,1 g	
		ad 100 ml Phosphatpuffer (pH 7.2, 0.01 M)

Um die Wirkung des Formalins und der Osmolalität der Dacie'schen Differenzierungslösung auf die Morphologie der Blutzellen zu untersuchen, wurde in einem Versuchsansatz das Formalin nicht zugemischt und die Osmolalität der Lösung ermittelt. Anschließend erfolgte mit einer 1.5 M NaCl-Lösung (2880 mosm/kg) die Einstellung der

Osmolalität auf 490 mosm/kg (Dacies ohne Formalin). In einem zweiten Versuchsansatz wurde eine Dacie'sche Lösung ohne Brillantkresylblau angesetzt, die Osmolalität gemessen und mit Formalin (37 %-ig) auf 490 mosm/kg korrigiert (Dacies ohne Brillantkresylblau). Das Blut wurde mit diesen Lösungen 1:100 verdünnt (Endvolumen 1 ml) und die Morphologie sowie die Zellanfärbung in der Neubauerkammer beurteilt. Als Vergleich diente die auf serumisotonische Verhältnisse korrigierte bzw. modifizierte Dacie'sche Lösung (Zusammensetzung siehe unten). Nach Zusatz des Blutes zu der Lösung ohne Farbstoff wurden 10 µl einer 100-fach konzentrierten Brillantkresylblaulösung (10 mg ad 10 ml isotonische NaCl-Lösung) zugesetzt und nach 2-minütiger Inkubation die Anfärbung der Zellen beurteilt.

d.) Modifizierte DACIE'sche Lösung

NaCl	3,34 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,50 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,91 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
Brillantkresylblau.	1 g
Formaldehyd (37 %)	10,80 ml

in 1000 ml A.dest. lösen, etwa 1 h mischen und filtrieren. Von der Lösung wurde die Osmolalität bestimmt und mit A. bidest. auf 325 mosm/kg eingestellt.

e.) Verdünnungs-Färbelösung nach HUNN (HUNN et al. 1992).

Essigsäure (100 %)	2 ml
Methylgrün	0.2 g

ad 100 ml Phosphatpuffer (pH 7.2, 0.01 M)

f.) Modifizierte HUNN'sche Verdünnungsfärbelösung:

Essigsäure (100 %)	2 ml
Methylgrün	0.2 g
Tri-Natrium-Citrat x 2H <sub>2</sub> O	3.13 g
Formalin, 37 %-ig	1 ml

ad 100 ml A.dest

g.) Verdünnungs-Färbelösung nach NATT-HERRICK (in OIDTMANN 1994)

NaCl	3,88 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,50 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,91 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,25 g
Formalin (37 %)	7,50 ml
Methylviolett	0,10 g

in 1000 ml A. dest. lösen, 12 - 24 h stehenlassen, danach filtrieren.

**Verwendete Chemikalien:**

Brillant-Kresylblau	Fa. Aldrich, # 86.086-7, C.I.-Nr. 51010
Essigsäure 100 %	Fa. Merck, # 63
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fa. Merck, # 1.04873
Kristallviolett	Fa. Serva, # 27335; C.I.-Nr. 42555
Methylgrün	Fa. Sigma, # M-6776
Methylviolett	Fa. Merck, # 1.15945; C.I.-Nr. 42535
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, # 6579
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fa. Merck, # 66649
NaCl	Fa. Merck, # 6404
Neutrales Formalin, 37 %	Fa. Merck, # 1.04003
Neutralrot	Fa. Merck, # 1369; C.I.-Nr. 50040
Tri-Natrium-Citrat x 2H <sub>2</sub> O	Fa. Merck, # 6448

Das Vollblut wurde nach Zugabe von 30 µl Lithium-Heparin 1:100 mit den jeweiligen Färbelösungen verdünnt (ELLIS 1977, LOWE-JINDE und NIIMI 1983, HOUSTON 1990). Nach zwei- bis dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine Neubauer - Zählkammer beschickt. Im Falle der Färbelösung nach SHAW (1930) wurde das Blut zur Hälfte mit Lösung A und zur Hälfte mit Lösung B verdünnt. Nach einminütiger Sedimentation wurden die Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl bei 400-facher Vergrößerung ermittelt (Laborlux 12, Leitz, Wetzlar). Für die Erythrozyten wurden 5 x 16 kleine Quadrate, für die Leukozyten und Thrombozyten 4 x 16 große Quadrate ausgezählt. Von jeder Blutprobe wurde eine Doppelprobe bestimmt und hiervon der Mittelwert gebildet.

Aus dem Verdünnungsfaktor (VF), der Anzahl ausgezählter Quadrate und den Zählkammerdimensionen wurde die mittlere Zellzahl pro µl Blut berechnet. Es wurden 200 - 300 Erythrozyten und 150 - 200 Leukozyten und Thrombozyten bestimmt.

Die Auswertung erfolgte in der Weise, daß die Färbung der Zellen zunächst nach definierten Kriterien (s.u.) beurteilt wurden. Konnten die einzelnen Zellsorten (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) nicht eindeutig nach ihren Farbeigenschaften differenziert werden oder war aufgrund einer veränderten Zellmorphologie eine sichere Unterscheidung nicht möglich, so wurde die entsprechende Verdünnungs-Lösung für eine weitere Untersuchung nicht mehr verwendet. Jene Differenzierungslösungen, die eindeutige Ergebnisse zuließen, wurden für weitere vergleichende Untersuchungen verwendet.

Die einzelnen Verdünnungslösungen wurden nach folgenden Kriterien beurteilt:

- a.) Abgesetztheit der Zellen vom Hintergrund der Zählkammer.
- b.) Intensität der Zellfärbung.
- c.) Differenzierung in Erythro-, Leuko- und Thrombozyten aufgrund der Morphologie und unterschiedlicher Anfärbbarkeit.
- d.) Übergang Zellkern-Zytoplasma (klar abgesetzt, verwaschen, nicht vorhanden).
- e.) Zellanzahl (s.u.)

Für die Differenzierungslösungen nach Natt-Herrick und Dacies (modifizierte und Original-Lösung) wurden vergleichend die Erythro-, Leuko- sowie Thrombozyten gezählt. Hierbei wurde das heparinisierte Vollblut von 15 Bachforellen 1:100 verdünnt und in einer Neubauerkammer insgesamt 400 Zellen pro Blutprobe ausgezählt.

### 3.2.4 DIFFERENTIALBLUTBILD

Die Blutausstriche wurden nach GIEMSA, ROMANOWSKY (kombinierte Leishman/Giemsa-Färbung) und PAPPENHEIM (kombinierte panoptische Giemsa/May-Grünwald-Färbung) gefärbt (BLÜM et al. 1988, HOUSTON 1990, BRUNO und POPPE 1996). Für die Pappenheimfärbung werden in der Literatur verschiedene Verdünnungen der Farb- bzw. Spüllösungen, vor allem bei der Giemsafärbung, angegeben, zudem erfolgte die Verdünnung der Giemsa-Stammlösung mit A. dest., dessen pH-Werte mit Phosphatsalzen ("gepuffertes A. dest.") unterschiedlich eingestellt wurde (CATTON 1951, HOUSTON 1990, SCHÄPERCLAUS et al. 1990, AMLACHER 1992, BRUNO und POPPE 1996). Aus diesem Grunde wurde die Auswirkung unterschiedlicher Färbezeiten, Farbstoffkonzentrationen (Verdünnungen) und pH-Werte auf die Anfärbbarkeit der Blutzellen ausgetestet. Das Ergebniss der Anfärbung wurde bei 1000-facher Vergrößerung im Ölimmersionsobjektiv beurteilt (Laborlux 12, Leitz, Wetzlar). Für die Versuche wurde heparinisiertes Blut (30 µl, entsprechend einer Konzentration von 41 USP-units/ml Blut) verwendet.

#### **Technik des Blutausstrichs:**

1. Etwa 2-4 µl Blut auf Objektträger geben.
2. Deckgläschen dem Tropfen nähern und warten, bis sich der Bluttröpfchen an der Kante ausgebreitet hat.
3. Dann ohne viel Druck und nicht zu langsam das Deckgläschen in einem Winkel von etwa 45° auf dem Objektträger entlangziehen.

#### **I. PAPPENHEIMFÄRBUNG (BLÜM et al. 1988):**

Für die Färbung mit der May-Grünwaldlösung (Schritt 1) wurden verschieden lange Färbezeiten getestet, für die Färbung mit der verdünnten Giemsa-Lösung (Schritt 4) verschiedene pH-Werte der Verdünnungslösung ("phosphatgepufferte A.dest.-Lösung", "gepuffertes A. dest."), Färbezeiten und Konzentrationen verwendet.

## **Prinzipielle Vorgehensweise:**

1. May-Grünwald Färbelösung (Fa. Merck-Diagnostica, # 1424) auf den Objektträger schichten.  
Die Einwirkzeiten betragen 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten.
2. Die gleiche Menge Phosphatpuffer auf den Objektträger träufeln (1 - 5 Minuten Einwirkzeit, pH 6.0 bis 8.0 in 0.4-Schritten).
3. Färbelösung abkippen.
4. Färbung mit verdünnter Giemsa-Lösung (Fa. Merck-Diagnostica, # 9204). Die Verdünnungsstufen betragen 1:10 bis 1:100 in 10-er Schritten. Die Giemsa-Tammlösung wurde mit Phosphatpuffer (0.01 M) verdünnt, dessen pH-Werte zwischen 6.0 und 8.0 eingestellt wurden. Die Färbezeiten betragen 10 bis 60 Minuten in 10-Minuten Schritten.
5. Kurz spülen mit entsprechend gepuffertem A. dest. (siehe Punkt 2).
6. Lufttrocknen.

## **II. GIEMSAFÄRBUNG (nach BRUNO und POPPE 1996)**

1. Blutprobe dünn ausstreichen und trocknen lassen. 1 - 2 Minuten in 95 % Methanol fixieren.  
Überschüssiges Methanol abgießen.
2. Ausstrichpräparat 20 - 35 Minuten mit verdünnter Giemsa-Lösung (1:10 mit gepuffertem A. dest. verdünnt, pH 6.8 0.01 M PBS).
3. Mit gepufferter A. dest. ( pH 6.8) abspülen und Präparate trocknen lassen.

## **III. ROMANOWSKYFÄRBUNG (HOUSTON 1990)**

1. Blutausstriche werden luftgetrocknet und 5 Minuten in Methanol fixiert.
2. Für 2 Minuten in Leishman'scher Lösung (Eosin-Methylenblau- Lösung) färben  
(Leishman'sche Färbelösung, Methanolgehalt > 50%, Fa. Merck-Diagnostica, # 5387).
3. Gut mit Wasser abspülen und 10 Minuten mit phosphatgepufferter Giemsa-Lösung (1:10 Verdünnung, Phosphatpuffer, pH 6.4, 0.01 M) gegenfärben.
4. Abspülen mit gepuffertem A. dest. (0,01 PBS; pH 6,4).
5. Lufttrocknen.

Für die Bewertung der Anfärbung wurden folgende Kriterien gewählt:

- a.) Intensität der Anfärbung
- b.) Differenzierung in Erythro-, Granulo- und Thrombozyten aufgrund der Morphologie und unterschiedlichen Anfärbbarkeit der Zellen.
- c.) Übergang Zellkern-Zytoplasma (klar abgesetzt, verwaschen, nicht vorhanden; Abgesetztheit der einzelnen Zellstrukturen voneinander).

*Ansetzen des Phosphatpuffers für die Spül- und Färbelösungen*

Stammlösung A:

13.61 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (= 0.1 M) auf 1000 ml lösen.

Stammlösung B:

17.8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  oder 35.81 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  auf 1000 ml Wasser lösen (= 0.1 M).

Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden durch Mischung wechselnder Volumenanteile von Lösung A und B verschiedene pH-Werte und durch 1:10 Verdünnung mit A. bidest. eine Konzentration von 0,01 M eingestellt (Tabelle 12). Der pH-Wert wurde nach der 1:10-Verdünnung mit einem pH-Meter kontrolliert und mit 0,1 M HCl- bzw. NaOH-Lösung korrigiert.

**Tabelle 12:** pH-Wert-Einstellung mit den Stammlösungen A und B.

pH-Wert	Lösung A [ml]	Lösung B [ml]
	Volumenanteile	Volumenanteile
6,00	9,0	1,0
6,50	7,0	3,0
6,80	5,0	5,0
7,00	4,0	6,0
7,20	3,0	7,0
7,40	2,0	8,0
7,70	1,0	9,0
8,00	0,5	9,5

### 3.2.5 VERGLEICH ZWEIER AUSWERTUNGSVERFAHREN FÜR DIE BESTIMMUNG DER LEUKO- UND THROMBOZYTENANZAHL

Zwischen den Lymphozyten und den kernhaltigen Thrombozyten existiert bei Fischen große morphologische Ähnlichkeit; sie werden deshalb oft verwechselt (ELLIS et al. 1989, HOUSTON 1990, LEHMANN et al. 1994). Bei der Zellzählung im Hämozytometer mit einer Blutverdünnungslösung besteht somit die Gefahr, die runden Thrombozyten mit den ebenfalls rund erscheinenden Lymphozyten zu verwechseln. Die Anfärbung von Blutaussstrichen läßt demgegenüber aufgrund der differenzierteren Anfärbung eine exakte Unterscheidung dieser zwei Zelltypen zu.

Um zu überprüfen, inwieweit eine Verwechslung der Leukozyten und Thrombozyten bei der Zählung mit der Blutverdünnungslösung nach Dacies auftritt, wurden die in der Neubauer-

kammer ermittelten Zählergebnisse (Thrombozyten, Leukozyten) mit den Ergebnissen der Pappenheimfärbung verglichen. Folgendes Vorgehen wurde gewählt:

#### *Verfahren 1: Bestimmung der Leukozyten- und Thrombozytenanzahl mittels der Pappenheimfärbung*

Aus der **Summe** der im Hämozytometer bestimmten Leukozyten- und Thrombozytenzahlen und dem Verhältnis der im Differentialblutbild bestimmten Zellzahlen wurde die absolute Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten errechnet.

Die einzelnen in der Pappenheimfärbung differenzierten Leukozyten-Subpopulationen wurden prozentual auf die Summe der Leukozyten bezogen und daraus die absoluten Zellzahlen errechnet. Die Thrombozyten blieben hierbei unberücksichtigt und wurden nicht der Leukozytenpopulation hinzugerechnet.

#### *Verfahren 2: Bestimmung der Leukozyten- und Thrombozytenanzahl mittels der Zählung in der Neubauerzählkammer*

Die Leukozyten- und Thrombozytenanzahlen wurden direkt im Hämozytometer differenziert bzw. bestimmt, die Berechnung der Leukozytensubpopulationen erfolgte analog Verfahren 2.

Für beide Verfahren erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in der Neubauerkammer mit der Dacie'schen Färbelösung, das Differentialblutbild wurde mit der Pappenheimfärbung bei pH-Werten von 6,5 und mit einer 1 : 50 verdünnten Giemsalösung durchgeführt (pH 6,5, 0,01 M phosphatgepuffertes A. dest.).

Für die weitere Bestimmung der Thrombo- und Lymphozytenanzahl wurde das erste Verfahren gewählt.

### 3.2.6 BESTIMMUNG DER HÄMOGLOBINKONZENTRATION

Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration wurde mit der Zyan-Methämoglobinmethode durchgeführt. Sie erfaßt nach NIEPAGE (1989) Hämoglobin, Hämiglobin, Oxyhämoglobin, Carboxyhämoglobin, nicht aber Verohämoglobin. Sulph-Hämoglobin wird durch diese Methode ebenfalls nicht erfaßt (BLAXHALL und DAISLEA 1973). Die Hämoglobinbestimmung mit der Methode nach SAHLI wurde nicht ausgeführt, da sie aufgrund der Kernhaltigkeit der Erythrozyten zu hohe Werte liefert (LARSEN und SNIESZKO 1961). Für die Ver-

suche wurde heparinisieretes Blut (30 µl, entsprechend einer Konzentration von 0,24 mg/ml Blut) verwendet.

Vorgehensweise:

1. 20 µl Blut wurde zu 5 ml Transformationslösung pipettiert und unter Vermeidung von Schaumbildung gemischt.
2. Nach mindestens 15 Minuten, spätestens nach 3 Stunden wurden die Proben in 2 ml Plastik-Eppendorfggefäße umgefüllt und 5 Minuten bei 8800 x g (MLW TH 12 Zentrifuge) zentrifugiert (mod. nach HOUSTON 1990).
3. Nach vorsichtigem Dekantieren in Plastikkuvetten mit 1 cm Schichtdicke wurden die Proben bei 546 nm im Photometer gegen die Transformationslösung gemessen.

Die Extinktionsmessung darf frühestens nach 5 bis 10 Minuten nach Zugabe zur Transformationslösung durchgeführt werden (BLAXHALL und DAISLEY 1973, SCHÄPERCLAUS et al. 1990) und muß spätestens nach 8 Stunden abgeschlossen sein (SCHÄPERCLAUS et al. 1990).

Für die Messung mit einfachen Photometern (Filterphotometer und Kolorimeter) muß eine Eichreihe erstellt werden, da das Lambert-Beersche Gesetz nur für monochromatisches Licht (Spektralphotometer) gilt (RICK 1990). Aus diesem Grund mußte zunächst eine Eichreihe laut Herstellerangaben mit einer Hämiglobincyanid-Standardlösung erstellt werden (MERCK Hämiglobincyanid-Standardlösung nach DIN 58 931). Tabelle 13 stellt die angesetzte Verdünnungsreihe dar.

**Tabelle 13:** Verdünnungsreihe für die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut.

Proben-Nummer	deklarierte Menge der StL [mg/100 ml]	StL [ml]	TL [ml]	Konzentration Met-Hb [mg/100 ml]	Konzentration Hb [g/100 ml]
1	232	1	1	116	29,1
2	232	1	1,5	92,8	23,3
3	78,9	1	0	78,9	19,8
4	78,9	1	0,25	63,1	15,8
5	232	1	4	46,4	11,6
6	59,1	1	0,5	39,4	9,9
7	59,1	1	1	29,6	7,4
8	27,8	1	0,5	18,5	4,6
9	27,8	1	1,5	11,1	2,8
10	27,8	1	4	5,6	1,4

StL = Hämiglobincyanid-Standardlösung

Met-Hb = Methämoglobin

TL = Transformationslösung

Hb = Hämoglobin

Die Extinktion der Standardlösung wurde gegen die Transformationslösung gemessen, die auf den Extinktionswert 0 abgeglichen wurde. Die Hämoglobinkonzentrationen der Standardlösungen wurden gegen die Extinktionswerte (546 nm) aufgetragen; aus der regressionsanalytischen Berechnung zwischen Hämoglobinkonzentrationen und den Extinktionswerten wurden die Hämoglobinkonzentration der Blutproben ermittelt. Die Bestimmung der Regressionsgeraden und des Korrelationskoeffizienten wurde mit dem Statistikprogramm HG 3 durchgeführt.

### **Methodenvergleich:**

Um den Unterschied zwischen den rechnerisch aus der Eichgeraden und den durch Multiplikation mit dem Faktor 36,8 ermittelten Hämoglobinwerten zu bestimmen, wurden von 15 Bachforellen aus der Durchlaufhaltung Blut aus dem D.c. entnommen. Nach Zugabe von 20 µl Blut zu 5 ml Transformationslösung wurde die Extinktion bei 546 nm gemessen und der Hämoglobingehalt mittels der zwei Verfahren rechnerisch ermittelt.

### 3.2.7 BESTIMMUNG DES HÄMATOKRITWERTES

Für die Versuche wurde heparinisieretes Blut (30 µl, entsprechend einer Konzentration von 0,24 mg/ml Blut) verwendet.

Die Bestimmung des Hämatokritwertes wurde mittels der Mikrohämatokritmethode durchgeführt. Nach der Blutgewinnung aus dem D.c. von zehn Bachforellen mit einem KGW von 400 bis 500 g wurde das Vollblut sofort in mit Heparin beschichtete Mikrohämatokritkapillaren gefüllt (Fa. Assistent, 75 mm, # 563) und in einer Mikrohämatokritzentrifuge (Mikrohämatokritzentrifuge 24, Typ 2075, Fa. Hettich, Tuttlingen) bei fest eingestellter Umdrehungszahl (12500 U/min) insgesamt 16 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Alle zwei Minuten wurde der Hämatokritwert mittels einer Schablone und Lupe abgelesen.

### 3.2.8 BEEINFLUSSUNG DES HÄMATOKRITWERTES DURCH HEPARIN UND EDTA

Um die Beeinflussung von Lithium-Heparin und EDTA (Ethylen-diamin-tetra-acetat) auf den Hämatokritwert zu untersuchen, wurden von zehn 400 bis 500g schweren Bachforellen jeweils genau 1 ml Blut mit heparinisierten (30 µl bzw. 0,24 mg/ml Blut) oder mit EDTA beschichteten sterilen Einmalspritzen dem D.c. entnommen (Sarstedt; 2.7 ml Monovetten KE Luer mit 1.6 mg Kalium-EDTA/ml Blut). Die Bestimmung des Hämatokritwertes erfolgte durch Zentrifugation bei 12500 U/min und Raumtemperatur für 10 Minuten. Es wurden heparinisierte

sowie mit Heparin unbeschichtete Mikrohämatokrit-Kapillaren verwendet (Fa. Assistent, 75 mm, heparinisierte # 563, nicht-heparinisierte # 564).

Um den Einfluß von Kalium-EDTA auf den Hämatokritwert zu untersuchen, wurde das von drei Bachforellen (1.5 kg KGW) ohne Antikoagulans entnommene Blut in unterschiedlichen Volumina (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 und 2.5 ml) sofort nach Blutentnahme in mit EDTA beschichteten Monovetten (Sarstedt) gegeben. Hierzu wurde der Stempel der Monovetten bis zum äußersten Anschlagpunkt gezogen und die entsprechenden Blutproben in die Spritze eingefüllt. Danach wurde der Schraubverschluß wieder aufgesetzt und das Blut zwei Minuten auf einem Taumelschüttler (Thermolyne Speci-Mix, Typ 26100, Fa. Barnstead, Thermolyne Corporation) bei Raumtemperatur vermischt. Danach wurde das Blut in sterile Eppendorfgefäße gefüllt. Zusätzlich wurde der Hämatokritwert des Nativblutes bestimmt (ohne Antikoagulans).

### 3.2.9 BESTIMMUNG DER SERUM- UND PLASMAOSMOLALITÄT

Von insgesamt 15 adulten Bachforellen aus der Durchlaufhaltung mit einem Gewicht von jeweils 400 bis 500 g wurde die Serum- und Plasmaosmolalität bestimmt.

Nach der Blutentnahme ohne Zusatz eines Antikoagulans wurde das Blut bei 0-4°C über Nacht im Kühlschrank in sterilen Eppendorfgefäßen gelagert und am nächsten Tag für 10 Minuten bei 8800 x g und Raumtemperatur zentrifugiert (MLW TH 12 Zentrifuge). Nach Abnahme des Serums erfolgte die Bestimmung der Osmolalität nach der Methode der Gefrierpunkterniedrigung in 150 µl-Volumina in einem Osmometer (Knaur Semi-Micro-Osmometer, Typ ML, Nr. A0299). Für die Bestimmung der Plasmaosmolalität wurde sowohl heparinisiertes als auch EDTA-Blut verwendet. Hierzu wurde das Blut ohne Zusatz eines Antikoagulans entnommen und sofort genau 1 ml zu 30 µl Heparin (Endkonzentration 41 USP-units/ml Blut) in sterilen Eppendorfgefäßen bzw. in mit EDTA beschichteten Monovetten (Sarstedt Blutmonovetten) gegeben. Die Gewinnung des Plasmas sowie die Osmolalitätsbestimmung erfolgte analog zum Blutserum.

Um den Einfluß von K<sup>+</sup>-EDTA auf die Blutosmolalität zu untersuchen, wurde das von drei Bachforellen (1.5 kg KGW) ohne Antikoagulans entnommene Blut in unterschiedlichen Volumina (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 und 2.5 ml) sofort nach Blutentnahme in mit EDTA beschichteten Monovetten (Sarstedt) gegeben. Hierzu wurde der Schraubverschluß entfernt, der Stempel der Monovetten bis zum äußersten Anschlagpunkt gezogen und die entsprechenden Blutproben in die Spritze eingefüllt. Danach wurde der Verschluß wieder aufgesetzt und das Blut zwei Minuten auf einem Taumelschüttler bei Raumtemperatur vermischt. Danach wurde das Blut in sterile Eppendorfgefäße gefüllt. Weiterhin wurde vom Blutserum die Osmolalität bestimmt. Das gleiche Prozedere wurde mit *A. bidest.* durchgeführt, d.h. es wurden 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 und 2.7 ml *A. bidest.* in die Monovetten gefüllt, 2 Minuten geschüttelt und die Osmolalität sowie die pH-Werte bestimmt.

### 3.2.10 BEEINFLUSSUNG DER BLUTPARAMETER DURCH HEPARIN

Um die Beeinflussung verschiedener Heparinkonzentrationen bzw. Heparinvolumina (Verdünnungseffekt) auf die Hämatokrit- und Blut-pH-Werte, Hämoglobinkonzentrationen und Osmolalität zu untersuchen, wurden 40 mg Lithium-Heparin mit einer Aktivität von 169.9 USP-units/mg in 5 ml PBS (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung, 0.15 M, pH 7.05, 290 mosm/kg; Life Technologies) gelöst und hiervon 0 (Kontrolle) bis 100 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäßen vorgelegt. Nach Blutentnahme aus dem Ductus Cuvieri ohne Verwendung eines Antikoagulans wurde sofort je 1 ml Blut in die einzelnen Gefäße pipettiert. Nach schonender Vermischung wurden anschließend die Hämatokrit- und pH-Werte bestimmt (siehe Kap. 3.2.8; S. 97). Die Ermittlung der Osmolalität und der Hämoglobinkonzentrationen erfolgte nach den in Kap 3.2.9 bzw. 3.2.6 beschriebenen Methoden. Es wurden die Blutproben von 6 Tieren mit einem Gewicht zwischen 400 bis 500 g, die im Wasserdurchlaufsystem bei 13 °C gehalten wurden, untersucht.

Mittels der linearen Regressionsberechnung wurde der Zusammenhang zwischen Heparinvolumen und der Hämatokrit- und Blut-pH-Werte, Hämoglobinkonzentrationen und Osmolalität berechnet.

Die entsprechenden Heparinkonzentrationen und -Aktivitäten sind in Tabelle 14 angegeben.

**Tabelle 14:** Heparin-Endkonzentrationen- und Aktivitäten pro ml Blut nach Zugabe verschiedener Volumina der Heparinstammlösung zu 1 ml Fischblut (8 mg / ml PBS).

Heparinmenge [µl]	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Heparin-Endkonzentration [mg/ml Blut]	0,04	0,08	0,16	0,24	0,32	0,40	0,48	0,56	0,64	0,72	0,80
Heparin-Aktivität [USP-units/ml Blut]	6,8	13,6	27,2	40,8	54,4	68,0	81,6	95,2	108,8	122,4	149,6

### 3.2.11 BESTIMMUNG DER OSMOTISCHEN RESISTENZ DER ERYTHROZYTEN

Heparinisiertes Blut (10 µl Li-Heparin/ml Blut) wurde in eine Reihe von Lösungen absteigender Kochsalzkonzentration gebracht (0,95 - 0,0 % NaCl). In der schwach hypotonen Salzlösung tritt noch keine Hämolyse auf. Der Hämolysebeginn durch Aufnahme der Erythrozyten von Wasser heißt Minimalresistenz, die vollständige Hämolyse heißt Maximalresistenz. Die Differenz beider nennt man Resistenzbreite.

Vorgehensweise (nach BARHAM et al. 1988)

Von einer 2 %-igen NaCl-Stammlösung wurde eine absteigende Verdünnungsreihe in 0,05-% Schritten in Eppendorf-Reaktionsgefäße angefertigt. Das Endvolumen betrug 1 ml. Dann wurde jeweils 10 µl heparinisiertes Blut hinzugegeben und vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde eine Minute bei 8800 x g zentrifugiert. Die Hämolyse wurde zum einen optisch beurteilt, zum anderen wurde die durch den Austritt von Hämoglobin rotgefärbte Lösung bei 546 nm photometrisch gegen A. dest. gemessen.

Die Abstufungen der bei der Hämolyse auftretenden Rotfärbungen wurde nach folgenden Kriterien optisch bewertet:

Farblos

+ Beginn der Hämolyse (schwache Rotfärbung) = Minimalresistenz

++ starke Rotfärbung

+++ sehr starke Rotfärbung, keine Änderung der Farbintensität bei weiter abnehmender NaCl-Konzentration = Maximalresistenz.

### 3.2.12 BERECHNUNG DER HÄMATOLOGISCHEN KENNWERTE

Aus der Erythrozytenanzahl, des Hämatokritwertes und der Hämoglobin-Konzentration wurden die hämatologischen Kennwerte nach RICK (1990) berechnet:

#### 1. Mittleres Volumen der einzelnen Erythrozyten

$$\text{MCV [fl]} = \frac{\text{Hkt [\%]} \times 10}{\text{Anzahl Erythrozyten}}$$

Hkt = Hämatokritwert

1 µl = 10<sup>9</sup> femtoliter [fl]

## 2. Mittlerer Hämoglobingehalt der einzelnen Erythrozyten

$$\text{MCH in pg} = \frac{\text{Hb [g/100 ml]} \times 10}{\text{Anzahl Erythrozyten}}$$

Hb = Hämoglobinkonzentration

## 3. Mittlere Hämoglobin-Konzentration in den Erythrozyten

$$\text{MCHC [g/100 ml]} = \frac{\text{Hb [g/100 ml]}}{\text{Hkt [\%] / 100}}$$

Hkt = Hämatokritwert

Hb = Hämoglobinkonzentration

### 3.2.13 BESTIMMUNG DER GESAMTEIWEIßKONZENTRATION IM BLUTPLASMA

Die Messung der Gesamtproteinkonzentration wurde mittels einer nach OHNISHI und BARR (1978) modifizierten Lowrymethode gemessen (Gesamtprotein-Testkitt, Sigma Diagnostics 609-A).

Das heparinisierte Vollblut wurde bei 8800 x g 5 Minuten bei RT zentrifugiert und das Plasma mit einer Pasteurpipette abgesogen.

Da die Messung mit einem Filterphotometer vorgenommen wurde, mußte analog der Hämoglobinbestimmung wegen der Ungültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes eine Eichreihe laut Herstellerangaben mit einer Proteinstandardlösung (Sigma Diagnostics 690-10) erstellt werden.

## I. Kalibrierungskurve

1. 0,5 ml des Standards zu 50 ml steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung pipettieren.
2. In Eppendorfgefäße werden folgende Lösungen pipettiert:

Proben-Nr.	Protein-Standart [ml]	NaCl 0,9 % [ml]	Protein [mg/100 ml]
1 (Leerwert)	0	0,20	0
2	0,05	0,15	25
3	0,10	0,10	50
4	0,15	0,05	75
5	0,20	0,00	100

3. Zu jedem Gefäß 2,20 ml Biuret-Reagenz zugeben, gut mischen und 10 min bei RT stehen lassen (18 - 26°C).
4. 0,10 ml Folin- und Ciocalteu's Phenolreagenz hinzugeben, gut mischen und 30 min bei Raumtemperatur stehenlassen.
5. Im Photometer bei 550 nm messen. Der Leerwert ("Blank") wird gegen A. dest., die Standardproteinproben gegen den Leerwert gemessen.

Die gemessenen Extinktionswerte wurden gegen die Standardkonzentrationen aufgetragen und die lineare Regression errechnet. Aus der Beziehung zwischen Extinktionswerte (Abszisse) und Proteinkonzentration (Ordinate) konnte dann aus dem Extinktionswert die Proteinkonzentration der unbekannt Probe errechnet werden.

## II. Messung der Proben

1. Plasmprobe mit isotonischer NaCl-Lösung auf 15 - 100 mg/100 ml verdünnen (Meßbereich), d.h. das Fischplasma ist mit steriler isotonischer NaCl-Lösung 1:100 zu verdünnen.
2. 0,20 ml der verdünnten Plasmprobe in Eppendorfgefäße vorlegen, 2,20 ml Biuret-Reagenz hinzugeben. Gut mischen und 10 min bei RT stehen lassen (18 - 26°C).  
Leerwert: enthält statt Plasma 0,20 ml isotonische NaCl-Lösung.
3. 0,10 ml Folin- und Ciocalteu's Phenolreagenz hinzugeben, gut mischen und 20 - 30 Minuten stehenlassen. Lösung in Küvetten umfüllen und bei 550 nm gegen den Leerwert messen.

Das errechnete Ergebniss aus der Regressionsgeraden wurde mit dem Verdünnungsfaktor 100 multipliziert [mg/dl] und durch 1000 dividiert; das Ergebnis stellt die Gesamteiweißkonzentration in g/100 ml Plasma dar.

### 3.3 ANWENDUNG DER HÄMATOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGSVERFAHREN

#### 3.3.1 VERGLEICHENDE BLUTUNTERSUCHUNGEN IM WASSERKREISLAUF- UND DURCHLAUFSYSTEM.

##### 3.3.1.1 VERSUCHS- UND HALTUNGSBEDINGUNGEN

Als Versuchsfische dienten klinisch gesunde Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) mit einer Körpermasse von etwa 400 Gramm. Die prinzipiellen Haltungsbedingungen der Fische sind im Abschnitt 3.1.1 bzw. 3.1.2 (S. 80) beschrieben. Die Versuchstiere wurden 24 h vor der Blutentnahme bzw. Betäubung nicht gefüttert. Während der Blutentnahme starben zwei Tiere des Kreislaufsystems, so daß sich hier die Anzahl der untersuchten Individuen auf 28 reduzierte.

##### ***Versuchsgruppe 1: Durchlaufhaltung ("Durchlauftiere")***

Die Bachforellen wurden in einem 600 Liter fassenden Rundstrombecken im Wasserdurchlauf gehalten. Die Besatzdichte betrug 24,6 kg/m<sup>3</sup>, die Wasserdurchlauftrate war auf etwa 5 l/min eingestellt. Die Tiere waren über ein Jahr an das Durchlaufsystem adaptiert. Die weiteren Haltungsbedingungen (Fütterung, Beleuchtung, Belüftung) entsprechen Abschnitt 3.1.1 (S. 80), in Tabelle 15 (S. 104) sind vergleichend die detaillierten Versuchsbedingungen aufgelistet.

##### ***Versuchsgruppe 2: Kreislaufhaltung ("Kreislauftiere")***

Die Versuchstiere wurden analog der Durchlaufhaltung in einem 600 Liter fassenden Rundstrombecken gehalten. Die Besatzdichte betrug 26,9 kg/m<sup>3</sup>. Die Haltungseinheiten waren neben 4 anderen Fischbecken in einer insgesamt 25 m<sup>3</sup> fassenden Kreislaufanlage integriert. Die Bachforellen waren 4 Monate an dieses Haltungssystem adaptiert. Die weiteren Haltungsbedingungen (Fütterung, Beleuchtung, Belüftung) entsprechen Abschnitt 3.1.2 (S. 80-81), in Tabelle 15 (S. 104) sind vergleichend die detaillierten Versuchsbedingungen aufgelistet.

**Tabelle 15:** Versuchsbedingungen

Versuchsparameter	Durchlaufhaltung	Kreislaufhaltung
durchschnittliche <sup>1</sup> BD [kg] pro Becken	14,74	16,13
durchschnittliche <sup>1</sup> BD [kg] pro m <sup>3</sup>	24,6	26,9
Einzelgewicht [g]	421 ± 62	448 ± 77
Anzahl Individuen pro Becken	35	36
Anzahl untersuchter Individuen	30	28
Größe der Fischbecken [l]	600	600
Tag-Nacht-Rhythmus [h]	8 : 16	8 : 16
Beckenform	rund	rund
<sup>2</sup> Fütterung [%]	1,5	1,5

<sup>1</sup>BD = Besatzdichte

<sup>2</sup>Prozent vom Körpergewicht

Nach Betäubung der Fische (siehe Kapitel 3.2.1.1; S. 81) erfolgte die Blutentnahme aus dem D.c. mit sterilen 2 ml Einmalspritzen und 0,9 mm sterilen Einmalkanülen; hierbei wurde das Blut ohne Zusatz von Heparin gewonnen. Pro 100 g KGW wurde maximal 1 ml Blut entnommen.

Das nicht heparinisierte Blut wurde sofort in 2 ml sterile Eppendorfgefäße gefüllt, in denen Lithium-Heparin vorgelegt wurde (41 USP-units/ml, entsprechend 30 µl/ml Blut). Bis zur weiteren Verarbeitung wurde es auf Eis gelagert. Es diente der Bestimmung der Zellanzahl, Protein- und Hämoglobinkonzentration, sowie der Leukozytendifferenzierung in der Pappenheimfärbung. Pro Blutprobe wurde eine Doppelzählung bzw. Doppelbestimmung vorgenommen und hiervon der Mittelwert errechnet.

Ein Teil des verbleibenden nicht-heparinisierten Blutes diente der Bestimmung des pH- und des Hämatokritwertes sowie der Serumosmolalität. Der pH-Wert und der Hämatokritwert (Verwendung von nicht heparinisierte Mikrohämatokritröhrchen) wurde sofort nach der Blutentnahme bestimmt. Das restliche Blut wurde nach über Nacht Inkubation bei 4°C zentrifugiert und die Serumosmolalität bestimmt.

Die Erythrozyten-, Leuko- und Thrombozytenanzahlen wurden mit der Dacie'schen Differenzierungslösung durch Auszählung von insgesamt 300 bis 400 Zellen in der Neubauerkammer ermittelt. Das heparinisierte Vollblut wurde bei 8800 U/min für 5 Minuten bei RT zentrifugiert und bis zur Bestimmung der Gesamteiweiß-Konzentration bei -80°C eingefroren. Der Blutausschlag und die Pappenheimfärbung wurden am selben Tag der Blutentnahme durchgeführt. Hierbei wurden sowohl die Leukozyten (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) als auch die Thrombozyten differenziert. Bei der Differenzierung wurden etwa 300 bis 500 Zellen ausgezählt. Die Färbung für das Differentialblutbild nach Pappenheim wurde bei pH-Werten von 6,5 - 6,8

und mit einer 1 : 50 verdünnten Giemsalösung durchgeführt. Die Berechnung der absoluten und relativen Zellzahlen erfolgte nach Verfahren 2 (siehe Punkt 3.2.5; S. 95-96). Tabelle 16 stellt in einer Übersicht die verwendeten Methoden dar.

**Tabelle 16:** Verwendete Methoden

Parameter	Methode
Betäubung	50 mg Benzocain/l Wasser; Betäubungsbad
Heparin	30 µl/ml Blut (41 USP-units/ml)
Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten)	Zählung im Hämozytometer (Neubauer-Kammer) mit der Färbelösung nach Dacies. Heparinisiertes Blut.
Differentialblutbild	Pappenheimfärbung (Blutausstrich) bei pH 6.5-6.8 (1:50 verdünnte Giemsalösung mit phosphatgepufferter A. dest., pH 6.5-6.8, 0.01 M). Heparinisiertes Blut.
Hämoglobinkonzentration	Zyan-Methämoglobinmethode. Heparinisiertes Blut.
Hämatokrit	Nativblut; Zentrifugation bei 12500 U/min 10 min lang bei RT
Proteinkonzentration	Lowry-Methode. Heparinisiertes Blut.
pH-Wert	elektrochemisch. Nativblut.
Serumosmolalität	Gefrierpunktserniedrigung im Osmometer. Zentrifugation bei 8800 x g für 10 min bei RT. Nativblut.

RT = Raumtemperatur

In beiden Systemen wurde täglich die Mortalität protokolliert und die Fische nach Betäubung untersucht.

### 3.3.1.2 KONTROLLE DER WASSERQUALITÄT

Der Verlauf der Wasserqualität wurde in regelmäßigen Abständen in beiden Systemen kontrolliert. Folgende Wasserwerte wurden bestimmt:

pH-Wert (jeden Tag), Temperatur (jeden Tag), Sauerstoff (jeden Tag), Ammoniak (jeden Tag), Nitrit (jeden Tag), Nitrat (alle drei bis fünf Tage), Gesamthärte (alle drei bis fünf Tage), Karbonathärte (alle drei Tage), Kalzium (alle drei bis fünf Tage), Sulfat (alle fünf Tage), Chlorid (alle drei bis fünf Tage), Phosphat (alle drei bis fünf Tage), und Leitfähigkeit (jeden Tag).

Angaben zur Methodik der Wasseranalytik sind im Kapitel 3.4 (S. 108) angegeben.

### 3.3.2 SCHWANKUNGEN DES ZELLULÄREN BLUTBILDES NACH EINWIRKUNGEN VON STRESSOREN UND VARIATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER JAHRESZEIT

#### 3.3.2.1 VERSUCHS- UND HALTUNGSBEDINGUNGEN

In einer 5 Monate andauernden Langzeitstudie von Mai bis Oktober wurde ermittelt, inwieweit bei den Bachforellen unter konstanten Haltungsbedingungen Veränderungen der zellulären Blutparameter auftraten. Für die Untersuchungen wurde ein Teil der Fische mit einem Anfangsgewicht zwischen 400 - 600 g aus dem Kreislaufsystem (Haltungsbedingungen siehe Kap. 3.1.2; S. 80) verwendet. Hierzu wurden die Fische aus Rundbecken in einen etwa 60 Liter Wasser fassenden Plastik-Transportbehälter gekeschert und in einen separaten Raum des Instituts verbracht. 3 bis 4 Fische wurden im Transportgefäß untergebracht, das Gewicht der Tiere wurde dabei direkt in dem Behältnis ermittelt. Von den Transportbehältern wurden die Bachforellen vorsichtig in 800 Liter Wasser fassende epoxydharzbeschichtete rechteckige Langstrombecken aus PVC, die im Wasserdurchlauf gefahren wurden, umgesetzt. Insgesamt wurden zwei Becken des Durchlaufsystems besetzt. Die Wassertemperatur lag im Durchlaufwasser um etwa 3°C niedriger als im Kreislaufwasser. Das gesamte Vorgehen beanspruchte etwa 2 h Zeit, die Zeit vom Herauskeschern der Tiere bis zum Verbringen in die Durchlaufhaltung betrug etwa 3 - 5 Minuten. Eine Woche vor Umsetzen der Tiere wurde bei 5 Tieren das zelluläre Blutbild bestimmt. In Tabelle 17 sind die Haltungs- bzw. Versuchsbedingungen im Einzelnen aufgelistet.

**Tabelle 17:** Versuchsbedingungen für die Ermittlung langfristiger Veränderungen des Blutbildes.

Versuchsparameter	Versuchsbecken 1	Versuchsbecken 2
durchschnittliche <sup>1</sup> BD [kg] pro Becken	18	19
durchschnittliche <sup>1</sup> BD [kg] pro m <sup>3</sup>	22,5	21,3
Anzahl untersuchter Individuen	31	30
Größe der Fischbecken [l]	800	800
Tag-Nacht-Rhythmus [h]	8 : 16	8 : 16
Beckenform	rechteckig (Langstrombecken)	rechteckig (Langstrombecken)
<sup>2</sup> Fütterung [%]	1,5	1,5

<sup>1</sup>BD = Besatzdichte

<sup>2</sup>Prozent vom Körpergewicht

Nach Betäubung der Fische erfolgte die Blutentnahme aus dem D.c. mit sterilen und heparinisierten Einmalspritzen (30 µl Heparin, 41 USP-units/ml Blut) und 0,9 mm sterilen Einmalkanülen. Pro 100 g KGW wurde maximal 1 ml Blut entnommen.

Im einem Zeitraum von 150 Tagen wurden pro Woche bei 2 - 3 Bachforellen folgende Blutparameter ermittelt:

Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten mit der Färbelösung nach Dacies.

Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten mittels der Pappenheimfärbung. Die Granulozytensubpopulationen wurden nicht untersucht.

Pro Blutprobe wurde eine Doppelzählung vorgenommen und hiervon der Mittelwert errechnet.

### 3.3.2.2 KONTROLLE DER WASSERQUALITÄT

Folgende Wasserqualitätsparameter wurden kontinuierlich über ein Jahr bestimmt:

pH-Wert, Temperatur, Sauerstoff, Ammoniak, Nitrit, Nitrat, Gesamthärte, Karbonathärte, Kalzium, Sulfat, Chlorid und Phosphat.

Erläuterungen zur Wasseranalyse sind im Kapitel 3.4 (S. 108) angegeben.

### 3.3.3 BEEINFLUSSUNG DES BLUTBILDES DURCH DIE FISCHGRÖÖE

#### 3.3.3.1 HALTUNGS- UND VERSUCHSBEDINGUNGEN

Von 53 Bachforellen aus dem Wasserdurchlaufsystem mit einem KGW zwischen 200 und 700 g wurden die Anzahlen der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten sowie die Leukozytensubpopulationen im Differentialblutbild bestimmt. Die Tiere waren an das System adaptiert. Den Tieren wurde 1 ml Blut aus dem D.c. mit heparinisierten sterilen Einmalplastikspritzen entnommen (Li-Heparin mit 41 USP-units/ml Blut). Die Zählung der Zellen erfolgte mit der Neubauerkammer in Dacie'scher Färbelösung, die Differenzierung der Leukozyten und Thrombozyten mit der panoptischen Pappenheimfärbung bei pH 6,5 und 1:50 verdünnter Giemsalösung. Die Granulozytensubpopulationen wurden nicht untersucht.

Die Auswertung wurde nach Verfahren 2 durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.5; S. 94).

Für die Gewichtgruppen 250 bis 400, 400 bis 500 und > 500 g wurden die Mittelwerte berechnet. Mit der linearen Regressionsanalyse wurde die Abhängigkeit der Fischgröße und der ermittelten absoluten Zellzahlen überprüft. Hierbei wurde die Zellzahl als abhängige Größe gegen das Körpergewicht geplottet und der Korrelationskoeffizient berechnet.

### 3.3.3.2 KONTROLLE DER WASSERQUALITÄT

Folgende Wasserqualitätsparameter wurden in regelmäßigen Intervallen bestimmt:

pH-Wert, Temperatur, Sauerstoff, Ammoniak, Nitrit, Nitrat, Gesamthärte, Karbonathärte, Kalzium, Sulfat, Chlorid, Phosphat, und Leitfähigkeit.

Erläuterungen zur Wasseranalyse sind im Kapitel 3.4 (S. 108) angegeben.

## 3.4 WASSERANALYTIK

Alle benutzten chemischen Meßverfahren stellen Methoden nach den DIN-Vorschriften der "Deutschen Einheitsverfahren zur Abwasser- und Schlammuntersuchungen" dar. Für die Messungen der Ammonium- und Nitritkonzentrationen im Wasser wurden alle Chemikalien von der Firma Merck (Reinheitsgrad pro Analysisi) bezogen, für die selbstangesetzten Reaktionslösungen wurde A. tridest. verwendet.

### 3.4.1 MESSUNG UND BERECHNUNG DER AMMONIAK-KONZENTRATIONEN:

Durchführung der Messung:

8 ml Probenwasser werden in ein Reagenzglas gefüllt und mit folgenden Lösungen versetzt:

- 1.2 ml Pufferlösung
- 0.3 ml Phenol-Reagenz.
- 0.3 ml NaOCl (Natriumhypochlorit-Lösung)

Nach Durchmischen wurden die fest verschlossenen Wasserproben über Nacht bei 20°C im Dunkeln aufbewahrt. Die sich entwickelnde blaue Farbe ist bis zu 9 Tagen stabil.

Die Extinktion wurde bei 630 nm in 1 cm Plastikeinmalküvetten (Fa. Greiner, Nr. 613101) in einem Filterphotometer (Dr. Lange Digital-Photometer LP 1 ) gegen A. tridest. gemessen und die Ammoniumkonzentration an Hand eines vorher ermittelten Faktors berechnet (s.u.).

## REAGENZIEN

**Pufferlösung:** auf 1000 ml Aqua tridest. wurden der Reihe nach in einem Meßkolben folgende Chemikalien gelöst:

66.7 g Trinatriumcitrat (Fa. Merck, # 6448)

34.0 g Borsäure (Fa. Merck, # 165)

30.0 g Natriumhydroxid (Fa. Chemapol, Prag, # 502710987)

19.4 g Zitronensäure -Monohydrat (Fa. Chemapol, Prag, # 50391)

Die Lösung wurde in eine braune Glasflasche abgefüllt und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Sie ist bis zu einem halben Jahr haltbar. Bei Trübungen ist die Lösung zu verwerfen.

### **Phenolreagenz:**

35.0 g kristallines Phenol (Fa. Merck, # 206)

0.40 g Nitroprussidnatrium-Dihydrat (Fa. Merck, # 6541)

wurden in 100 ml A. tridest. vorgelöst, auf 1000 ml im Meßkolben aufgefüllt und in dunklen Flaschen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

### **Hypochloritlösung (Chlorbleichlauge), pH 13**

Es wurde eine Hypochloritlösung bereitet, die 0.15 % aktives Chlor enthielt. Hierfür kann eine handelsübliche Bleichlösung (z.B. CHLORIX) oder eine Hypochloritlösung verwendet werden.

2.0 g Natriumhydroxid (Fa. Chemapol, # 502710987)

Y ml Chlorbleichlauge (mit 0.15 % aktivem Chlor)

wurden im Meßkolben auf 100 ml A. tridest. aufgefüllt.

## Bestimmung des aktiven Chlors in einer handelsüblichen Chlorbleichlauge

Herstellung einer 1 %-igen Kaliumjodidlösung (Fa. Merck, # 105043). Hierzu wurden 1 g Kaliumjodid auf 100 ml A. tridest. gelöst. Zu 50 ml dieser Lösung wurde 1 ml der Chlorbleichlauge gegeben und mit 0.25 ml Salzsäure (37 %-ig, Fa. Merck, # 113386) angesäuert. Mit 0.1 N Natriumthiosulfatlösung ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  Fa. Merck, # 106512) bis zum Farbumschlag titrieren.

1 ml 0.1 N Natrium-Thiosulfatlösung = 3.5 mg aktives Chlor.

Das benötigte Volumen Y für die Herstellung der Hypochloritlösung für die Ammonium-Bestimmung läßt sich berechnen nach:

$$\frac{150}{X \cdot 3.5} = Y \text{ ml}$$

x = bei der Titration verbrauchte 0.1 N Natrium-Thiosulfatlösung

Y = ml Bleichlösung zur Herstellung von 100 ml Hypochloritlösung für die Ammoniumbestimmung

## AMMONIUMEICHREIHE

2,9722 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (entspricht 1 g  $\text{NH}_4^+$ ) wurden in 1000 ml A. tridest. gelöst (Ammoniumstammlösung) und im Verhältnis 1:20 verdünnt (50 ml Stammlösung auf 1000 ml A. tridest.). In 1000 ml sind dann 50 mg  $\text{NH}_4^+$  enthalten.

Für die Erstellung der Eichgeraden wurden folgende Volumina dieser Ammoniumlösung ad 100 ml A. tridest. in Meßkolben pipettiert:

4.0 ml	0.200 mg $\text{NH}_4^+$ /100 ml	2.00 mg $\text{NH}_4^+$ /l
2.0 ml	0.100 mg $\text{NH}_4^+$ /100 ml	1.00 mg $\text{NH}_4^+$ /l
1.5 ml	0.075 mg $\text{NH}_4^+$ /100 ml =	0.75 mg $\text{NH}_4^+$ /l
1.0 ml	0.050 mg $\text{NH}_4^+$ /100 ml	0.50 mg $\text{NH}_4^+$ /l
0.50 ml	0.025 mg $\text{NH}_4^+$ /100 ml	0.25 mg $\text{NH}_4^+$ /l
0.20 ml	0.010 mg $\text{NH}_4^+$ /100 ml	0.10 mg $\text{NH}_4^+$ /l
0 ml	Reagenzienblindwert	Reagenzienblindwert

Von diesen Verdünnungsstufen wurden jeweils 8 ml in ein Reagenzglas gefüllt und mit folgenden Lösungen versetzt:

1.2 ml Pufferlösung

0.3 ml Phenol-Reagenz.

0.3 ml NaOCl (Natriumhypochlorit-Lösung)

Reagenzienblindwert: Statt Probenwasser wurde A. tridest. verwendet.

Nach Durchmischen wurden die Meßproben über Nacht bei 20°C im Dunkeln gut verschlossen aufbewahrt. Nach Extinktionsmessung (630 nm) der Eichproben und Subtraktion der Reagenzienblindwerte wurden die Meßwerte gegen die Ammonium-Konzentrationen (in mg/l) aufgetragen und die lineare Regression berechnet. An Hand des Korrelationskoeffizienten kann die Güte der Anpassung abgeschätzt werden. Durch die Division der einzelnen Ammoniumkonzentrationen und den zugehörigen Extinktionswerten wurden verschiedene Faktoren ermittelt. Durch Mittelwertbildung wurde ein Faktor F berechnet, der mit den Extinktionswerten des Probenwassers multipliziert die Ammonium-Ammoniak-Konzentrationen in mg/l Wasser angibt.

#### BERECHNUNG DER AMMONIAK-KONZENTRATION

Von toxikologischer Bedeutung ist nicht so sehr das Ammonium-Ion  $\text{NH}_4^+$ , sondern das Ammoniakmolekül ( $\text{NH}_3$ ), da es die in dem Fisch frei diffusible und somit toxisch wirksame Form darstellt (SCHÄPERCLAUS et al. 1990, LLOYD 1992, TWITCHEN und EDDY 1994). Die Ammoniak-Konzentration wird im Wasser durch den pH-Wert, die Temperatur sowie Alkalität, Gesamthärte und suspendierten Substanzen im Wasser bestimmt (TRUSSEL 1972, EMERSON et al. 1975, MESSER et al. 1984). Zwischen Ammoniak und Ammonium-Ion in wässriger Lösung liegt folgendes Dissoziationsgleichgewicht vor (HENNING et al. 1976):



Im Ammoniak-Ammonium-Gleichgewicht nimmt mit steigendem pH-Wert und Wassertemperaturen der Anteil der undissoziierten Ammoniakmolekel zu, die der dissoziierten Ammonium-Ionen ab. Die Dissoziationskonstante wurde später von TRUSSEL (1972) exakt ermittelt und von EMERSON et al. (1975) bestätigt. MESSER et al. (1984) untersuchten die Beeinflussung der Gesamthärte, des pH-Wertes, der Temperatur und Gesamtkonzentration an gelösten Bestandteilen im Wasser auf das Ammoniak-Ammoniumgleichgewicht: sie stellten fest, daß mit Erhöhung der Wasserhärte und Konzentration an gelösten Teilchen der prozentuale Anteil des Ammoniaks sinkt. Daher nahmen die Autoren an, daß die errechneten Ammoniak-Konzentrationen aus der Gesamtammonium-Ammoniak-Konzentrationen aus den Tabellen von

TRUSSEL (1972) und EMERSON et al. (1975) mit 10 - 20 % zu hoch angesetzt werden. MESSER et al. (1984) führten aus diesem Grunde einen Korrekturfaktor s ein, der die Beeinflussung der Salinität auf die Berechnung des prozentualen Anteils des Ammoniaks aus der Gesamtammonium-Ammoniak-Konzentration berücksichtigt.

Gleichung 1 (S. 113) stellt die Berechnung der Ammoniak-Konzentration dar, die Ableitung der Formel befindet sich im Anhang (S.252). Die Berechnung wurde auf einem programmierbaren Texas Instruments Rechner (TI-85) durchgeführt.

$$\text{NH}_3 = \frac{(\text{Ex}_{630} \cdot F \cdot - 0.02439 \cdot \text{°dH}) + 1.196}{1 + 10((- 0.03234 \cdot T + 10.0532) - \text{pH})} \quad (1)$$

Hierbei ist

- Ex<sub>630</sub> Extinktionswert der Wasserprobe, gemessen bei 630 nm
- F berechneter Faktor F an Hand der Meßwerte der Eichreihe
- NH<sub>3</sub> Ammoniak-Konzentration in mg/l Wasser
- T Wassertemperatur in °C
- pH pH-Wert der Wasserprobe
- °dH Karbonathärte in Grad deutscher Härte

### 3.4.2 MESSUNG DER NITRIT-KONZENTRATIONEN

#### DURCHFÜHRUNG DER MESSUNG:

10 ml der Wasserprobe und 0.20 ml Sulfanilamidreagenz wurden in ein Reagenzglas pipettiert, gut vermischt und nach etwa 2 Minuten 0.20 ml Naphthylaminreagenz zugesetzt. Nach 30 Minuten (bis 12 Stunden) Inkubation im Dunkeln wurde die Extinktion bei 542 nm im Photometer gegen A. dest. gemessen.

## REAGENZIEN

### Sulfanilamid-Reagenz:

10 g Sulfanilamid (Fa. Merck, # 11799) wurden in 600 ml A. tridest. und 100 ml konzentrierter Salzsäure gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt.

### Naphthylamin-Reagenz:

0.50 g N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid (Naphthylamin, Fa. Merck, # 6237) wurden in 500 ml A. tridest. gelöst. Die Lösung muß in Braunglasflaschen aufbewahrt werden.

## NITRITEICHSREIHE

1,500 g getrocknetes Natriumnitrit (Fa. Merck, # 115) wurde auf 1000 ml A. tridest. in 1000 ml Meßkolben gelöst (= 1000 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/l Stammlösung) und 1:100 verdünnt (z.B. 1 ml ad 100 ml A. tridest = 1 mg/100 ml). Von dieser Lösung wurde für die Erstellung der Eichgeraden folgende Volumina ad 100 ml A. tridest. in 100 ml Meßkolben pipettiert:

0 ml	Reagenzienblindwert	Reagenzienblindwert
0.5 ml	0.005 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /100 ml	0.05 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /l
1.0 ml	0.010 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /100 ml	0.10 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /l
2.5 ml	0.025 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /100 ml	0.25 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /l
5.0 ml	0.050 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /100 ml	0.50 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /l
7.5 ml	0.075 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /100 ml	0.75 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /l
10.0 ml	0.100 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /100 ml	1.00 mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /l

Von diesen Verdünnungsstufen wurden jeweils 10 ml in ein Reagenzglas gefüllt und mit 0.20 ml Sulfanilamid- und Naphthylamin-Reagenz versetzt. Nach Durchmischen wurden die Proben 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Messen der Extinktion bei 542 nm und Subtraktion des Reagenzienblindwertes wurden die Extinktionswerte der Proben gegen die Nitrit-Konzentrationen (in mg/l) aufgetragen und die lineare Regression berechnet. An Hand des Korrelationskoeffizienten kann die Güte der Anpassung abgeschätzt werden. Durch die Division der einzelnen Nitrit-Konzentrationen und den zugehörigen Extinktionswerten wurden analog der Ammonium/Ammoniak-Eichreihe verschiedene Faktoren ermittelt; durch Mittelwertbildung kann ein Faktor F berechnet werden, der mit den Extinktionswerten des Probenwassers multipliziert die Nitrit-Konzentration in mg/l Wasser angibt.

### 3.4.3 MESSUNGEN DER WASSERHÄRTE, LEITFÄHIGKEIT, ANIONEN UND KATIONEN IM PROBENWASSER

Für die Ermittlung der Wasserhärten und Konzentrationen unten aufgeführter Kationen und Anionen wurden kolorimetrische Fertigtests der Firma Merck verwendet. Die Ablesung der Konzentration in der Wasserprobe erfolgte an Hand des Farbvergleichs mit einer dem Testkitt beigefügten Farbskala.

1. Nitrat-Ionen: Spectroquant-Nitrattest, Nr. 14771
2. Karbonathärte: Aquamerck-Carbonathärte Nr. 8048 (Säurebindungsvermögen bzw. Säurekapazität bis 4,3).
3. Gesamthärte: Aquamerck-Gesamthärte, Nr. 8039 (Summe der Erdalkali-Ionen)
4. Alkalität: Aquamerck-Alkalität, Nr. 11109 (Säurekapazität bis pH 8,2 und 4,3)
5. Kalzium-Ionen: Aquamerck-Calcium-Test, Nr. 11110
6. Chlorid-Ionen: Aquamerck-Chlorid-Test, Nr. 11106
7. Sulfat-Ionen: Microquant-Sulfat-Test, Nr. 14789
8. Phosphat-Ionen: Aquamerck-Phosphat-Test, Nr. 14661
9. Eisen-II-Ionen: Aquamerck-Eisen-Test, Nr. 14660
10. pH-Wert (Schott pH-Meter CG 840)
11. Sauerstoff-Konzentration und Temperatur (Oxi- 96, Fa. WTW)
12. Leitfähigkeit (digitales Leitfähigkeitsmessgerät VDSF-Umwelttechnik)
13. Beleuchtungsstärke (Dx-100 Lux-Meter, Fa. INS)

### 3.5 STATISTIK

Die Varianzanalyse wurde auf einem PC mit Hilfe des SPSS-Statistikprogramms (Version 1), der t-Test für abhängige und unabhängige Stichproben auf einen programmierbaren Rechner (Texas Instruments TI-85) nach den Formeln von LORENZ (1992) bzw. SACHS (1978) durchgeführt.

Für alle statistischen Verfahren wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  von 0,05 gewählt.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 BETÄUBUNG, BLUTENTNAHMETECHNIKEN UND BLUTUNTERSUCHUNGSMETHODEN

#### 4.1.1 BETÄUBUNG

Tabelle 18 stellt die Ergebnisse der Wassermessungen dar, die nach Zugabe von 0 (Kontrolle), 25 und 50 mg Benzocain/l Wasser erzielt wurden. Die Zugabe von Benzocain in den gewählten Konzentrationen veränderte nur die pH-Werte, die mit steigenden Konzentrationen von 7.73 (Kontrolle) auf 7.90 (50 mg/l) zunahmen.

**Tabelle 18:** Veränderungen der Wasserqualitätsparameter in Abhängigkeit von der Benzocain-Konzentration. Wassertemperatur 13 °C. Es sind die Minimal- und Maximalwerte von 5 Wasserproben dargestellt.

Wasserparameter	0 mg Benzocain/l	25 mg Benzocain/l	50 mg Benzocain/l
pH-Werte	7,73 - 7,76	7,79-7,81	7,85-7,90
Alkaliät [mmol/l]			
m-Wert	3,9-4,0	3,9-4,0	3,9-4,0
p-Wert	0,0	0,0	0,0
Gesamthärte [° dH]	13,2-13,4	13,1-13,4	13,3-13,4

° dH      Deutscher Härtegrad

m-Wert    Säurekapazität bis pH-Wert 8,2

p-Wert    Säurekapazität bis pH-Wert 4,3

Für die Tiere mit einem Körpergewicht (KGW) zwischen 400 und 500 g konnten bei Betäubung mit 25 mg Benzocain/l nach 2 bis 3 Minuten eine Störung der Gleichgewichtslage beobachtet werden. Nach 10 bis 12 Minuten wurden nach Herausnehmen aus dem Betäubungsbad noch gering- bis mittelgradige Abwehrbewegungen festgestellt. Nach 15 bis 20 Minuten konnte die Blutentnahme erfolgen. Bei Verwendung von 50 mg/l Benzocain lagen die Tiere nach 50 Sekunden in Seiten- oder Rückenlage, das Blut konnte nach 5 bis 7 Minuten ohne Abwehrbewegungen abgenommen werden. Die nachfolgende Betäubung im selben Wasserbad (50 mg Benzocain/l ) verzögerte die Zeitdauer bis zum Erreichen des III/1 bzw. III/2 Stadiums um 5 bis 7 Minuten. Die übrigen Zeiten und Betäubungsstadien sind Tabelle 18 zu entnehmen. Für die Tiere mit einem Körpergewicht (KGW) zwischen 1000 und 1300 g verlängerte sich die Zeitdauer im Vergleich zu den 400 - 500 g schweren Fische je nach Narkose- bzw. Anästhesiestadium um 1,5 bis 3 Minuten (Tabelle 19; S. 116).

Tabelle 19 und 20 (S. 116) stellen die Ergebnisse der Versuche sowie die Zuordnung der Narkosestadien nach STOSKOPF (1993) detailliert dar.

**Tabelle 19:** Betäubungsstadien in Abhängigkeit von der Benzocainkonzentration für Bachforellen mit einem Körpergewicht zwischen 400 und 500 g und Zuordnung zu den Narkose- und Anästhesiestadien nach STOSKOPF (1993). Angegeben ist die Zeitdauer in **Minuten** für das Erreichen der verschiedenen Stadien.

Verhalten	Zeitdauer 50 mg/l	Zeitdauer bei wiederholter Betäubung mit 50 mg/l	Zeitdauer 25 mg/l	Betäubungs-Stadien nach STOSKOPF (1993)
Rücken- oder Seitenlage	0,5 - 0,8	1,5	2,0 - 2,5	II/1 Leichte Narkose
Merkliche Abnahme der Ventilationsfrequenz	2 - 3	5,0	3,5 - 4,0	II/2 Tiefe Narkose
Merkliche Reduktion der Abwehrbewegungen auf externe Stimuli	3,5 - 4,0	8	10 - 12	II/2 bis III/1 Leichte Anästhesie
Keine oder nur geringgradige Abwehrbewegungen auf externe Stimuli	5 - 7	12	15 - 20	III/1 bis III/2 Starke Anästhesie

**Tabelle 20:** Betäubungsstadien in Abhängigkeit von der Benzocainkonzentration für Bachforellen mit einem Körpergewicht zwischen 1000 und 1300 g und Zuordnung zu den Narkose- und Anästhesiestadien nach STOSKOPF (1993). Angegeben ist die Zeitdauer in **Minuten** für das Erreichen der verschiedenen Stadien.

Verhalten	Zeitdauer 50 mg Benzocain/l Wasser	Betäubungs-Stadien nach STOSKOPF (1993)
Rücken- oder Seitenlage	2 - 3	II/1 Leichte Narkose
Merkliche Abnahme der Ventilationsfrequenz	5 - 6	II/2 Tiefe Narkose
Merkliche Reduktion der Abwehrbewegungen auf externe Stimuli	6 - 7	II/2 bis III/1 Leichte Anästhesie
Keine Abwehrbewegungen auf externe Stimuli	8 - 10	III/1 bis III/2 Starke Anästhesie

#### 4.1.2 BLUTENTNAHME

Bei der Blutentnahme durch Herzpunktion wurde bei den kleinen Fischen bis 100 g KGW nicht in jedem Fall das Herz sofort getroffen, so daß in diesem Falle kein Blut gewonnen werden konnte (Kanülengröße 0,45 mm). Einige der Fische verhielten sich nach Zurücksetzen in das Frischwasser über mehrere Tage apathisch. Nach diagnostischer Tötung mit einer dreifachen Überdosis des Betäubungsmittels und Durchtrennung des Rückenmarks war nach der Sektion

geronnenes Blut sichtbar, das die gesamte Herzhöhle ausfüllte. Bei den schwereren Fischen (200 bis 500 g KGW) und der Anwendung von Kanülen mit 0.55, 0.7 oder 0.9 mm Durchmesser konnten derartige Befunde nicht diagnostiziert werden. Nur selten führte die Herzpunktion zu Nachblutungen. Wurde das Herz sofort getroffen, konnten innerhalb einer Minute etwa 1 ml Blut gewonnen werden.

Die Blutentnahme aus der A. et V. caudalis war im Vergleich zu der Herzpunktion schwieriger zu handhaben. Oftmals traten Nachblutungen auf, die nach etwa 2 bis 3 Minuten zum Stillstand kamen. Bei der von lateral durchgeführten Blutentnahme wurden oftmals die Wirbelkörper, Hämalbögen oder das Rückenmark getroffen, bei der von ventral durchgeführten Blutentnahme die Hämalbögen oder Wirbelkörper. Beobachtungen zeigten, daß unabhängig vom gewählten Kanüldurchmesser bei vielen Tieren nach etwa einer Woche Veränderungen des Schwanzstils und des caudalen Rumpfbereiches auftraten: diese Bereiche nahmen eine verwaschen dunkelrote Färbung an mit darin unregelmäßig verteilten weiß-gelblichen Bezirken. In den zentralen Bezirken und dem Randbereich waren weißlichgraue, wattebauschartige Auflagerungen sichtbar. Die Tiere sonderten sich ab und lagen ruhig am Boden des Aquariums. Nach Tötung der Tiere ergab die makroskopische Untersuchung eine Ablösung der Schleimschicht und der Schuppen in diesen Bereichen. Von Nachteil war zudem die lange Zeitdauer der Blutentnahme, etwa 2 bis 3 Minuten wurden für die Gewinnung von 1 ml Blut benötigt.

Die Blutentnahme aus dem D.c. sinister war im Vergleich zu den anderen Entnahmemethoden schnell und einfach durchzuführen, je nach Größe des Fisches konnten innerhalb einer Minute bis zu 10 ml Blut gewonnen werden. Das Verletzungsrisiko war im Vergleich zur Herzpunktion sehr gering. Langzeitbeobachtungen ergaben, daß an den Kiemen oder der Branchialmembran bei den Tieren keine Verletzungen auftraten. Eine Nachblutung konnte im Gegensatz zur Blutentnahme aus der A. et V. caudalis oder bei der Herzpunktion nicht beobachtet werden. Eine ausreichende Betäubung der Fische und Fixierung der Nadel mit einer Pinzette war bei dieser Form der Blutentnahme notwendig, da sich durch Spontanbewegungen des Fisches die Kanüle oftmals verlagerte und so der Blutfluß zum Stillstand kam. Bei der Blutentnahme aus dem D.c. muß darauf geachtet werden, daß die Tiere nicht vorher gefüttert werden. Es besteht die Möglichkeit, daß die Fische erbrechen, so daß eine sterile Blutentnahme durch Verschmutzung der Branchialmembran nicht durchgeführt werden kann.

#### 4.1.3 ERMITTLUNG DER HEPARINKONZENTRATION FÜR DIE HEMMUNG DER BLUTGERINNUNG

Die Versuche sollten zeigen, welche Heparinkonzentrationen für eine vollständige Hemmung der Blutgerinnung notwendig sind. Wie Tabelle 21 (S. 118) zeigt, konnte nach Zugabe ab 30 µl Heparin, entsprechend einer Konzentration von 0,24 mg/ml Blut (41 USP-

units/ml) in der Endkonzentration eine antikoagulatorische Aktivität ermittelt werden, die über 6 Stunden anhielt. Erkennbar war dies an einem Heraustropfen des Blutes aus der Kapillare sowie an einer Verhinderung der Koagulatbildung bzw. Strangbildung zwischen den abgebrochenen Kapillarenden.

**Tabelle 21:** Blutgerinnung in Abhängigkeit von der Heparinkonzentration und Zeit. Es wurde das Blut von 6 Bachforellen untersucht. Haltung der Tiere bei 13 bis 15°C im Wasserdurchlaufsystem, Inkubation bei Raumtemperatur.

Heparin-Konzentration [mg bzw. USP-u/ml Blut]	Inkubationsdauer in Minuten					
	30	60	120	180	240	360
0/0	+	+	+	+	+	+
0,04/6,8	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
0,08/13,6	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
0,16/27,2	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)
0,24/40,8	-	-	-	-	-	-
0,32/54,4	-	-	-	-	-	-
0,40/68,0	-	-	-	-	-	-
0,48/81,6	-	-	-	-	-	-
0,56/95,2	-	-	-	-	-	-
0,64/108,8	-	-	-	-	-	-
0,72/122,4	-	-	-	-	-	-
0,80/149,6	-	-	-	-	-	-

USP-u = U.S. Pharmacopeia-units

- Keine Strangbildung, Heraustropfen des Blutes aus der Kapillare: vollständige Hemmung der Blutgerinnung.
- (+) Keine Strangbildung, langsam-zähflüssiges Fließen des Blutes in der Kapillare.
- + Strangbildung zwischen den Kapillarenden, kein Herausfließen des Blutes aus der Kapillare: vollständige Blutgerinnung.

#### 4.1.4 BLUTZELLZÄHLUNG

##### 4.1.4.1 pH-WERTE UND OSMOLALITÄTEN DER VERDÜNNUNGSLÖSUNGEN

Tabelle 22 (S. 119) stellt die pH-Werte sowie die Osmolalität der einzelnen Blutverdünnungslösungen dar.

Die Blutverdünnungslösungen nach **Hendrick** und **Hunn** (Originalrezeptur nach HESSER 1960 bzw. HUNN et al. 1992) besaßen pH-Werte von etwa 2,3. Die Osmolalität der Hunn'schen Lösung betrug 520 mosm/kg, die der Lösung nach Hendrick konnte mit dem Osmometer nicht gemessen werden, lag also über 1600 mosm/kg. Die Werte für die **modifizierte Hunn'sche**

Differenzierungslösung, die Formaldehyd und Natriumcitrat enthielt, lagen mit pH-Werten von 4,32 höher bzw. mit einer Osmolalität von 920 mosm/kg niedriger als die der Originallösung. Bei der nach **Dacies** angesetzte Färbelösung (Originalrezeptur nach BLAXHALL und DAISLEA 1973) konnte ein pH-Wert bzw. eine Osmolalität von 7,12 bzw. 490 mosm/kg ermittelt werden, bei der mit Phosphatpuffer angesetzten bzw. eingestellten **modifizierten Dacies**-Lösung Werte von 7,22 und 325 mosm/kg.

Die Lösung nach **Natt-Herrick** (OIDTMANN 1994) besaß einen pH-Wert von etwa 7,5 und eine Osmolalität von 330 mosm/kg. Die nach **Shaw** (SHAW 1930) zusammengesetzte Farblösung zeigte nach 1:1 Mischung der Lösungen A und B einen pH-Wert von 7,60 bei einer Osmolalität von 342 mosm/kg.

**Tabelle 22:** pH-Werte und Osmolalität der für die Blutzellzählung verwendeten Verdünnungslösungen.

Verdünnungslösungen	pH-Wert	Osmolalität [mosm/kg]
Dacies (modifiziert)	7,22	325
Dacies (Originalrezeptur)	7,12	490
Dacies ohne Formalin	7.03	490
Dacies ohne Brillantkresylblau	7.14	490
Hendrick	2,30	> 1600
Hunn (modifiziert)	4,32	920
Hunn (Originalrezeptur)	2,33	520
Natt-Herrick	7,47	330
Shaw, Lösung A	4,64	307
Shaw, Lösung B	8,13	425
Mischung aus A und B	7,60	342
Phosphatpuffer, 0.01 M	7,04	24

#### 4.1.4.2 FÄRBERISCHE EIGENSCHAFTEN UND MORPHOLOGIE DER BLUTZELLEN

##### 1. Blutverdünnungslösung nach Hendrick (HESSER 1960)

Es waren wenige schmale und kleine Zellen von ovaler Gestalt sichtbar, daneben konnten überwiegend sehr kleine Zellen ("Mikrozyten") erkannt werden. Infolge der Kleinheit der Zellen konnte das Zytoplasma oftmals nicht vom Zellkern abgegrenzt werden. Sehr selten waren größere und kreisrunde, schwach im Zytoplasma granulierte Zellen erkennbar. Auffallend war das Vorkommen von Zellen, die eine stachelbeerartige Form aufwiesen.

Eine klare Unterscheidung in Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten konnte aufgrund der Kleinheit der Zellen und der dadurch unklaren Morphologie nicht getroffen werden.

## 2. Blutverdünnungslösung nach Hunn (HUNN et al. 1992)

Analog der Verwendung der Hendrick'schen Lösung konnten aufgrund des Vorkommens von "Mikrozyten" die Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten nicht voneinander abgegrenzt werden. Die Zellen stellten sich sehr klein dar, ein Übergang des Zellkerns zum Zytoplasma war aus diesem Grunde nicht erkennbar. Der Hintergrund sowie die Zellen selbst waren intensiv grün angefärbt, eine Zählung der Blutzellen entfiel daher.

Mit der **modifizierten** Hunn'schen Färbelösung konnten folgende Zellen unterschieden werden:

Erythrozyten: große Zellen von ovaler Form, mit dunkelgrünem, zentral liegendem Kern und geringgradig heller grün erscheinendem homogenem Zytoplasma.

Thrombozyten: im Gegensatz zu den Erythrozyten kleine Zellen von länglicher Gestalt mit dunkelgrünem Kern und geringfügig heller grün erscheinendem Zytoplasmasaum. Die ovalen Zellen stellten die größten Formen innerhalb dieser Zellreihe dar und besaßen einen breiteren Zytoplasmasaum, der granuliert erschien.

Leukozyten: runde oder ovale Zellen mit dunkelgrünem Kern, mit mehr oder weniger schmal-hellgrünem Zytoplasmasaum und wechselnder Größe (kleiner als Erythrozyten).

## 3. Verdünnungslösung nach Shaw (SHAW 1930)

Mit der Färbelösung nach Shaw konnten folgende Zellen unterschieden werden:

Erythrozyten: große Zellen von ovaler Form, mit ziegelrotem, zentral liegendem Kern und blaßrosa homogen angefärbtem Zytoplasma.

Thrombozyten: Zellen mit langgestreckter oder ovaler Gestalt und kräftig violetter, exzentrisch oder in der Mitte liegendem Kern. Das Zytoplasma erschien ebenfalls von kräftig violetter Farbe. Es konnten runde, ovale, tropfenartige, langgestreckte oder Zellen mit langen und spitz zulaufenden Fortsätzen unterschieden werden.

Leukozyten: runde oder ovale Zellen mit hellvioletter Zytoplasma und hellvioletter, zentral liegendem Kern.

Alle Zellen hoben sich deutlich vom hellrosanen Hintergrund ab, der Übergang Kern zu Zytoplasma war klar abgesetzt.

#### 4. Verdünnungslösung nach Natt-Herrick (OIDTMANN 1994)

Mit der Färbelösung nach Natt-Herrick ließen sich folgende Zellen unterscheiden:

Erythrozyten: sehr große Zellen mit hellvioletter Kern und blaßgelblich erscheinendem, homogenem Zytoplasma.

Thrombozyten: Zellen mit hellvioletter, zentral oder exzentrisch liegendem Kern und granuliertem, hellvioletter Zytoplasma. Die Formen variierten von rund, oval, tropfenartig, langgestreckt oder es waren Zellen mit langen und spitz zulaufenden Fortsätzen sichtbar.

Leukozyten: runde bis ovale und einheitlich dunkelviolett angefärbte Zellen ohne Granulation

Alle Zellen hoben sich vom schwach hellviolett gefärbten Hintergrund klar erkennbar ab. Der Kern-Zytoplasma-Übergang war scharf abgesetzt.

#### 5. Dacie´sche Blutverdünnungslösung (Originallösung nach BLAXHALL und DAISLEA 1973 und modifizierte Lösung)

Folgende Zellen konnten mit **beiden** Differenzierungslösungen unterschieden werden:

Erythrozyten: große Zellen von ovaler Form, mit hellblauem und zentralliegendem Kern und grünblau angefärbtem homogen erscheinendem Zytoplasma.

Erythroblasten: ähnliche Anfärbung wie die Erythrozyten, jedoch erschien das Zytoplasma granuliert, die Zellen waren kleiner als die Erythrozyten.

Thrombozyten: im Gegensatz zu den Erythrozyten kleine Zellen mit langgestreckter, ovaler, tränentropfenartiger oder zitronenförmiger Gestalt mit violetter Nucleus und hellblauem und schmalen Zytoplasmasaum. Die ovalen Zellformen stellten die größten Thrombozytenformen dar und besaßen einen breiteren Zytoplasmasaum, der granuliert und heller blau eingefärbt als die anderen Formen erschien. Oft waren Zellen mit sehr langen, nadelspitz auslaufenden Zytoplasmafortsätzen erkennbar.

Leukozyten: überwiegend runde Zellen mit dunkelblauem Kern und mit mehr oder weniger schmalen hell- bis dunkelblauem Zytoplasmasaum.

Alle Zellen hoben sich vom lichte hellblauen Hintergrund klar ab. Der Kern-Zytoplasma-Übergang war scharf abgesetzt.

Bei der Verwendung der Dacie´schen Verdünnungslösung ohne Zusatz von Formalin und mit einer auf 490 mosm/kg eingestellten Osmolalität konnten die Leukozyten nicht von den Thrombozyten differenziert werden. Es waren neben den großen und ovalen Erythrozyten

überwiegend kleine Zellen von kommaförmiger oder eckig-deformierter (polygonal) Gestalt erkennbar oder Zellen mit kleinblasenartigen Plasmaaufreibungen an der Zelloberfläche sichtbar. Die Zellfärbung war einheitlich hellblau.

Bei Verdünnung der Zellen mit der ohne Brillantkresylblau (+ Formalin) zusammengesetzten Lösung mit einer Osmolalität von 490 mosm/kg konnten, ähnlich der Anfärbung mit der Dacie'schen Originallösung, die einzelnen Zellarten bzw. Formen unterschieden werden. Nach Zusatz einer 100-fach konzentrierten Brillantkreyslblaulösung (Endkonzentration 0.01 %) wurden die Leukozyten und Thrombozyten tiefblau angefärbt, der Zellkern der Erythrozyten erschien schwachhellblau.

#### 4.1.4.3 VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER ZELLZAHL FÜR DREI VERSCHIEDENE DIFFERENZIERUNGSLÖSUNGEN

Tabelle 23 stellt vergleichend die Zählergebnisse dar, die für die Differenzierungslösungen nach **Natt-Herrick** (OIDTMANN 1994) und **Dacies** (modifizierte Lösung nach BLAXHALL und DAISLEA 1973 und Original-Lösung) gewonnen wurden. Um ein vergleichbares Maß für die Genauigkeit der Zählung zu erhalten, wurden die Einzelzählungen prozentual auf die Summe der Zellanzahl bezogen, die bei Anwendung aller drei unterschiedlichen Färbelösungen ermittelt wurden. In Tabelle 23 sind die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen sowie die prozentuale Verteilung dargestellt, die für 15 Fische ermittelt wurden.. Im Anhang (Tabelle A-9; S. 246) sind die Einzelwerte angegeben. Die einfache Varianzanalyse ergab auf dem 5 %-Niveau keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zählergebnissen.

**Tabelle 23:** Mittelwerte der absoluten Zellzahlen sowie die prozentuale Verteilung bei Verwendung von drei unterschiedlichen Verdünnungslösungen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung von 15 Proben.

	Natt-Herrick (OIDTMANN (1994))	Dacies (Originallösung nach BLAXHALL und DAISLEA 1973)	Dacies (modifiziert)
Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /µl]	1,203 ± 0,185 33,41 ± 2,76 %	1,175 ± 0,165 32,05 ± 3,00 %	1,215 ± 0,138 33,89 ± 2,24 %
Leukozyten [x10 <sup>4</sup> /µl]	2,524 ± 0,645 34,46 ± 3,01 %	2,458 ± 0,748 33,19 ± 3,29 %	2,366 ± 0,553 32,34 ± 3,98 %
Thrombozyten [x10 <sup>4</sup> /µl]	1,856 ± 0,362 33,20 ± 2,21 %	1,908 ± 0,390 34,05 ± 2,76 %	1,845 ± 0,443 32,74 ± 2,72 %

#### 4.1.5 DIFFERENTIALBLUTBILD

Die Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen bzw. eine differenzierte Anfärbung der Zellen konnte im Falle der **Pappenheimfärbung** mit einer 1,5 minütigen Inkubation des Blutausrichs mit einer konzentrierten May-Grünwald-Lösung und einer 1 : 50 Verdünnung der Giemsalösung mit phosphatgepuffertem A. bidest., dessen pH-Wert zwischen 6,5 und 6,8 lag, erzielt werden.

Die Ausdehnung der Färbezeit mit May-Grünwald von 1 auf 3 oder 4 bzw. 3 auf 5 Minuten brachte keine Verbesserung der Anfärbbarkeit; nach 5 Minuten konnte eine Zunahme von zerrissenen Blutzellen festgestellt werden.

Lagen bei der verdünnten Giemsalösung die pH-Werte über 6,9, nahm das Zytoplasma der Erythrozyten eine graurosa Färbung an, wobei mit steigenden pH-Werten der Giemsalösung bis 7,4 die Farbe von graurosa - graublau bis nach dunkelblau wechselte. Die anderen Zellen erschienen bei nahezu allen gewählten Verdünnungen der Giemsalösung verwaschen angefärbt oder überfärbt, so daß eine genaue Trennung zwischen Zytoplasma und Zellkern nicht getroffen werden konnte und so eine sichere Differenzierung nicht möglich war.

Bei Verwendung von verdünnten Giemsalösungen von 1:10 und 1:20 und Färbezeiten zwischen 30 und 60 Minuten waren die Blutausrichs überfärbt: mit steigenden Konzentrationen und Färbezeiten konnte ein gradueller Anstieg der Farbintensität von Zytoplasma und Zellkern beobachtet werden. Nach einer Färbezeit von 40 Minuten und einer 1 : 10 Giemsa-Verdünnung war die Grenze zwischen Zellkern und Zytoplasma verwaschen und undeutlich zu sehen, zytoplasmatische Einschlüsse (Granulation) konnten nicht mehr erkannt werden.

Bei Giemsa-Verdünnungen von 1:30, 1:40 und 1:50 war mit steigenden Färbezeiten von 15, 20, 25 und 30 Minuten ein stufenweiser Anstieg der Farbintensität von Zytoplasma und Kern bei allen Zellen erkennbar. Die Grenzen zwischen Zellkern und Zytoplasma waren bei einer 25 - 30 minütigen Giemsa-Färbung und einer 1:30 bis 1:50-Verdünnung klar abgesetzt, Granulationen im Zytoplasma deutlich sichtbar und die Farbintensität aller Zellbestandteile kräftig.

Tabelle 24 (S. 124) stellt die Ergebnisse der pH-Messungen dar, die von der Giemsa-Stammlösung (pH 7,00), ihrer Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:50, der May-Grünwald-Stammlösung (pH 7,8) und ihrer 1:1-Verdünnung gemessen wurden. Mit Erhöhung des Pufferzusatzes fielen die pH-Werte, erreichten aber nicht die von der Pufferlösung vorgegebenen Werte.

**Tabelle 24:** pH-Werte der Giemsa- und May-Grünwald-Stammlösungen sowie deren Verdünnungen mit Phosphatpuffer (0,01 M), pH 6,5 bzw. 6,8.

	pH-Werte	
	Verdünnung mit Phosphatpuffer, pH 6,5	Verdünnung mit Phosphatpuffer, pH 6,8
Giemsa-Verdünnungen		
1:10	6,61	6,95
1:20	6,59	6,90
1:30	6,57	6,88
1:40	6,56	6,86
1:50	6,56	6,86
May-Grünwald-Verdünnung		
1:1	7,45	7,67

Bei der Anfärbung der Blutausstriche mit **Giemsalösung** alleine konnten ähnliche Ergebnisse wie bei der Pappenheimfärbung erzielt werden. Das Zytoplasma der Erythrozyten erschien im Gegensatz zur Pappenheimfärbung schwachrosa eingefärbt.

Bei der Anfärbung des Bachforellenblutes nach **Romanowski**, die eine 5-minütige Fixierung der Zellen mit Methanol vor den Färbeschritten vorsah, wurde ein Zerreißen der Zellen beobachtet; eine Reduzierung der Inkubationszeit führte bei der Behandlung mit den Färbelösungen zu einer weitgehenden Abschwemmung der Blutzellen vom Objektträger.

Mit der **Pappenheimfärbung**, die eine 1.5 minütigen Inkubation mit einer konzentrierten May-Grünwald-Lösung und einer 1 : 50 Verdünnung der Giemsalösung mit phosphatgepuffertem A. bidest. (pH-Wert zwischen 6.5 und 6.8) beinhaltete, wurden folgende Färbeergebnisse erzielt:

#### a.) ERYTHROZYTEN

Oval, lichterrosa gefärbtes (azidophiles) Zytoplasma mit einem ovalen, zentral gelegenen Kern mit dichtem und dunkel- bis heller rotvioletter Chromatin. Das Zytoplasma war homogen, selten wies es eine basophile Tüpfelung auf.

ERYTHROBLASTEN: abgerundete Zellen mit schwach bis mittelgradig ausgeprägter Basophilie des Zytoplasmas, das feingranuliert erschien.

## b.) THROMBOZYTEN

Es waren kleine, rund geformte Zellen mit dunkelviolettem Kern und schmalem, ungefärbtem oder schwach hellblau angefärbtem Zytoplasmasaum sichtbar. Daneben kamen größere Zellen von runder bis ovaler, spindelförmiger oder tropfenartiger Gestalt vor, die ein licht- bis blaßblau angefärbtes Zytoplasma besaßen. Selten waren lange fadenförmige Zytoplasmafortsätze erkennbar. Sehr selten waren staubfeine azurophil angefärbte Granula im Zytoplasma sichtbar. Es überwogen die runden bis oval geformten Thrombozyten.

## c.) LYMPHOZYTEN

Überwiegend kleine, runde Zellen mit schmalem, homogen bis feinschollig erscheinendem und kräftig hell bis dunkelblau angefärbtem Zytoplasmasaum. Selten erschienen die Zellen zerfetzrandig (Pseudopodien). Der ebenfalls kräftig gefärbte dunkelviolette, rund geformte Kern war häufig eingekerbt. Die Lymphozyten zeigten kompaktes und kräftig angefärbtes Chromatin.

Neben den überwiegend kleinen Lymphozyten waren größere Formen sichtbar, deren Kern mit aufgelockertem, dunkelviolettem Chromatin etwa 70 - 80 % des Zellvolumens einnahm. Der Zellkern besaß eine zentrale, selten exzentrische Lage. Sein oftmals grobscholliges Zytoplasma erschien hellblau, selten dunkelblau. Gelegentlich waren Pseudopodien sichtbar.

## d.) MONOZYTEN

Sehr große Zellen (etwa Erythrozytengröße) mit blauvioletterm und exzentrisch liegendem Zellkern, der vielgestaltig erschien. Die Zellkernform variierte von oval, eingekerbt (nierenförmig), tief eingebuchtet (hufeisenförmig), gefaltet bis hirnförmig und besaß ein feiner strukturiertes Chromatin als das der Lymphozyten. Das Zytoplasma erschien lichthellblau und besaß oftmals helle Flecken ("white spots").

## e.) GRANULOZYTEN

### **segmentkerniger Granulozyt**

Runde Zellen mit 3- bis 5-fach gelapptem, purpurrotem Zellkern, in seltenen Fällen besaß er ein "bandartiges" Erscheinungsbild. Das Zytoplasma erschien lichthellblau, sehr selten schwach hellrosa.

### **stabkerniger Granulozyt:**

Runde Zellen mit ovalem, purpur-rotem und exzentrisch liegendem Kern, der oftmals tiefeingekerbt erschien. Das Zytoplasma stellte sich dunkelblau dar.

### **Metagranulozyt:**

Schwache Basophilie des Zytoplasmas mit bohnenförmigem, dunkelblauem und exzentrisch liegendem Zellkern.

### **Granuloblast:**

Das Zytoplasma erschien dunkelblau, der Zellkern war von ovaler Gestalt und erschien dunkelviolet.

## e.) EOSINOPHILE GRANULOZYTEN (eosinophile granuläre Zellen, EGZ)

Zellen mit schwach angefärbtem, zentral oder exzentrisch gelegenem, hellrot bis hellviolett erscheinendem Zellkern mit stark aufgelockertem Chromatin. Das Zytoplasma erschien schwach hellrosa bis hellgraublau mit wenigen azidophilen Granula.

In einem Versuchsansatz wurde die Anfärbbarkeit der Zellen in Abhängigkeit von dem Alter des Blutes untersucht (Lagerung über Nacht bei 4°C).

Bei der Färbung der Zellen mit der Lösung nach Dacies fiel eine Zusammenballung von Zellen auf, wobei eine Unterscheidung in Leuko- oder Thrombozyten nur schwer getroffen werden konnte. Die übrigen Leuko- oder Thrombozyten waren einheitlich dunkelblau angefärbt, oftmals traten Zellen mit flach eingekerbttem oder eckig-deformiertem Zellrand auf. Der Übergang zwischen Zellkern und Zytoplasma war nicht mehr oder nur noch schwer zu erkennen.

In der Pappenheimfärbung wiesen die Erythrozyten ein hellblaues, mit rosa Einschlüssen oder Vakuolen durchsetztes Zytoplasma auf. Auffallend war die große Zahl zusammengelagerter Thrombozyten. Oftmals waren im Zytoplasma der Granulo- und Monozyten Vakuolen zu sehen.

Die über nacht gelagerten Granulozyten erschienen im Gegensatz zu frischem Blut klein, der Zellkern war dunkelblau angefärbt, oftmals zerteilt oder im Zytoplasma waren sehr große, eosinophil angefärbte Granula zu erkennen. Der Übergang Kern-Zytoplasma erschien verwaschen.

#### 4.1.6 VERGLEICH ZWEIER AUSWERTUNGSVERFAHREN FÜR DIE BESTIMMUNG DER LYMPHO- UND THROMBOZYTENANZAHL

Tabelle 25 (S. 128) stellt die Ergebnisse der Zellzählung dar, die mit zwei verschiedenen Verfahren (Bestimmung der Zellzahl in der Neubauerkammer und an Hand des Differentialblutbildes) errechnet bzw. bestimmt wurden.

Das Verhältnis der Zellzahlen des 1. und 2. Verfahren betrug im Mittel für die Leukozyten  $1.01 \pm 0.16$ , für die Thrombozyten  $1.04 \pm 0.26$ . Die Berechnung der absoluten Leukozyten- bzw. Thrombozytenanzahl anhand des Differentialblutbildes (Verfahren 1) lieferte also im Vergleich zur Zählung in der Neubauerkammer nur geringfügig höhere Werte. Die Überprüfung mittels des t-Tests für verbundene Stichproben ergab auf dem 5 % Niveau keinen signifikanten Unterschied.

**Tabelle 25:** Zählergebnisse nach Verfahren 1 und 2.

Nr.	Verfahren 1 (Schätzung aus dem Differentialblutbild)		Verfahren 2 (Schätzung aus Hämozytometer)		Verhältnis von Verfahren 1 zu 2  1. Wert Leukozyten 2. Wert Thrombozyten
	Leukozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Thrombozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Leukozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Thrombozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	
1	1,63	1,04	1,08	1,60	1,51 0,65
2	2,69	1,74	2,15	2,28	1,25 0,76
3	3,87	2,06	3,25	2,68	1,19 0,77
4	5,85	1,98	4,63	3,20	1,26 0,62
5	1,84	1,46	1,70	1,60	1,08 0,91
6	2,65	1,49	2,48	1,66	1,07 0,90
7	2,85	4,18	4,48	2,55	0,64 1,64
8	2,11	1,72	1,98	1,60	1,07 1,08
9	3,07	1,86	3,58	1,35	0,86 1,38
10	3,54	1,39	3,03	1,38	1,17 1,01
11	2,90	2,13	2,73	2,30	1,06 0,93
12	2,72	2,48	2,98	2,23	0,91 1,11
13	1,43	2,44	1,75	2,13	0,82 1,15
14	3,86	2,09	4,25	1,70	0,91 1,23
15	2,42	1,55	2,63	1,35	0,92 1,15
16	5,36	2,25	5,38	2,23	1,00 1,01
17	1,72	1,22	1,80	1,13	0,96 1,08
18	1,90	0,83	1,65	1,08	1,15 0,77
19	2,58	1,80	2,85	1,53	0,91 1,18
20	2,06	0,77	2,05	0,78	1,00 0,99
21	2,12	1,51	2,60	1,03	0,82 1,47

#### 4.1.7 OSMOTISCHE RESISTENZ DER ERYTHROZYTEN

Bei den Untersuchungen zur Fragilität der Bachforellenerythrozyten wurde eine Minimalresistenz von 0,43 % NaCl ermittelt, die Maximalresistenz betrug 0,28 %. Mit der photometrischen Messung der Hämolyse konnte im Vergleich zu der optischen Beurteilung eine genauere Ermittlung der Maximalresistenz erzielt werden. Bei einer optischen 3+ Bewertung (vollständige Hämolyse) stiegen die Extinktionswerte weiterhin von 0,218 auf 0,680 an (Tabelle 26). Tabelle A-8 im Anhang (S. 240-245) stellt die Einzelergebnisse, Tabelle 26 die mittleren Werte der Minimal- und Maximalresistenz sowie die berechnete Resistenzbreite dar.

**Tabelle 26:** Osmotische Resistenz der Erythrozyten.

	Minimalresistenz [% NaCl bzw. mmol/l]	Maximalresistenz [% NaCl bzw. mmol/l]	Resistenzbreite [% NaCl bzw. mmol/l]
1	0,30/51	0,20/34	0,10/17
2	0,30/51	0,20/34	0,10/17
3	0,50/86	0,35/60	0,15/26
4	0,50/86	0,25/43	0,25/43
5	0,50/86	0,25/43	0,25/43
6	0,50/86	0,35/60	0,15/26
7	0,45/78	0,35/60	0,10/17
8	0,40/68	0,30/51	0,10/17
	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
	0,43 ± 0,09 % NaCl bzw. 74,00 ± 15,52 mmol NaCl	0,28 ± 0,07 % NaCl bzw. 48,13 ± 11,23 mmol NaCl	0,15 ± 0,07 % NaCl bzw. 25,75 ± 11,35 mmol NaCl

#### 4.1.8 BESTIMMUNG DES HÄMATOKRITWERTES

Bei Zentrifugationszahlen von 12500 U/min konnten nach 4 bis 8 Minuten konstante Hämatokritwerte ermittelt werden. Aus diesem Grunde wurde für die weiteren Untersuchungen eine Zentrifugationszeit von 10 Minuten gewählt. Tabelle 27 (S. 130) listet die in den Versuchen ermittelten Ergebnisse auf.

**Tabelle 27:** Hämatokritwerte in Abhängigkeit von der Zentrifugationszeit bei 12500 U/min.

Proben-Nr.	Hämatokritwerte in %									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Zeit [min]										
2	28	40	38	42	48	37	49	36	47	45
4	27	38	36	41	47	35,5	48	35	46	44
6	27	38	35	40	46,5	35	47,5	35	45	44
8	27	38	34	38	45	35	47	34	45	43
10	26	36	34	38	45	35	47	34	45	42
12	26	36	34	38	44	35	47	34	45	42
14	26	36	34	38	44	35	47	34	45	42
16	26	36	34	38	44	35	47	34	45	42

#### 4.1.9 ERMITTLUNG DER HÄMOGLOBINKONZENTRATIONEN

Tabelle 28 (S. 131) zeigt die Ergebnisse der Extinktionswerte der angesetzten Standard-Konzentrationen. Aus der Beziehung der Extinktionswerte (y-Achse, abhängige Variable) und der Konzentrationen (x-Achse, unabhängige Variable) wurde nach  $y = bx+a$  die lineare Beziehung (Regressionsgleichung)

$$y = 0,0222x + 0,0063$$

berechnet mit einem Korrelationskoeffizient R von 0,99808. Hierbei ist Y der Extinktionswert, X die Hämoglobin-Konzentration der Standard-Konzentrationen in g/100 ml Blut.

Die Hämoglobinkonzentration einer unbekanntes Probe wurde durch Einsetzen des gemessenen Extinktionswertes in die unten angegebene und umgeformte Gleichung ermittelt:

$$\text{Hb [g/100 ml]} = \frac{\text{Extinktionswert} - 0,0063}{0,0222}$$

**Tabelle 28:** Extinktionswerte der Standardhämoglobinkonzentrationen.

Proben- Nummer	Hämoglobin- Konzentration [g/100 ml]	Extinktionwerte der Standard-Konzentrationen bei 564 nm
1	29,1	0,660 0,625
2	23,3	0,555 0,525
3	19,8	0,434 0,441
4	15,8	0,346 0,359
5	11,6	0,261 0,271
6	9,9	0,259 0,230
7	7,4	0,180 0,182
8	4,6	0,105 0,112
9	2,8	0,066 0,065
10	1,4	0,026 0,030
11	0,0	0,000 0,000

Tabelle 29 (S. 132) zeigt die rechnerisch aus der Ausgleichsgeraden ermittelten und die durch Multiplikation mit dem Faktor 36,8 gewonnenen Ergebnisse der Hämoglobinkonzentrationen. Die Konzentrationen der aus der Eichgeraden ermittelten Werte lagen durchschnittlich um 15,61 % höher als die durch Multiplikation mit dem Faktor berechneten Werte. Der t-Test für verbundene Stichproben ergab auf dem 5 %-Niveau einen signifikanten Unterschied zwischen den Zählergebnissen.

**Tabelle 29:** Hämoglobinkonzentrationen, berechnet aus der Ausgleichsgeraden und an Hand der Multiplikation mit dem Faktor 36,8.

Extinktion bei 546 nm	Hämoglobinkonzentration [g/100 ml] berechnet aus der Ausgleichsgeraden	Hämoglobinkonzentration [g/100 ml] berechnet mit Faktor 36,8
0,197	8,59	7,25
0,208	9,09	7,65
0,215	9,40	7,91
0,163	7,06	6,00
0,217	9,49	7,99
0,226	9,90	8,32
0,200	8,73	7,36
0,201	8,77	7,40
0,173	7,51	6,37
0,209	9,13	7,69
0,202	8,82	7,43
0,226	9,90	8,32
0,158	6,83	5,81
0,195	8,50	7,18
0,204	8,91	7,51
	Mittelwert	Mittelwert
	8,71 ± 0,93	7,35 ± 0,76

#### 4.1.10 BEEINFLUSSUNG VERSCHIEDENER BLUTPARAMETER DURCH HEPARIN UND EDTA

##### 4.1.10.1 BEEINFLUSSUNG DURCH DAS EINGESETZTE HEPARINVOLUMEN

In Abhängigkeit von der zugesetzten Heparinmenge veränderten sich die Blut-pH-Werte, Hämoglobinkonzentrationen und Hämatokritwerte. Je höhere Heparinvolumina eingesetzt wurden, desto geringere Werte konnten für diese drei Blutparameter ermittelt werden. Tabelle 30 (S. 133) stellt die mittlere Abnahme der Blutwerte pro 10 µl Heparinlösung dar, die aufgrund der Steigung  $b$  der linearen Regressionsgleichung  $y = bx + a$  berechnet wurde; hierbei wurde der Mittelwert der Steigungen aus Blutproben von 6 Fischen ermittelt. Die pH-Werte nahmen im Mittel um 0,017 Einheiten, die Hämatokritwerte und Hämoglobinkonzentrationen im Mittel um 0,780 % bzw. 0,177 g/100 ml pro 10 µl zugesetzter Heparinmenge ab. Für die Osmolalität konnte aufgrund des geringen Korrelationskoeffizienten nur tendentiell eine mit Erhöhung der Heparinmenge beobachtete Abnahme festgestellt werden.

**Tabelle 30:** Abhängigkeit der Blut-pH-Werte, Hämoglobinkonzentrationen, Osmolalität und Hämatokritwerte vom eingesetzten Heparinvolumen. Die Steigung b stellt die durchschnittlichen Ab- bzw. Zunahmen der Blutparameter pro 10 µl zugegebener Heparinlösung dar. Als Maß für die Güte der Anpassung wurde der Korrelationskoeffizient R berechnet.

Blutparameter	Veränderung pro 10 µl Heparinzusatz	Korrelationskoeffizient R
pH-Werte	- 0,017 ± 0,030	- 0,812
Hämatokritwerte [%]	- 0,780 ± 0,12	- 0,933
Hämoglobinkonzentrationen [g/100 ml]	- 0,177 ± 0,024	- 0,884
Osmolalitäten [mosm/kg]	- 0,088 ± 0,096	- 0,217

#### 4.1.10.2 BEEINFLUSSUNG DES HÄMATOKRITWERTES UND DER OSMOLALITÄT DURCH EDTA UND HEPARIN

Für die Überprüfung der Hämatokritwert- und Osmolalitätsveränderungen durch EDTA und Heparin wurde genau 1 ml Blut verwendet. Bei der Anwendung von mit EDTA beschichteten Monovetten (1.60 mg/ml Vollblut) wurde der geringste Hämatokritwert ermittelt, er betrug im Mittel 35,5 %. Gegenüber dem ohne Antikoagulans gewonnenen Wert (Zentrifugation in nicht heparinisierten Kapillaren) konnte eine relative Reduktion um durchschnittlich 13,6 % ermittelt werden. Wurde Heparin in einer Endkonzentration von 41 USP-u/ml Blut verwendet, entsprechend 30 µl Heparin/ml Blut, wurden höhere Werte von durchschnittlich 37.7 % ermittelt. Die Reduktion gegenüber Nativblut betrug hier etwa 8 %. Bei Verwendung von heparinisierten Kapillaren wurde gegenüber dem Nativblut ein um etwa 6 % geringerer Hämatokritwert bestimmt (Tabelle 31; S. 134). Die Einzelwerte sind in Tabelle A-10 im Anhang (S. 249) angegeben.

Die einfache Varianzanalyse ergab auf dem 5 %-Niveau einen signifikanten Unterschied.

**Tabelle 31:** Veränderung der Hämatokritwerte in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulans und Art der Mikrohämatokrit-Kapillaren. Angegeben sind die Mittelwerte sowie Standardabweichungen der Absolutwerte und der prozentualen Abweichungen gegenüber des von Nativblut ermittelten Hämatokritwertes. Eingesetzt wurde genau 1 ml Vollblut.

Antikoagulans	Hämatokritwert [%]	Prozentuale Abweichung gegenüber dem Hkt ohne Verwendung eines Antikoagulans [%]
EDTA, Zentrifugation in nicht heparinisierten Kapillaren	35,50 ± 2,60	13,56 ± 4,41
Heparin, Zentrifugation in nicht heparinisierten Kapillaren	37,73 ± 2,73	8,17 ± 3,68
Nativblut: ohne Antikoagulans, Zentrifugation in heparinisierten Kapillaren	39,45 ± 2,02	6,56 ± 3,05
Nativblut: ohne Antikoagulans, Zentrifugation in nicht heparinisierten Kapillaren	41,18 ± 3,75	

Hkt = Hämatokritwert

Die höchste Osmolalität konnte bei Anwendung von EDTA als Antikoagulans (1.60 mg EDTA/ml Blut in Monovetten) ermittelt werden. Gegenüber der Serumosmolalität wurde hier eine Verminderung um etwa 11 % festgestellt, bei Verwendung von 30 µl Heparin pro 1 ml Blut (41 USP-units/ml Blut in der Endkonzentration) betrug die Reduktion durchschnittlich 1,7 % (Tabelle 32). Die Einzelwerte sind in Tabelle A-11 im Anhang (S. 249) angegeben.

**Tabelle 32:** Veränderung der Osmolalität in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulans. Angegeben sind die Mittelwerte sowie Standardabweichungen der Absolutwerte und die prozentuale Variation der Werte gegenüber der Serumosmolalität (Spalte 1). Eingesetzt wurde jeweils genau 1 ml Vollblut.

Serumosmolalität [mosm/kg]	Plasmaosmolalität (41 USP-units Heparin/ml Blut) [mosm/kg]	Variation [%]	Plasmaosmolalität (1,60 mg EDTA/ml Blut) [mosm/kg]	Variation [%]
328 ± 4	323 ± 4	1,72 ± 1,43	368 ± 7	10,99 ± 1,31

#### 4.1.10.3 VARIATIONEN DES HÄMATOKRITWERTES UND DER PLASMAOSMOLITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VOM BLUTVOLUMEN BEI EDTA-BLUT

Da die höchsten Veränderungen der Hämatokrit- bzw. Osmolalitätswerte bei Anwendung von EDTA festgestellt wurden, wurde in einem Versuchsansatz die Beeinflussung dieser Blutparameter in Abhängigkeit von der eingesetzten Blutmenge (0.5 bis 2.5 ml Blut) bei Verwendung von mit EDTA beschichteten Monovetten untersucht.

Mit zunehmender Blutmenge konnte eine Verminderung der Osmolalität sowie eine Steigerung des Hämatokritwertes ermittelt werden (Abbildung 6; Tabelle 33; S. 136). Die Hämatokritwerte nahmen mit Erhöhung der eingesetzten Blutmenge zu, erreichten jedoch nicht die Werte der Kontrollen. Wurden die ermittelten Werte zwecks besserer Vergleichbarkeit untereinander auf den Kontrollwert bezogen ("Variation" in Tabelle 33; S. 136), konnte eine prozentuale Reduktion von durchschnittlich 23 % bei 0,5 ml auf etwa 7 % bei 2.5 ml Blut berechnet werden. Die Kurven in Abb. 6 (S. 135), die die Abhängigkeit der Hämatokritwerte von der eingesetzten Blutmenge graphisch darstellen, zeigen einen anfänglich linearen Verlauf mit einer starken Steigung der Geraden. Mit Erhöhung der Blutmenge flachte der Kurvenverlauf jedoch ab (Plateauphase).

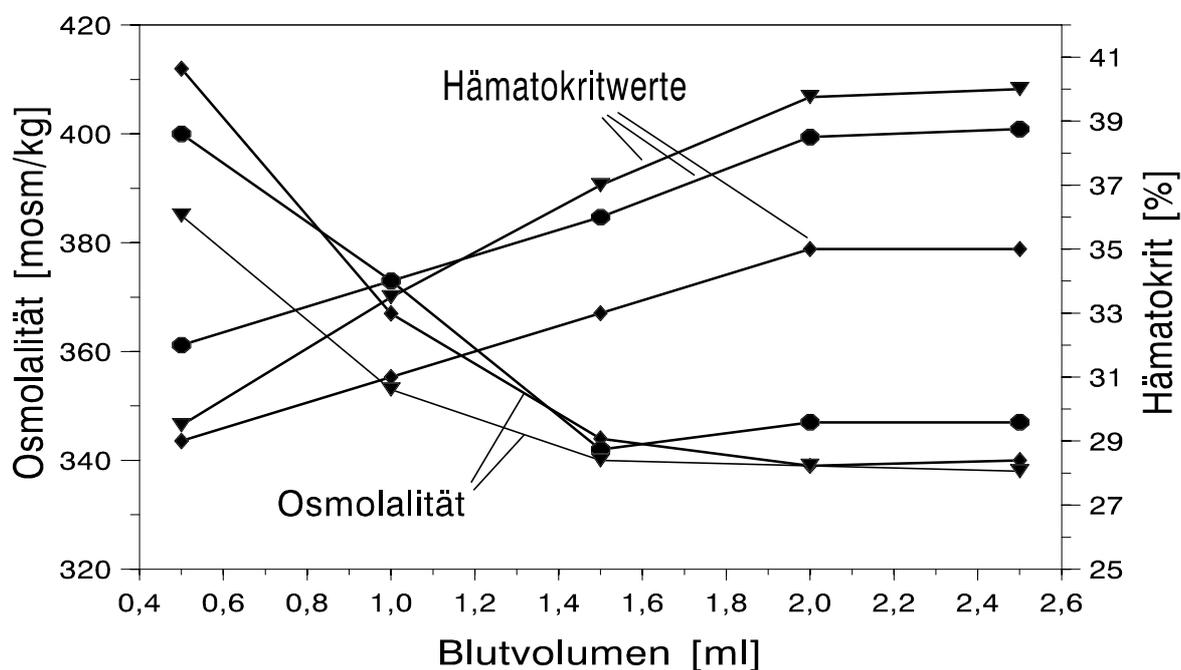


Abb.6: Abhängigkeit der Osmolalität und Hämatokritwerte vom eingesetzten Blutvolumen bei Verwendung von EDTA-Monovetten.

Gegenläufig verhielt sich die Plasmaosmolalität, sie nahm mit Erhöhung der eingesetzten Blutmenge ab, erreichte den Wert der Serumosmolalität jedoch nicht. Es wurde in ähnlicher Weise wie beim Hämatokritwert eine Reduktion der Werte gegenüber dem Kontrollwert berechnet. Auffallend ist, daß sich die Kurven in Abbildung 6 (S. 135) asymptotisch einem Wert nähern, demzufolge keine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten Blutmenge und des Hämatokritwertes bestand. Sie folgte einer Potenzfunktion nach  $y = a \cdot x^b$  mit der Steigung  $b = 1,088$  (Korrelationskoeffizient  $R = -0,90550$ ). Wurde A. bidest. in unterschiedlichen Mengen (siehe Tabelle 34; S. 137) zu den EDTA-beschichteten Monovetten gegeben und die Osmolalität bestimmt, konnte ein ähnlicher Kurvenverlauf bzw. eine ähnliche Funktion ermittelt werden.

**Tabelle 33:** Veränderung des Hämatokritwertes und der Osmolalität in Abhängigkeit von der eingesetzten Blutmenge bei Verwendung von EDTA. Angegeben sind die Absolutwerte sowie die prozentuale Variation gegenüber der Serumosmolalität bzw. gegenüber dem Hämatokritwert ohne Einsatz eines Antikoagulans ("Kontrollwerte").

Blutmenge [ml]	Hämatokrit [%]	Variation [%]	Osmolalität [mosm/kg]	Variation [%]	Kontrollwerte	
					Hämatokrit [%]	Osmolalität [mosm/kg]
0,50	32,00	21,95	400	21,58		
1,00	34,00	17,07	373	13,37	41	329
1,50	36,00	12,20	342	3,95		
2,00	38,50	6,10	347	5,47		
2,50	38,75	5,49	347	5,47		
0,50	29,00	23,68	412	29,56		
1,00	31,00	18,42	367	15,41	38	318
1,50	33,00	13,16	344	8,18		
2,00	35,00	7,89	339	6,60		
2,50	35,00	7,89	340	6,92		
0,50	29,50	29,76	385	18,46		
1,00	33,50	20,24	353	8,62	42	325
1,50	37,00	11,90	340	4,62		
2,00	39,75	5,36	339	4,31		
2,50	40,00	4,76	338	4,76		

**Tabelle 34:** Veränderung der Osmolalität in Abhängigkeit von der eingesetzten A. bidest.-Menge. Hierzu wurden 0.5 bis 2.7 ml A. bidest. zu EDTA-Monovetten gegeben und die Osmolalität und pH-Werte gemessen. pH-Wert des A. bidest. 6.60.

A. bidest.- Menge [ml]	Osmolalität [mosm/kg]	pH-Werte
0,50	82,50	7,30
1,00	45,00	7,32
1,50	30,80	7,32
2,00	20,50	7,31
2,50	14,50	7,31
2,70	13,50	7,33

## 4.2 VERGLEICH DES BLUTBILDES BEI ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN HALTUNGSFORMEN

### 4.2.1 WASSERMESSUNGEN

#### 4.2.1.1 WASSERQUALITÄT IN DER KREISLAUF- UND DURCHLAUFHALTUNG

Abbildungen 7 und 8 (S. 138) zeigen den Verlauf verschiedener Wasserparameter im Kreislaufsystem über einen Zeitraum von 150 Tagen, Tabellen 35 und 36 (S. 139 bzw. 140) die Mittelwerte bzw. Minimal- und Maximalkonzentrationen im Wasserkreis- und Durchlaufsystem. In Abb. 7 (S. 138) sind im Gegensatz zu den Nitratwerten die Ammoniak- sowie Nitritkonzentrationen der Übersicht wegen logarithmisch dargestellt. Die Meßwerte für die Durchlaufhaltung verliefen über den Beobachtungszeitraum annähernd konstant und sind aus diesem Grunde nicht graphisch ausgewertet worden (siehe Tabelle 36; S. 140).

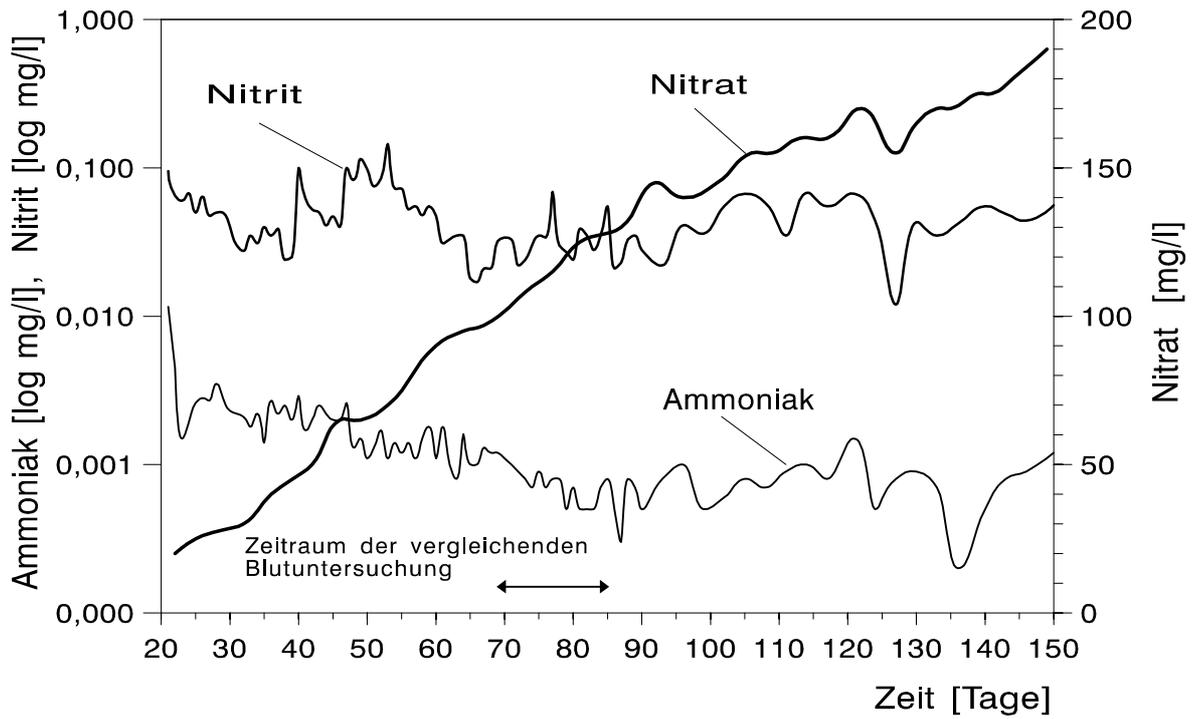


Abb.7: Zeitlicher Verlauf der Ammoniak-, Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen im Kreislaufsystem.

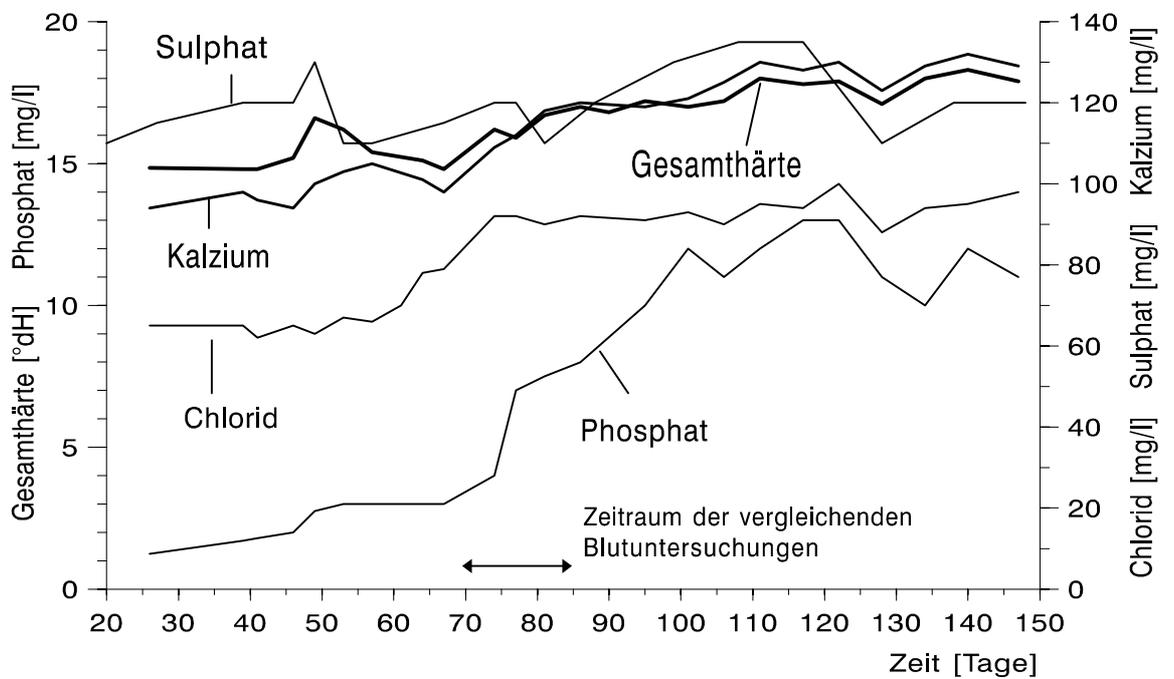


Abb.8: Zeitlicher Verlauf der Sulfat-, Phosphat-, Kalzium- und Chlorid-Ionenkonzentrationen sowie der Gesamthärte im Kreislaufsystem.

Die Ammoniakwerte nahmen in den ersten 100 Tagen kontinuierlich von 0,012 auf etwa 0,0002 mg/l Wasser ab, die durchschnittliche Konzentration betrug 0,0015 mg/l. Die Nitritwerte lagen im Mittel bei 0,047 mg/l bei Minimal- bzw. Maximalkonzentrationen von 0,012 bzw. 0,145 mg/l. Im Gegensatz hierzu stiegen die Werte für Nitrat von 20 mg/l auf Maximalwerte von etwa 190 mg/l an. Der Mittelwert betrug 112 mg/l.

In den ersten 80 Tagen nahmen die pH-Werte von 8,2 auf etwa 7,2 ab, wobei die schnellste pH-Wert-Abnahme zwischen Tag 65 und 85 ermittelt wurde. Anschließend konnte nach einer kurzfristigen Zunahme wieder ein kontinuierlicher Abfall festgestellt werden. Die Karbonathärte verlief analog der pH-Werte, sie nahm im Meßzeitraum von 9 auf 2 ° dH ab.

**Tabelle 35:** Durchschnittliche Konzentrationen der Wasserinhaltsstoffe des **Kreislaufsystems** sowie ihre Schwankungsbreite (Min-Max) über einen Zeitraum von 150 Tagen.

Wasserparameter	Kreislaufhaltung
	Min-Max Mittelwert
Temperatur [°C]	14 - 15 14,5
pH-Wert	7,10 - 8,20 7,56 ± 0,35
O <sub>2</sub> (% Sättigung)	85 - 100 92,5
NH <sub>3</sub> [mg/l]	0,0002 - 0,0116 0,0015 ± 0,0013
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	0,012 - 0,145 0,047 ± 0,023
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	20 - 190 112 ± 55
Karbonathärte [°dH]	2,0 - 9,8 5,3 ± 2,5
Gesamthärte [°dH]	14,8 - 18,3 16,5 ± 1,2
Ca <sup>++</sup> [mg/l]	94 - 132 114 ± 13
Cl <sup>-</sup> [mg/l]	62 - 100 83 ± 13
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mg/l]	110 - 135 120 ± 8
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg/l]	1,25 - 13,00 7 ± 4
Leitfähigkeit [µS/cm]	727 - 947 817 ± 63

S= Siemens

**Tabelle 36:** Konzentrationen der Wasserinhaltsstoffe im **Durchlaufsystem** über einen Zeitraum von 150 Tagen.

Wasserparameter	
Temperatur [°C]	13,5 - 15,0
pH-Wert	7,80 - 8,00
Sauerstoff [% Sättigung]	95 - 100
NH <sub>3</sub> [mg/l]	0,0002 - 0,0007
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	0,005 - 0,008
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	2,5 - 5,0
Karbonathärte [°dH]	11,8 - 13,0
Gesamthärte [°dH]	16,7 - 18,4
Fe <sup>++</sup> [mg/l]	n.n.
Ca <sup>++</sup> [mg/l]	100 - 105
Cl <sup>-</sup> [mg/l]	70 - 75
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mg/l]	85 - 90
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg/l]	1,50 - 2,5
Leitfähigkeit [µS/cm]	587 - 696

#### 4.2.1.2 WASSERQUALITÄT ZUM ZEITPUNKT DER BLUTUNTERSUCHUNGEN

Die einzelnen Wasserwerte des Kreislauf- sowie Durchlaufsystems sind Tabelle 37 (S. 141) zu entnehmen.

Die Ammoniakkonzentrationen im Kreislaufwasser waren im Vergleich zum Durchlaufwasser um das 5-fache, die Nitritkonzentrationen um das 5- bis 7-fache erhöht. Für Nitrat konnten im Kreislaufwasser bis zu 44-fache erhöhte Konzentrationen ermittelt werden. Sie lagen zwischen 110 und 125 mg/l, im Durchlaufsystem zwischen 2,5 und 5,0 mg/l. Die Werte für die Karbonathärte (KH) zeigten mit 3,2 bis 6,3 °dH im Vergleich mit der Durchlaufhaltung geringere Werte an, die pH-Werte schwankten analog der Karbonathärte zwischen 7,28 und 7,68 (Kreislaufwasser) bzw. 7,9 und 8,0 (Durchlaufwasser) . Neben Ammoniak, Nitrat und Nitrit akkumulierten die anderen Anionen und Kationen (Chlorid, Phosphat, Kalzium, Sulphat) im Kreislaufwasser. Der Anstieg der einzelnen Anionen und Kationen führte zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit sowie der Gesamthärte.

**Tabelle 37:** Messergebnisse der chemischen und physikalischen Wasserqualität zum Zeitpunkt der vergleichenden Blutbilduntersuchungen bei der Haltung der Bachforellen im Wasserkreislauf- und Durchlaufsystem. Mittelwerte über einen Zeitraum von 14 Tagen.

Wasserparameter	Durchlaufhaltung	Kreislaufhaltung	Verhältnis der Werte Kreislaufhaltung/ Durchlaufhaltung
	Min-Max	Min-Max Mittelwert	
Temperatur [°C]	14 - 15	14,0-15,3 14,9 ± 0,4	-
pH-Wert	7,9 - 8,0	7,28 - 7,68 7,46 ± 0,13	-
O <sub>2</sub> (% Sättigung)	95 - 100	95 - 100	-
NH <sub>3</sub> [mg/l]	0,0001 - 0,0002	0,0005 - 0,0011 0,0007 ± 0,0002	5 - 5,5
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	0,004 - 0,010	0,022 - 0,069 0,033 ± 0,011	5,5 - 6,9
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	2,5 - 5,0	110 - 125 116 ± 6	25 - 44
Karbonathärte [°dH]	10,4 - 12,3	3,2 - 6,3 4,6 ± 1,0	-
SBV [mmol/l]	3,74 - 4,43	1,15 - 2,27 1,65 ± 0,35	-
Gesamthärte [°dH]	14,0 - 15,8	15,9 - 16,8 16,4 ± 0,4	1,1
Fe <sup>++</sup> [mg/l]	0,0 - 0,01	0,0015 - 0,02 0,018 ± 0,002	-
Ca <sup>++</sup> [mg/l]	100 - 110	109 - 118 114 ± 4	1,1
Cl <sup>-</sup> [mg/l]	40 - 59	90 - 92 91 ± 1	-
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [mg/l]	90 - 100	110 - 120 117 ± 5	1,2 - 2,3
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg/l]	n.n.	4 - 8 6,6 ± 1,6	4 - 8
Leitfähigkeit [µS/cm]	480 - 583	805 - 854 826 ± 15	1,5 - 1,7
Osmolalität [mosm/kg]	10 - 11	30 - 35 32 ± 2	3 - 3,2

n.n. = nicht nachweisbar

SBV = Säurebindungsvermögen

Im gesamten Beobachtungszeitraum von 150 Tagen wurde keine Mortalität festgestellt.

#### 4.2.2 BLUTUNTERSUCHUNGEN

In Tabellen 38 und 39 (S. 145 und 146) sind die ermittelten Ergebnisse der Blutuntersuchungen von den im Wasserkreislauf- und Durchlaufsystem gehaltenen Bachforellen aufgelistet, Abbildungen 9 und 10 (S. 142-143) stellen die prozentuale Verteilung der einzelnen Blutzellen vergleichend graphisch dar.

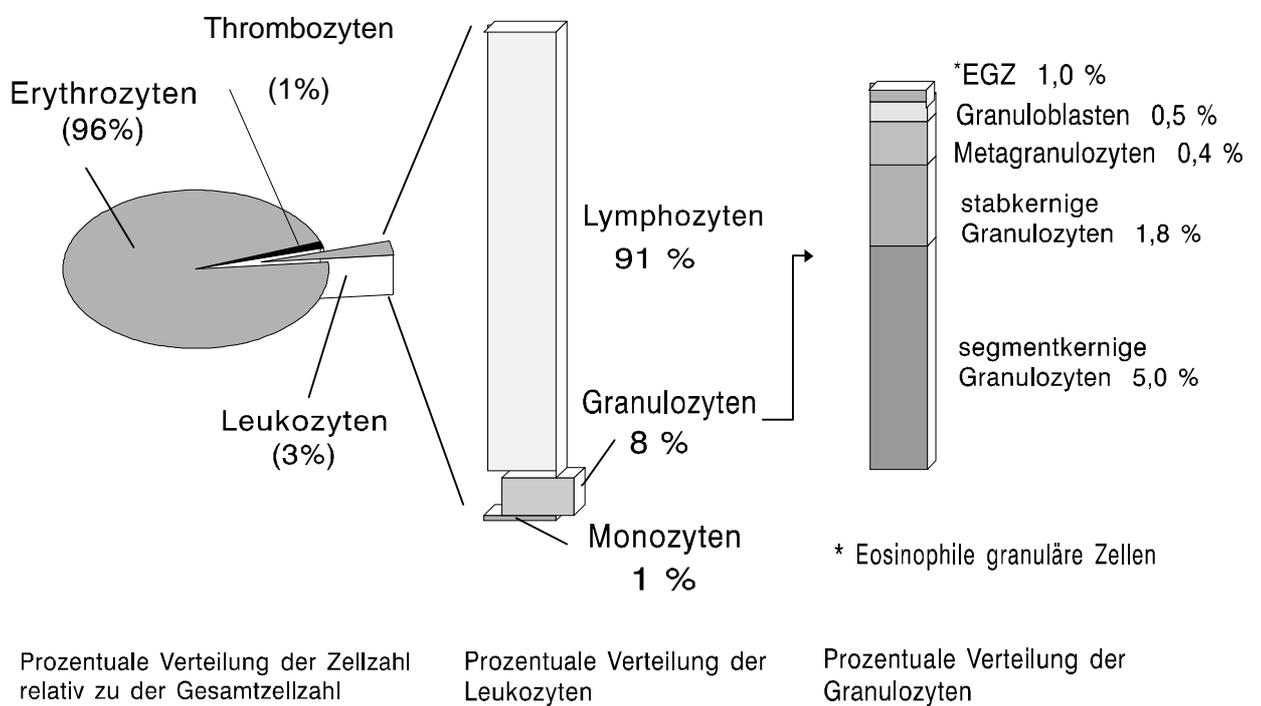


Abb.9: Durchlaufhaltung: Prozentuale Verteilung der Blutzellen.

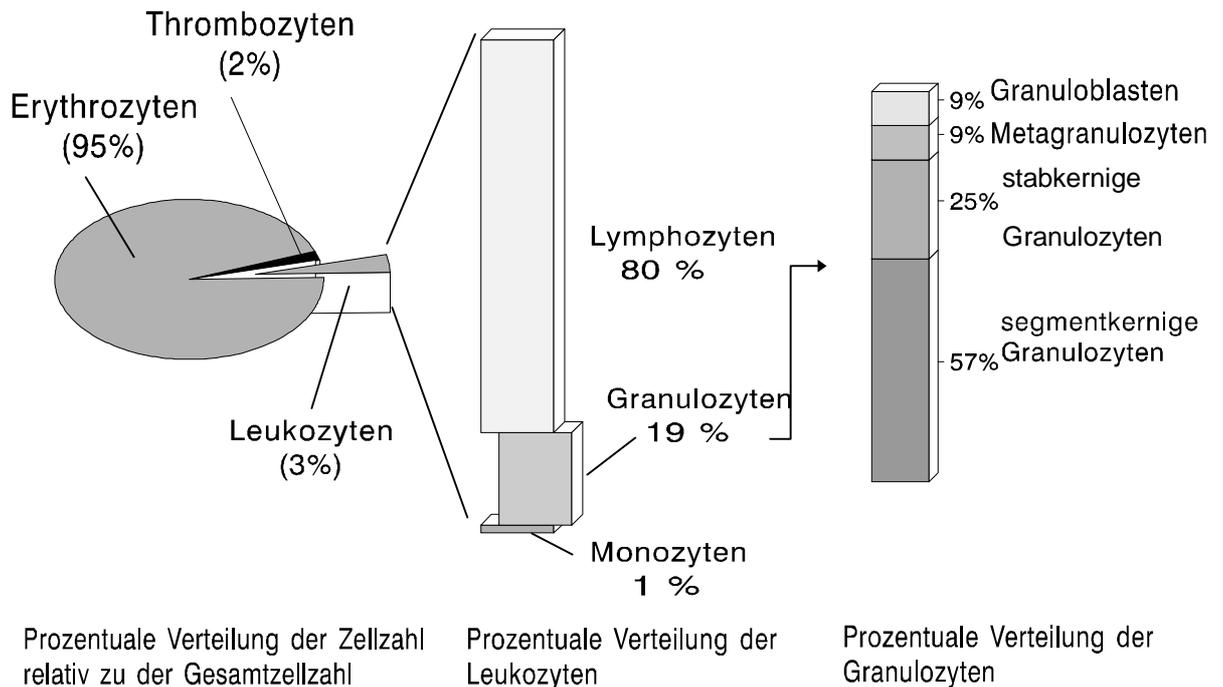


Abb.10: Kreislaufhaltung: Prozentuale Verteilung der Blutzellen.

Sowohl für die absoluten als auch relativen Erythrozytenzahlen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Sie lagen für die Bachforellen in der Durchlaufhaltung ( $BF_D$ ) bei 1.33, für die Tiere in der Kreislaufhaltung ( $BF_K$ ) bei  $1.25 \times 10^6/\mu l$ , entsprechend 96 bzw. 95 % bezogen auf die Gesamtzellzahl (Summe aus Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten).

Die Thrombozyten und Leukozyten der  $BF_K$  zeigten im Vergleich zu den  $BF_D$  absolut wie auch relativ eine Tendenz zu höheren Zellzahlen. Auffallend ist hierbei, daß für die absolute Lymphozytenzahl in beiden Systemen kein signifikanter Unterschied ermittelt werden konnte, die prozentuale Verteilung jedoch einen signifikanten Unterschied zeigte: Die absolute bzw. relative Lymphozytenzahl betrug  $3,6 \times 10^4/\mu l$  Blut bzw. 91 % bei den  $BF_D$ , bei den  $BF_K$   $3,5 \times 10^4/\mu l$  bzw. 80 %. Demgegenüber waren die absoluten Granulozytenzahlen von den im Wasserkreislaufsystem gehaltenen Bachforellen um das 2,9-fache erhöht, entsprechend einer Erhöhung der prozentualen Anzahl um 2,5. Betrachtet man die Verteilung der einzelnen Granulozyten-Subpopulationen, so ergibt sich ein ähnliches Muster. Sowohl die absolute wie auch die prozentual ermittelte Zellanzahl war bei den  $BF_K$  erhöht. Hierbei ist zum einen auffallend, daß bei den  $BF_D$  nicht in jedem Fall jeder Granulozyttyp identifiziert werden konnte. So konnten beispielsweise bei 79 % der Fische im Kreislaufsystem Granuloblasten identifiziert

werden, bei den Durchlauftieren 40 %. Zum anderen war das völlige Fehlen von eosinophil granulären Zellen bei den BF<sub>K</sub> auffällig.

Die Ergebnisse der Hämoglobin- sowie der Hämatokritmessungen und die Berechnungen der hämatologischen Kennwerte zeigten nur für den Hämatokritwert und dem MCV signifikant höhere Werte bei den BF<sub>K</sub> (Tabelle 39; S. 146). Der MCH und die Hämoglobinkonzentrationen zeigten im Vergleich zu den Durchlauftieren eine Tendenz zu höheren Werten. Die pH-Werte, Plasmaproteinkonzentrationen sowie die Serumosmolalität lagen im Vergleich zu den im Wasserdurchlaufsystem gehaltenen Bachforellen höher, waren jedoch auf dem 5 % Niveau nicht signifikant voneinander unterschiedlich (t-Test).

Im gesamten Beobachtungszeitraum wurde keine Mortalität festgestellt.

**Tabelle 38:** Vergleich des Blutbildes der im Wasserdurch- und Kreislaufsystem gehaltenen Bachforellen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die prozentuale Häufigkeit der im Blut auftretenden Zellsorten. Die signifikanten Unterschiede (zweiseitiger t-Test mit  $\alpha = 0,05$ ) sind durch ein \* gekennzeichnet.

Blutzellen	Durchlaufhaltung "Durchlauftiere"	Häufigkeit [%]	Kreislaufhaltung "Kreislauftiere"	Häufigkeit [%]
Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /μl]	1,325 ± 0,268	100	1,253 ± 0,218	100
%	95,70 ± 1,40		94,75 ± 1,00	
Thrombozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	1,798 ± 0,433	100	2,245 ± 0,375	100
%	1,32 ± 0,33		1,71 ± 0,26	
Leukozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	3,912 ± 1,318	100	4,352 ± 1,140	100
%	2,96 ± 1,35		3,48 ± 0,93	
Lymphozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	3,586 ± 1,253	100	3,471 ± 0,909	100
%	91,29 ± 2,51		79,82 ± 5,87 *	
Monozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,038 ± 0,023	100	0,064 ± 0,029 *	89
%	1,02 ± 0,56		1,66 ± 0,96 *	
Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,288 ± 0,125	100	0,820 ± 0,346 *	100
%	7,64 ± 2,65		18,81 ± 5,55 *	
stabkernige G. [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,078 ± 0,051	87	0,211 ± 0,118 *	100
%	1,84 ± 0,88		4,85 ± 2,29 *	
segmentkernige G. [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,200 ± 0,100	97	0,476 ± 0,219 *	100
%	5,06 ± 1,70		10,96 ± 3,99 *	
Metagranulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,025 ± 0,021	47	0,075 ± 0,051 *	93
%	0,41 ± 0,25		1,66 ± 0,81 *	
Granuloblasten [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,025 ± 0,020	40	0,072 ± 0,037 *	79
%	0,46 ± 0,18		1,70 ± 0,77 *	
EGZ [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,039 ± 0,021	57	n.n.	0
%	0,97 ± 0,43		n.n.	

EGZ = Eosinophile granuläre Zellen

n.n. = nicht nachweisbar

**Tabelle 39:** Vergleich verschiedener hämatologischer Parameter der Bachforellen in der Durchlauf- und Kreislaufhaltung. Die signifikanten Unterschiede (zweiseitiger t-Test mit  $\alpha = 0,05$ ) sind durch ein \* gekennzeichnet.

Blutparameter	Durchlaufhaltung	N	Kreislaufhaltung	N
Hämoglobin [g/100 ml]	9,10 ± 1,26	30	10,33 ± 1,85	28
Hämatokrit [%]	38,47 ± 4,12	30	51,13 ± 6,93 *	28
MCH [pg]	69,64 ± 14,72	30	83,90 ± 15,00 *	28
MCHC [g/100 ml]	23,74 ± 2,80	30	20,50 ± 4,06	28
MCV [fl]	294 ± 53	30	416 ± 72 *	28
Protein [g/100 ml]	4,48 ± 0,73	30	4,72 ± 0,66	28
pH-Werte	7,38 ± 0,04	30	7,15 ± 0,08	28
Osmolalität [mosm/kg]	325,0 ± 6,4	30	321,7 ± 8,1	28

N = Anzahl Fische

#### 4.3 VERÄNDERUNG DES ZELLULÄREN BLUTBILDES IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KÖRPERMASSE

Tabelle 40 (S. 147) stellt die Ergebnisse der Zellzahlen in Abhängigkeit von den Fischgewichten dar. Hierbei wurden 3 unterschiedliche Gewichtsklassen gebildet und die Mittelwerte sowie Standardabweichungen berechnet. Für alle Zellsorten konnten mit der einfachen Varianzanalyse auf dem 5 %-Niveau keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

**Tabelle 40:** Anzahl der verschiedenen Blutzellen in Abhängigkeit vom Körpergewicht. Angegeben sind die Minimal- und Maximalwerte sowie die Mittelwerte mit den Standardabweichungen.

	Größengruppen		
	250 - 400 g	400 - 500 g	> 500 g
	N = 21	N = 13	N = 19
Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /μl]	0,770-1,930 1,372 ± 0,294	0,830 - 2,030 1,346 ± 0,277	0,956 - 1,670 1,329 ± 0,207
Thrombozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,875-2,690 1,833 ± 0,421	0,275 - 2,600 1,750 ± 0,593	0,400 - 2,878 1,728 ± 0,631
Leukozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	2,828 - 5,090 3,908 ± 0,642	1,923 - 7,123 3,939 ± 1,350	1,347 - 5,640 3,793 ± 0,943
Lymphozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	2,620 - 4,690 3,561 ± 0,598	1,720 - 6,620 3,530 ± 1,250	1,150 - 5,289 3,476 ± 0,911
Lymphozyten [%]	85,12 - 96,33 91,15 ± 3,20	85,12 - 94,17 89,43 ± 2,78	84,52 - 95,69 90,44 ± 3,42
Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,154 - 0,612 0,298 ± 0,130	0,119 - 0,657 0,340 ± 0,157	0,128 - 0,507 0,290 ± 0,098
Granulozyten [%]	3,61 - 13,09 7,59 ± 2,73	3,18 - 12,41 8,67 ± 2,81	3,21 - 14,58 7,90 ± 2,77
Monozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,010 - 0,157 0,048 ± 0,030	0,019 - 0,157 0,062 ± 0,042	0,010 - 0,173 0,047 ± 0,038
Monozyten [%]	0,25 - 4,69 1,27 ± 0,93	0,36 - 4,16 1,71 ± 1,17	0,04 - 4,18 1,10 ± 0,92

Bei der korrelationsanalytischen Untersuchung zwischen der absoluten sowie relativen Anzahl der einzelnen Blutzellen und des Körpergewichtes konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient als Maß für die Güte der Anpassung variierte von +0,03636 bis -0,09917 (Tabelle 41; S. 148). Auffallend waren die überwiegend negativen Korrelationskoeffizienten.

**Tabelle 41:** Korrelationsanalytische Untersuchung der Veränderung des zellulären Blutbildes in Abhängigkeit von der Körpermasse der Bachforellen. Angaben der Minimal- und Maximalwerte sowie Mittelwerte. Das Körpergewicht der untersuchten Tiere variierte von 250 bis 700 g. Anzahl = 53.

Blutzellen	Achsenabschnitt a	Steigung b	Korrelationskoeffizient R	Anzahl Min-Max [ $\times 10^4/\mu\text{l}$ ]	Anzahl Mittelwert [ $\times 10^4/\mu\text{l}$ ]
Erythrozyten	1,425	-0,0002	-0,08240	77-203	135 $\pm$ 26
Leukozyten	4,071	-0,0004	-0,05870	1,35 - 7,12	3,87 $\pm$ 0,97
Thrombozyten	1,754	4,55 $\times 10^5$	0,01085	0,28 - 2,88	1,78 $\pm$ 0,55
Lymphozyten	3,653	-0,0003	-0,04129	1,15 - 6,62	3,52 $\pm$ 0,91
Lymphozyten %	91,59	-0,0025	-0,09917	84,52 - 96,33	90,47 $\pm$ 3,25
Granulozyten	0,340	-0,771	-0,07828	0,12 - 0,66	0,31 $\pm$ 0,13
Granulozyten %	8,140	-0,0004	-0,01825	3,18 - 14,58	7,96 $\pm$ 2,80
Monozyten	0,046	-1,03 $\times 10^5$	0,03636	0,01 - 0,17	0,05 $\pm$ 0,04
Monozyten %	1,609	-0,0006	-0,08250	0,04 - 4,69	1,32 $\pm$ 1,02

#### 4.4 REAKTION DER BACHFORELLEN AUF AKUTE STRESSOREN UND SAISONALE BLUTBILDVERÄNDERUNGEN IM WASSERDURCHLAUFSYSTEM.

Abbildungen 11 bis 13 (S. 151-152) zeigen die zeitliche Veränderung der Anzahl der verschiedenen Blutzellen. Am Tag 0 wurden die Bachforellen von dem Wasserkreislauf- in das Wasserdurchlaufsystem gesetzt (die Wassertemperaturen im Kreislaufsystem lagen um etwa 3°C höher). Im August/September konnten die ersten typischen männlichen und weiblichen sekundären Geschlechtsmerkmale bemerkt werden (beginnende Bauchauftreibung der weiblichen Tieren und Heranbildung des Laichhakens bei den männlichen Fischen).

Die ermittelten Werte wurden in 6 Gruppen unterteilt und hiervon die Mittelwerte sowie Standardabweichung errechnet (Tabelle 42; S. 149-150). Diese Aufteilung richtete sich nach dem Verlauf der absoluten und relativen Anzahl der weißen Blutzellen, da sie die auffälligsten Schwankungen zeigten.

Gruppe 1	Zellanzahl der Kreislauftiere vor Umsetzen in die Durchlaufanlage
Gruppe 2	Tag 1-40; Zeit nach Umsetzen der Fische in das Durchlaufsystem mit starker Variation der Blutzellanzahl bis zum Erreichen relativ konstanter Zellzahlen.
Gruppe 3	Tag 41-100; Zeitraum relativ konstanter Zellanzahl
Gruppe 4	Tag 101-122; erstes Auftreten sekundärer Geschlechtsmerkmale mit starkem Abfall der Zellzahl.
Gruppe 5	Wiederanstieg der Zellzahl bis Beobachtungsende.
Gruppe 6	Zellanzahl über den gesamten Beobachtungszeitraum.

**Tabelle 42:** Mittelwerte und Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte sowie Variationskoeffizienten der einzelnen Blutzellen. Die Ergebnisse wurden für verschiedenen Zeiten bzw. für die Art der Systeme (Kreislauf- und Durchlaufsystem) ausgewertet.

Blutparameter	Gruppe 1 N = 5	Gruppe 2 N = 15	Gruppe 3 N = 25	Gruppe 4 N = 10	Gruppe 5 N = 11	Gruppe 6 N = 61
	Kreislaufsystem	Tag 1 bis 40 (Umsetzen der Fische)	Tag 41 - 100	Tag 101 - 122	Tag 123 - 150	Tag 1 - 150
Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /µl]	1,342 ± 0,190 1,110-1,680	1,304 ± 0,338 0,857-2,000	1,300 ± 0,104 1,030-1,636	1,256 ± 0,093 1,127-1,425	1,287 ± 0,132 1,073-1,485	1,291 ± 0,191 0,857-2,000
Variations- koeffizient [%]	14,16 %	25,92 %	8,00 %	7,40 %	10,26 %	14,79 %
Leukozyten [x10 <sup>4</sup> /µl]	4,387 ± 0,367 3,825-4,880	3,679 ± 1,231 2,010-6,090	3,790 ± 0,801 2,664-5,815	1,288 ± 0,470 0,689-2,021	3,211 ± 0,617 1,874-3,927	3,248 ± 1,192 0,689-6,090
Variations- koeffizient [%]	8,37 %	33,46 %	21,13 %	36,49 %	19,22 %	36,70 %
Thrombozyten [x10 <sup>4</sup> /µl]	2,776 ± 0,767 1,980-3,870	1,691 ± 0,419 1,053-2,370	2,216 ± 0,256 1,455-2,870	0,934 ± 0,385 0,413-1,558	1,622 ± 0,500 0,839-2,384	1,770 ± 0,583 0,413-2,870
Variations- koeffizient [%]	27,63 %	24,78 %	11,55 %	41,22 %	30,83 %	32,94 %
Lymphozyten [x10 <sup>4</sup> /µl]	3,392 ± 0,487 2,861-4,175	3,256 ± 1,255 1,531-5,700	3,452 ± 0,581 2,414-5,42	1,070 ± 0,378 0,594-1,682	2,893 ± 0,591 1,609-3,538	2,912 ± 1,148 0,594-5,700
Variations- koeffizient [%]	14,36 %	38,54 %	16,83 %	35,33 %	20,43 %	39,42 %
Lymphozyten %	78,43 ± 4,75 71,34-85,55	86,84 ± 5,84 75,88-95,29	91,03 ± 2,96 83,50-95,39	83,43 ± 3,25 78,35-86,48	90,06 ± 2,39 85,87-93,66	88,58 ± 4,77 75,88-95,39

**Tabelle 42 (Fortsetzung):** Mittelwerte und Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte sowie Variationskoeffizienten der einzelnen Blutzellen. Die Ergebnisse wurden für verschiedenen Zeiten bzw. für die Art der Systeme (Kreislauf- Durchlaufsystem) ausgewertet.

Blutparameter	Gruppe 1 N = 5	Gruppe 2 N = 15	Gruppe 3 N = 25	Gruppe 4 N = 10	Gruppe 5 N = 11	Gruppe 6 N = 61
	Kreislaufsystem	Tag 1 bis 40 (Umsetzen der Fische)	Tag 41 - 100	Tag 101 - 122	Tag 123 - 150	Tag 1 - 150
Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,945 ± 0,220 0,622-1,264	0,347 ± 0,115 0,154-0,567	0,293 ± 0,095 0,160-0,534	0,180 ± 0,082 0,076-0,297	0,280 ± 0,093 0,178-0,456	0,286 ± 0,111 0,076-0,567
Variations- koeffizient [%]	23,28 %	33,14 %	32,42 %	45,56 %	33,21 %	38,84 %
Granulozyten %	20,87 ± 3,54 16,25-25,89	11,31 ± 6,30 2,53-23,34	7,83 ± 2,45 4,11-14,02	13,64 ± 2,36 10,28-17,88	9,10 ± 3,03 5,32-13,59	9,87 ± 4,41 2,53-23,34
Monozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,069 ± 0,035 0,027-0,127	0,076 ± 0,067 0,016-0,252	0,045 ± 0,036 0,005-0,138	0,037 ± 0,032 0,003-0,111	0,038 ± 0,022 0,002-0,076	0,050 ± 0,046 0,002-0,252
Variations- koeffizient [%]	50,72 %	88,16 %	80,00 %	86,49 %	57,89 %	92,00 %
Monozyten %	1,60 ± 0,80 0,56-2,89	1,86 ± 0,98 0,78-4,44	1,14 ± 0,84 0,17-3,50	2,74 ± 1,92 0,38-5,89	1,20 ± 0,72 0,09-2,45	1,59 ± 1,25 0,09-5,89

N = Anzahl untersuchter Fische.

Auffallend waren die starken Variationen der Erythro-, Leuko- und Thrombozytenzahlen nach Umsetzen der Fische in das Durchlaufsystem (Tag 1-40) und bei der Heranbildung der Laichprodukte bzw. der Änderung des geschlechtsspezifischen Erscheinungsbildes (Tag 100-120; Abb. 11 bis 13; S. 151-152).

Erythrozyten (Abb. 11; S. 151):

Nach einem etwa 10 Tage andauernden Anstieg von 1,3 auf 2,0 x 10<sup>6</sup> Zellen/μl Blut fielen die Erythrozyten auf etwa 0,9 x 10<sup>6</sup>/μl bis zum 30. Tag ab. Danach war ein Anstieg festzustellen, von Tag 60 bis Versuchsende betragen die Zellzahlen etwa 1,30 x 10<sup>6</sup>/μl. Die Variationskoeffizienten schwankten zwischen 7,40 und 25,92 % in den einzelnen Gruppen (Tabelle 42; S. 149-150), wobei die höchsten Werte in Gruppe 2 (25,92 %) ermittelt wurden.

Leukozyten und Lymphozyten (Abb. 12 und 13; S. 151-152):

Die Leukozytenzahlen nahmen nach Umsetzen der Tiere kurzfristig zu und fielen bis zum 20. Tag auf unter 2,0 x 10<sup>4</sup>/μl. Nach einem erneuten Anstieg auf über 5,0 x 10<sup>4</sup> Zellen/μl konnten bis zum 100. Tag mittlere Leukozytenzahlen von 3,8 x 10<sup>4</sup>/μl gezählt werden. Mit Heranbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale sanken die Leukozytenzahlen auf unter 1,0 x 10<sup>4</sup>/μl ab (Mittelwerte von 1,3 x 10<sup>4</sup>/μl) und stiegen bis zum Versuchsende wieder auf

etwa  $3,5 \times 10^4$  Zellen/ $\mu\text{l}$ . Das gleiche Schwankungsmuster zeigten die absoluten und relativen Lymphozytenzahlen: Nach einem initialen Anstieg fiel die Anzahl stark ab. Nach einem erneuten Anstieg konnten von Tag 50 bis 100 konstante Zellzahlen von etwa  $3,5 \times 10^4/\mu\text{l}$  ermittelt werden. Parallel zur Geschlechtsreife sanken die Zellzahlen auf durchschnittlich  $1,0 \times 10^4/\mu\text{l}$  (83 %). Bis zum Beobachtungsende stiegen sie wieder auf etwa  $2,9 \times 10^4$  Zellen/ $\mu\text{l}$  (90 %).

Aufgrund der Schwankungen der Zellzahl von Tag 1 bis 40 und 101-122 konnten sowohl bei den Leuko- wie auch Lymphozyten hohe Variationskoeffizienten ermittelt werden (Tabelle 42; S. 149-150).

Granulozyten (Abb. 12 und 13; S. 151-152):

Die absolute Granulozytenanzahl nahm nach Umsetzen der Tiere von durchschnittlich 0,95 auf  $0,10 \times 10^4/\mu\text{l}$  ab, danach stiegen sie wieder bis zum 20. Tag auf  $0,4 \times 10^4/\mu\text{l}$  an. Im Zeitraum vom 40. bis etwa 80. Tag konnten konstantere Zellzahlen von etwa  $0,24 \times 10^4/\mu\text{l}$  ermittelt werden. Zum Zeitpunkt der Heranreifung der Geschlechtsprodukte nahmen sie auf unter  $0,10 \times 10^4/\mu\text{l}$  ab und stiegen bis Versuchsende wieder an. Die relativen Granulozytenzahlen (Abb. 13; S. 152) verliefen gegenläufig zur den Leuko- bzw. Lymphozytenanzahlen, d.h. mit einem Anstieg bzw. einer Reduktion der Lymphozyten konnte ein Abfall bzw. Anstieg der Granulozyten ermittelt werden.

Die höchsten Variationskoeffizienten wurden zwischen Tag 1 und 40 (33 %) bzw. 101 und 122 (45,6 %) errechnet, für die anderen Gruppen betragen die Werte zwischen 23,3 und 33,2 %.

Monozyten (Abb. 12 und 13; S. 151-152):

In den ersten 5 Tagen konnte eine Zunahme der Zellzahl von 0,1 auf etwa  $0,3 \times 10^4/\mu\text{l}$  festgestellt werden. Danach nahm die Monozytenzahl wieder ab, ab dem 20. Versuchstag stieg die Zellzahl an und fiel bis zum 90. Tag ab. Im Zeitraum der Heranreifung der Geschlechtsprodukte stieg die Zellzahl auf etwa  $1,8 \times 10^4/\mu\text{l}$  an und sank bis zum Versuchsende wieder ab. Auffallend waren die im Vergleich zu den restlichen Zellarten starken Schwankungen der Variationskoeffizienten; sie lagen zwischen 50,7 (Gruppe1) und 88,2 % (Gruppe 2).

Thrombozyten (Abb. 11; S. 151):

Nach einer initialen, über 5 Tage andauernden Zellzahlabnahme stiegen die Werte wieder an, fielen bis etwa zum 35. Tag ab und nahmen wieder kontinuierlich bis zum Tag 80 zu. Auffallend war die ab dem 100. Tag schnell abfallende Thrombozytenzahl von etwa 2 auf  $0,5 \times 10^4$  Zellen / $\mu\text{l}$ . Die höchsten Variationskoeffizienten wurden für den Zeitraum von Tag 101-122 (Gruppe 4) und 123-150 (Gruppe 5) berechnet (41,2 bzw. 30,8 %), in der übrigen Zeit schwankten sie zwischen 11,6 und 27,6 %.

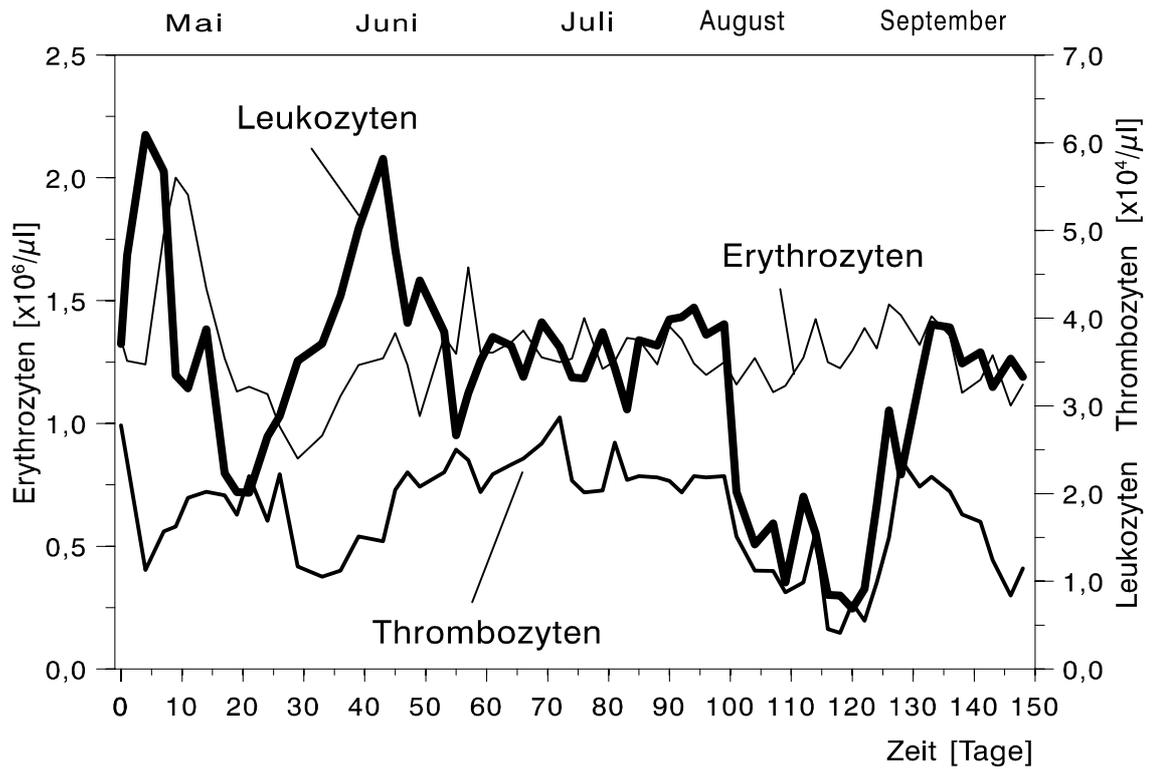


Abb.11: Veränderungen der absoluten Erythrozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenzahlen in Abhängigkeit von der Zeit.

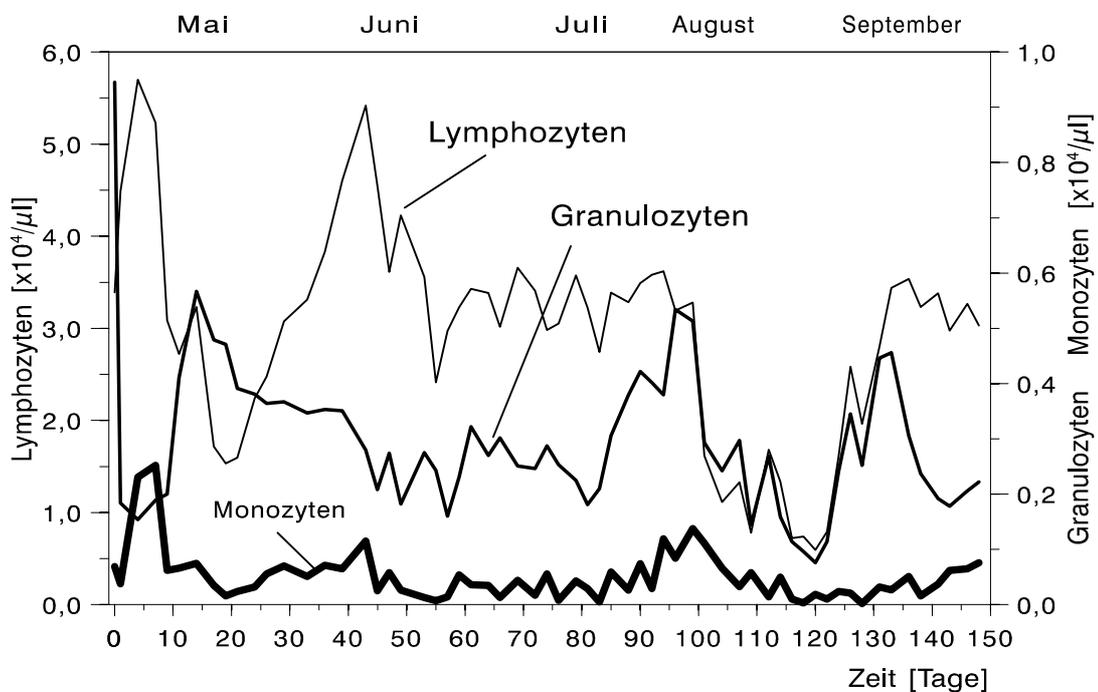


Abb.12: Veränderungen der absoluten Lymphozyten-, Granulozyten- und Monozytenzahlen in Abhängigkeit von der Zeit.

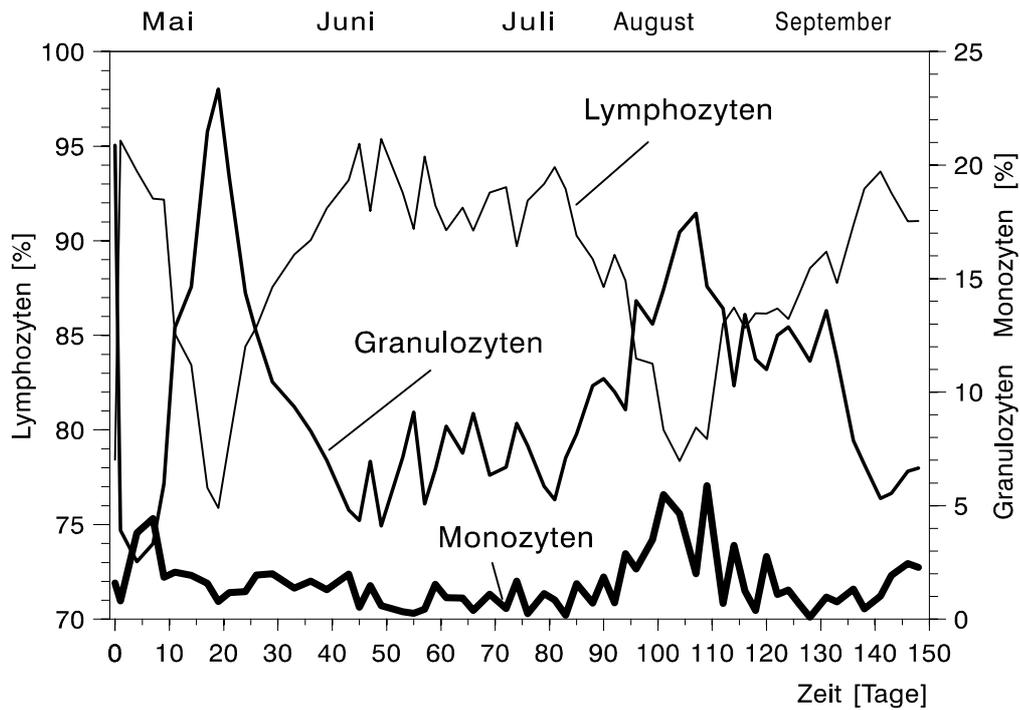


Abb.13: Veränderungen der relativen Lymphozyten-, Granulozyten- und Monozytenzahlen in Abhängigkeit von der Zeit.

Nach Umsetzen der Bachforellen in die Durchlaufhaltung war anfänglich eine Reduktion der Futteraufnahme erkennbar: Für die Fütterung war es notwendig, die auf den Fischbecken liegenden Abdeckplatten teilweise zu entfernen. Nach Entfernen zogen sich die Tiere sofort zurück und reagierten nicht auf die in das Wasser gestreuten Futterpellets. Ein Teil der Tiere schwamm ruckartig zur Futteröffnung, entfernte sich jedoch sofort wieder. Es konnte beobachtet werden, daß diese Reaktionen mit der Zeit wieder an Heftigkeit abnahmen. Nach etwa einer Woche nahmen die Fische die dargereichten Futterpellets auf und zogen sich nach Entfernen der Abdeckhaube nicht mehr zurück.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 BETÄUBUNG UND BLUTENTNAHME

Auf Grund der starken Abwehrbewegungen der Fische während der Blutentnahme (BE) ist man oftmals gezwungen, die Fische zu betäuben (LEHMANN und STÜRENBERG 1980). Für Fische häufig verwendete Betäubungsmittel sind MS-222 (Tricain) oder Benzocain, die in einem Betäubungsbad angewendet werden ("Immersionbetäubung") (McERLAN und KENNEDY 1968, GILDERHUS 1990, STOSKOPF 1993). Benzocain wird in einer Konzentration von 25 mg/l Wasser, vorgelöst in Azeton, angewendet (ROBERTS und SCHLOTFELDT 1985). SOIVIO et al. (1977) verwendeten für die Betäubung von Regenbogenforellen Benzocainkonzentrationen von 33 mg/l Wasser, GILDERHUS (1990) 25 - 30 mg/l Wasser. Tricain wird in Abhängigkeit von der Fischart in einer Konzentration zwischen 50 und 150 mg/l Wasser verwendet (STOSKOPF 1993).

In den eigenen Versuchen wurde festgestellt, daß bei der von ROBERTS und SCHLOTFELDT (1985) angegebene Benzocaindosierung die Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) erst nach 15 bis 20 Minuten das für die BE notwendige III/1 oder III/2-Stadiums erreichten. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, daß die wiederholte Betäubung im selben Narkosebad zu einer Verlängerung der Induktionszeit führte.

Eine zu lange Betäubungszeit mit einer geringen Narkosemittelkonzentration ähnelt einem akut auf Fische einwirkenden Stressor. So werden eine Erhöhung der Kortisolkonzentration, eine Neutrophilie sowie Lymphopenie und eine Hämokonzentration mit Steigerung der Hämoglobinkonzentrationen, Hämatokritwerte und Erythrozytenanzahlen beobachtet (WEDEMEYER 1970a, SMIT et al. 1979a, FERREIRA et al. 1981, ISHIOKA 1984, LAIDLEY und LEATHERLAND 1988). Aus diesem Grunde muß nach FERREIRA et al. (1981) die Konzentration so gewählt werden, daß eine schnelle Induktionszeit erreicht wird. Sie stellten fest, daß bei einer Benzocainkonzentration zwischen 50 und 100 mg/l Wasser die bei der Blutentnahme entstehende Streßantwort minimiert wurde. STRANGE und SCHRECK (1978) sowie BARTON und PETER (1982) fanden bei einer milden Sedation mit Tricain eine Erhöhung der Kortisolwerte, wie sie bei Vorliegen von akut einwirkenden Stressoren charakteristisch ist. Bei Konzentrationen über 100 mg/l Wasser blieb die Erhöhung der Blutkortisolkonzentration aus. Zu ähnlichen Resultaten kamen LAIDLEY und LEATHERLAND (1988). IWAMA und ISHIMATSU (1994) geben an, daß eine durch die Betäubung verminderte Atmung selbst ein Stressor darstellt bzw. charakteristische Streßantworten hervorruft, die Betäubung während eines Eingriffs am Fisch jedoch einen "lower state of stress" induziert.

In den eigenen Versuchen konnten bei einer Benzocainkonzentration von 50 mg/l Wasser innerhalb einer Minute die ersten Koordinationsstörungen beobachtet werden (Seitenlage), das Blut konnte ohne Abwehrbewegungen nach etwa 5 bis 7 Minuten entnommen werden.

Bei Bachforellen mit einem Körpergewicht zwischen 1000 und 1300 g verzögerte sich die Zeit bis zum Erreichen des III/1 bzw. III/2 Stadiums im Vergleich zu 400 - 500 g schweren Tieren um etwa 3 Minuten. Narkotika, wie Benzocain (Ethylaminobenzoat) oder sein sulphonisiertes Analogon, Tricain, werden über die Kiemen aufgenommen (HUNN und ALLEN 1974, STOSKOPF 1993). Die Kiemenoberfläche beträgt bei Knochenfische im Mittel 150 bis 300 mm<sup>2</sup>/g (BOND 1996) und nimmt relativ zum Körpergewicht ab (PAULY 1979). Dies kann die Zeitverzögerung erklären, da aufgrund der verringerten relativen Kiemenoberfläche die Resorptionsgeschwindigkeit des Benzocains verlangsamt war.

Die eigenen Versuche verdeutlichen, daß die Konzentration des Anästhetikums ausgetestet und je nach Gewicht der Tiere eingestellt werden muß. Denn es besteht zum einen die Möglichkeit, daß mit einer Verlangsamung der Resorptionsgeschwindigkeit stressinduzierte Veränderungen des Blutbildes auftreten können, die zu Verfälschungen der Blutwerte und damit zu Fehlinterpretationen führen können. Zum anderen kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei Verwendung des gleichen Betäubungsbades infolge abnehmender Narkosemittelkonzentrationen Blutbildveränderungen auftreten, die ein Vergleich der Daten untereinander erschweren bzw. ausschließen. Es ist somit die Notwendigkeit gegeben, die für die Blutentnahme erforderliche Betäubungsart zu vereinheitlichen, damit eine Vergleichbarkeit der Blutwerte untereinander und zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen gewährleistet ist. Beispielhaft können hier die Ergebnisse von SMIT et al. (1979) herangezogen werden, die die Beeinflussung verschiedener Blutparameter bei Tilapien (*Sarotherodon mossambicus*) in Abhängigkeit von der Verwendung eines Anästhetikums sowie seiner Konzentration untersuchten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 43 zusammengefaßt und zeigen die gravierenden Unterschiede der Meßwerte.

**Tabelle 43:** Schwankungen verschiedener Blutparameter von *Sarotherodon mossambicus* in Abhängigkeit von der Konzentration des Anästhetikums Tricain (nach SMIT et al. 1979).

Blutparameter	Ohne Betäubung	75 mg Tricain/l Wasser	150 mg Tricain/l Wasser
pH	7,70	7,42	7,60
Hämatokrit [%]	20,50	19,80	24,50
Hämoglobin [g/100 ml]	5,20	5,70	6,19
Erythrozyten [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ]	1,20	1,40	1,87
Osmolalität [mosm/kg]	300	313	315
Natrium [mEq/l]	193	200	218
Kalium [mEq/l]	3,10	3,50	3,50
pCO <sub>2</sub> [mm Hg]	4,30	8,20	5,80
pO <sub>2</sub> [mm Hg]	14,00	11,50	10,80

p = Partialgasdruck

Weiterführende Untersuchungen könnten hier zeigen, inwieweit und in welchem Grad die gewählten Benzocainkonzentrationen zu einer Streßminderung führen. Dies kann z.B. an Hand der Messung der primären und sekundärer Streßparameter (Kortisolkonzentrationen, Hämatokrit- und Leukritwerte) durchgeführt werden.

Bestimmend für die Wahl der Blutentnahmetechnik ist zum einen, daß sie für den Fisch mit keinem oder einem nur geringen Verletzungsrisiko einhergeht und auch für den Ungeübten eine schnell zu erlernende Methode darstellt. Zudem spielen für die Wahl der Technik die Fischgröße sowie die erforderliche Blutmenge entscheidende Rollen. Zum anderen richtet sich die gewählte Technik nach der Fragestellung bzw. dem Ziel der Versuche und inwieweit das Versuchstier nach der BE getötet werden muß. Für die Ermittlung hämatologischer Parameter, wie sie bei veterinärmedizinischen und toxikologischen Untersuchungen notwendig werden können, ist die erste Voraussetzung eine sichere und rasch durchzuführende Technik zur Blutgewinnung. LEHMANN und STÜRENBERG (1980), HOUSTON (1990), SCHÄPERCLAUS et al. (1990) sowie IWAMA und ISHIMATSU (1994) geben über die verschiedenen Blutentnahmetechniken zusammenfassende Darstellungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei in der Literatur beschriebene Routine-Blutentnahmetechniken angewendet: die Blutentnahme aus dem Herzventrikel, der Kaudalvene und aus dem Ductus Cuvieri (LEHMANN und STÜRENBERG 1980). Während SCHÄPERCLAUS et al. (1990) und IWAMA und ISHIMATSU (1994) eine Narkose der Fische in jedem Fall empfehlen, halten LEHMANN und STÜRENBERG (1980) eine Betäubung nur für die BE aus der Schwanzvene und -arterie für notwendig. Dies entsprach nicht den eigenen Beobachtungen. Bei allen verwendeten Methoden war eine ausreichende Betäubung der Tiere notwendig (Stadium III/1 bis III/2), da die starken Abwehrbewegungen oftmals zu einer Verlagerung der Kanüle führten. Es bestand hierdurch zum einen die Gefahr eines erhöhten Verletzungsrisikos der Schwanzgefäße bzw. des Herzens, zum anderen versiegte der Blutfluß.

Die Blutentnahme aus dem Herzen sowie die Punktion der Kaudalgefäße hatten Verletzungen zur Folge, so daß die Fische getötet werden mußten. Die anschließend durchgeführten Untersuchungen ergaben im Falle der Blutentnahme aus der Kaudalvene großflächige Nekrosen des Schwanzstils mit Pilzbefall dieses Gebietes. Bei bzw. nach der Herzpunktion konnte eine Herzbeutelblutung (Herztamponade) diagnostiziert werden. Die Entnahme aus den Schwanzgefäßen führte zu Verletzungen der Gefäße auch bei kleinem Durchmesser der Kanüle, so daß eine ausreichende Versorgung des caudalen Rumpfbereichs und des Schwanzstils nicht mehr gewährleistet war. Dies führte zu den beobachteten Nekrosen und Infektionen dieses Bezirkes.

Die Blutentnahme aus dem D.c. sinister war im Vergleich zu den anderen Entnahmemethoden schnell und einfach durchzuführen, das Verletzungsrisiko war gering. Im

Gegensatz zu der Blutentnahme aus der Kaudalvene und der Herzpunktion konnte das Gefäß mit großer Sicherheit getroffen werden. Die Blutgewinnung aus dem D.c. ist besonders dann zu empfehlen, wenn ein hohes Maß an Sterilität bei der Blutentnahme gewährleistet sein muß (LEHMANN und STÜRENBERG 1980). Man durchsticht nur die dünne, leicht zu desinfizierende Branchialmembran; die Desinfektion eines großflächigen Epidermisbezirkes, die durch Zerstörung der Schleimschicht zu lokalen Irritationen sowie Lokalinfectionen führen kann, entfällt. Ein weiterer großer Vorteil gegenüber der Herzpunktion ist das geringe Verletzungsrisiko, die Punktion des Ductus Cuvieri führte nach eigenen Beobachtungen nicht zu Nachblutungen. Wichtig für die Erhebung hämatologischer Daten sowie deren Vergleichbarkeit ist der Ort der Blutentnahme, d.h. ob venöses, arterielles oder Mischblut gewonnen wird (ALLEN 1993). Der Vorteil der Entnahme aus dem venösen Blutkreislaufsystem (Ductus Cuvieri, Herz) ist zudem der geringere Blutdruck (IWAMA und ISHIMATSU 1994). Der Nachteil einer Blutentnahme, die das Durchstechen von Gewebe notwendig macht (Kaudalvene, Herz), kann zur Aspiration von Verunreinigungen (anhaftendes Wasser, Keime, Schleim, Gewebsflüssigkeit) führen, die entweder die Probe unsteril macht oder eine Hämolyse nach sich zieht (HAMERS 1995c). Aus diesen Gründen wurde für alle weiteren Untersuchungen das Blut aus dem Ductus Cuvieri entnommen, die Fische wurden am Tag vor der Entnahme nicht mehr gefüttert.

## 5.2 HÄMATOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN

### **Färbetechniken**

Das Fischblut wurde mit verschiedenen, in der Literatur beschriebenen Färbe- bzw. Differenzierungslösungen verdünnt und die Anzahl der Erythro-, Leuko- und Thrombozyten bestimmt. Zusätzlich wurden einige Lösungen nicht in ihrer Originalzusammensetzung, sondern modifiziert angewendet. Eine wie in der Humanmedizin angewandte Zerstörung der kernlosen Erythrozyten mit 3 %-iger Essigsäure ist wegen der Kernhaltigkeit von Fischerythrozyten nicht möglich, da dann diese Zellkerne mitgezählt würden (AMLACHER 1992). Aus diesem Grunde wurden eine Vielzahl von Verdünnungs-Zähllösungen für Fischblut entwickelt (WEDEMEYER und YASUTAKE 1977, LEHMANN und STÜRENBERG 1974, 1981, HOUSTON 1990).

Die Verdünnung des Blutes mit einer Färbelösung dient zum einen der verbesserten Zählbarkeit im Hämozytometer: Mit einigen Färbelösungen werden die verschiedenen Blutzellen unterschiedlich eingefärbt, was eine Differenzierung bzw. Identifizierung der Erythro-, Leuko- sowie Thrombozyten schon bei der Zählung erlaubt (SHAW 1930, LEHMANN und STÜRENBERG 1981). ROBERTS und SCHLOTFELDT (1985) weisen darauf hin, daß für eine Vergleichbarkeit der Zählergebnisse eine standardisierte Verdünnungslösung verwendet werden sollte. Sie schlagen die Farblösung nach **Dacies** vor, wie sie schon von BLAXHALL und

DAISLEA (1973) sowie BRUNO und MUNRO (1986) verwendet und von HOUSTON (1990) empfohlen wurde. LOWE-JINDE und NIIMI (1983) sowie KLONTZ (1994) verwendeten für die Erythrozyten- und Leukozytenzählung die modifizierte **Rees-Ecker**-Farblösung, die eine ähnliche Zusammensetzung wie die Dacie'sche Lösung aufweist. OIDTMANN (1994) verwendete für die Erythro- und Leukozytenzählung die nach **Natt und Herrick** zusammengesetzte Lösung, die ebenso wie die beiden Letztgenannten Formaldehyd enthält. Die Differenzierungslösungen nach **Hendrick** und **Hunn** enthalten Eisessig (HESSER 1960, HOUSTON 1990, HUNN et al. 1992). SCHÄPERCLAUS et al. (1990) und AMLACHER (1992) empfehlen für die Erythrozytenzählung die **Hayem'sche** Lösung. Für die Bestimmung der Leukozytenanzahl sollte nach HOUSTON (1990) und SCHÄPERCLAUS et al. (1990) die Methode nach **Shaw** verwendet werden, wobei das Blut mit zwei unterschiedlichen Farbstofflösungen (Neutralrot und Kristallviolett) vermischt wird. AMLACHER (1992) gibt an, daß diese Lösung für die gleichzeitige Zählung von Erythro- und Leukozyten verwendet werden kann. Die Verdünnungslösung geht auf SHAW (1930) zurück, der damit Erythro-, Leuko- sowie Thrombozyten von Vögeln gleichzeitig zählte und identifizierte.

Die Ergebnisse zeigten, daß die Lösungen nach Hendrick, Hunn sowie die Einzellösungen nach Shaw pH-Werte außerhalb des für Bachforellen physiologischen Bereiches von 7.2 bis 7.4 besaßen (Tabelle 22; S. 119). Fünf der sieben getesteten Differenzierungslösungen besaßen eine Osmolalität, die über der physiologischen Konzentration des Bachforellenserums von etwa 320 mosm/kg lagen. Bei hohen osmotischen Konzentrationen, wie sie für die Färbelösungen nach Hunn (520 osm/kg) und Hendrick (> 1600 mosm/kg) vorlagen, konnten weder qualitativ noch quantitativ die Erythro-, Leuko- von den Thrombozyten aufgrund der Zellschrumpfung ("Mikrozyten") und einheitlichen Anfärbung nicht voneinander unterschieden werden.

Für den Austausch von Wasser zwischen dem Zellinneren und ihrer extrazellulären Umwelt sind osmotische Kräfte von wesentlicher Bedeutung, da die Zellmembranen für Wasser frei permeabel sind (PFEFFER 1987, PETRIDES 1990). Ist die Teilchenkonzentration der die Zellen umgebenden Flüssigkeit höher als diejenige im Intrazellulärraum, so kann Wasser aus der Zelle passiv austreten (Diffusion) (HIERHOLZER und FROMM 1987). Dieser Vorgang der Osmose führte bei den Verdünnungslösungen mit hoher Osmolalität (Hunn und Hendrick) zu einer Schrumpfung der Zellen, die unterschiedlichen Blutzellarten konnten aufgrund der veränderten Morphologie nicht mehr differenziert werden. Erst mit der Verwendung der modifizierten Hunn'schen Färbelösung, die 0,4 % Formalin enthielt, konnten auch bei einer sehr hohen Osmolalität von 920 mosm/kg die Erythro-, Leuko- und Thrombozyten aufgrund der erhaltenen Morphologie unterschieden werden. Ähnliches galt für die formaldehydhaltigen Färbelösungen nach Dacies: Obwohl die Originallösung eine im Vergleich zum Bachforellenserum hohe Osmolalität von 490 mosm/kg besaß, konnten die einzelnen Zellarten ebenso genau wie bei Anwendung der modifizierten, isoosmolalen Lösung identifiziert werden. Bei der vergleichenden Auszählung von 15 unterschiedlichen Blutproben wurden für die beiden Verdünnungslösungen keine signifikanten Unterschiede in den Zellzahlen ermittelt (Tabelle 23;

S. 122). Formaldehyd führt aufgrund einer Vernetzung von Hydroxyl-, Amino-, Amido- sowie Sulfhydrylgruppen der Aminosäuren zu einer Denaturierung von Proteinen und entfaltet so seinen konservierenden und desinfizierenden Effekt (BURCK 1981, BEYER und WALTER 1984, ROMEIS 1989). Es liegt nahe, daß der Formalinzusatz die Membranproteine der Blutzellen denaturierte und sie so für Zellwasser undurchlässig machte. Dies führte zusammen mit einem Funktionsverlust als semipermeable Membran zum Erhalt der Zellmorphologie, so daß die einzelnen Zellarten selbst bei hohen Osmolalitätswerten unterschieden werden konnten. Einen Hinweis hierfür lieferte die Tatsache, daß bei Verwendung der Lösung nach Dacies ohne Formalinzusatz und einer der Originalrezeptur entsprechenden Osmolalität (490 mosm/kg) deformierte Zellen sichtbar waren. Bei der Verwendung der Dacie'schen Verdünnungslösung mit Formalin und ohne Farbstoff blieb die Zellgestalt jedoch erhalten. Der nachträgliche Zusatz von Brillantkresylblau färbte alle Zellen blau an. Offenbar konnten die Farbstoffmoleküle trotz Störung der Membranintegrität in die Zelle diffundieren. Insgesamt gesehen ist der Zusatz von Formalin zu Färbeverdünnungslösungen zu empfehlen, da hierdurch die Einstellung der Lösung auf fischisoomolale Verhältnisse entfallen kann.

Mit den Verdünnungsfärbelösungen nach Natt-Herrick und Dacies konnten die einzelnen Blutzellarten im Gegensatz zu den anderen Lösungen anhand der unterschiedlichen Anfärbbarkeit und Morphologie eindeutig identifiziert werden. Die Thrombozyten erschienen bei Verwendung der Dacie'schen Verdünnungslösung langgestreckt (spindelförmig), oval, tränentropfenartig oder mit langen und spitz zulaufenden Plasmafortsätzen, die Leukozyten einheitlich rund, selten geringgradig oval. Die runden Thrombozyten konnten aufgrund der heller blauen Anfärbung von den runden und dunkelblauen Leukozyten unterschieden werden. Bei der Zählung mit der Lösung nach Natt-Herrick ließen sich ähnliche Thrombozytenformen unterscheiden, die sich heller violett als die runden und dunkelvioletten Leukozyten anfärbten. Als Hinweis für die Zähl- bzw. Differenzierungsgenauigkeit kann die vergleichende Zählung der Erythro-, Leuko- und Thrombozyten mit den Verdünnern nach Dacies (Originalrezeptur, modifizierte Lösung) und Natt-Herrick gewertet werden. Bei allen drei Verdünnern unterschieden sich die absoluten Zellzahlen sowie die prozentuale Verteilung nicht signifikant voneinander.

Bei Verwendung der Differenzierungslösung nach Shaw (SHAW 1930) konnten die einzelnen Blutzellarten identifiziert werden, eine quantitativ-vergleichende Untersuchung bzw. weitere Anwendung entfiel aber aus folgenden Gründen: Ziel dieser Arbeit war es u.a., eine Färbelösung zu finden, bei der eine sichere Unterscheidung der Zellen schon bei der Zählung erreicht werden kann, um so eine schnelle und einfache sowie hinreichend genaue Zählmethode zu etablieren. Dies sind die Voraussetzungen für die Anwendung in der Routinediagnostik. In diese Betrachtungsweise ist auch der Zeitfaktor, die Haltbarkeit und der Herstellungsaufwand mit einzubeziehen. Die Lösung nach Shaw muß jedoch jeden Tag (Lösung A) bzw. wöchentlich (Lösung B) frisch angesetzt werden, so daß der Herstellungsaufwand zu hoch und diese Methode für die Routinediagnostik nicht oder nur bedingt geeignet ist.

Mit den Lösungen nach Dacies sowie nach Natt-Herrick konnten die Erythro-, Leuko- und Thrombozyten gleichzeitig differenziert werden. Aus diesem Grund kann zum einen auf die Verwendung der Hayem'sche Lösung, wie von SCHÄPERCLAUS et al. (1990) sowie AMLACHER (1992) vorgeschlagen, verzichtet werden. Zudem entfällt die Anwendung bzw. Entsorgung des umwelttoxikologisch bedeutsamen Quecksilberchlorids, das in dieser Lösung enthalten ist. Zum anderen kann die von LEHMANN und STÜRENBERG (1981) getroffene Empfehlung, wegen der Instabilität von Farbstofflösungen nur Zellkulturmedien für die Blutzellzählung zu verwenden, nicht nachvollzogen werden, zumal LEHMANN und Mitarb. später eine nach SHAW (1930) modifizierte Zählösung mit Farbstoffen angeben (LEHMANN et al. 1989). Beobachtungen zeigten, daß die Dacie'sche Lösung über einen Zeitraum von einem halben Jahr ohne Verlust der färberischen Eigenschaften verwendet werden kann. Die von HOUSTON (1990) angegebene Hendrick'schen Verdünnungslösung und die von HUNN et al. (1992) verwendete Lösung ist für die Blutzellzählung nicht geeignet, da die Blutzellmorphologie aufgrund der hohen Osmolalität stark verändert war. Hiermit besteht die Gefahr, daß pathologische Zellformen übersehen werden, zudem können die Leuko- und Thrombozyten nicht voneinander unterschieden bzw. ihre Zellzahl bestimmt werden. Dies macht eine getrennte Erythro-, Leuko- und Thrombozytenzählung mit unterschiedlichen Verdünnern notwendig, was den Arbeitsaufwand zusätzlich erhöht.

Ein weiterer Vorteil der nach Dacies und Natt-Herrick verwendeten Verdünnungslösungen war die mögliche Unterscheidung der verschiedenen Thrombozytenformen schon bei der Zählung in der Neubauerkammer, wie sie von ELLIS (1976, 1977) und BLÜM et al. (1988) für Fische beschrieben wurden.

Die eigenen Untersuchungen zeigten, daß in Abhängigkeit von der Osmolalität der Verdünnungslösungen die Form der Zellen wechselte ("Mikrozyten"). Da unterschiedliche morphologisch voneinander abweichende Thrombozytenformen verschiedene Funktionszustände darstellen (ELLIS 1977, BLÜM et al. 1988), kann bei einer Untersuchung des Blutgerinnungssystems, die die unterschiedlichen Thrombozytenformen miteinschließt, die Auswertung zu Mißinterpretation führen. Weiterführende quantitative Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit die verschiedenen Thrombozytenformen von der Wahl der Verdünnungslösung bzw. ihrer Zusammensetzung beeinflußt werden.

LEHMANN und STÜRENBERG (1981) sowie LEHMANN et al. (1994) führen die in der Literatur für ein und dieselbe Fischart angegebenen variablen Zellzahlen auf die uneinheitlichen hämatologischen Untersuchungsmethoden zurück. Dies konnte in den eigenen Untersuchungen prinzipiell bestätigt werden. Der Vergleich zweier Auswertungsverfahren belegte deutlich, daß eine einmal optimierte und konsequent weitergeführte Methode vergleichbare Zählergebnisse lieferte. Zum einen wurde die Erythro-, Leuko- und Thrombozytenanzahl anhand der Zählung in

der Neubauerkammer mit der Dacies-Lösung direkt bestimmt, andererseits aus dem Differentialblutbild berechnet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Diese Ergebnisse unterstreichen umso mehr die Notwendigkeit der Findung standardisierter, hämatologischer Untersuchungsmethoden.

Für die Differenzierung der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen wurden Blutausstriche angefertigt und mit verschiedenen Methoden (ROMANOWSKY, PAPPENHEIM, GIEMSA) angefärbt, da eine Bestimmung der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen mit der Dacie'schen und mit der nach Natt-Herrick zusammengesetzten Verdünnungslösungen nicht möglich war. In der angelsächsischen Literatur wird für die Differenzierung der Leukozyten häufig die Färbung nach **Romanowsky** angegeben, die auf der sukzessiven Anfärbung mit Leishman'scher und Giemsa-Lösung basiert (HOUSTON 1990, ELLIS 1976, 1977). BRUNO und POPPE (1996) betrachten die **Giemsafärbung** als eine Standardmethode für die Färbung von Blutausstrichen bei Fischen. AMIN et al. (1992) schlagen für die Anfärbung pisciner Blutzellen die **Diff-Quick**-Methode vor, die OIDTMANN (1994) für Regenbogenforellenblut verwendete. Daneben werden für Fische die Färbungen nach **Wright** oder **Leishman** angewendet (LEHMANN et al. 1994). In der deutschsprachigen Literatur wird vor allem die panoptische **Pappenheimfärbung** für Säuger- und Fischblut verwendet, sie ist eine kombinierte Anfärbung mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung (PLONAIT 1980, BLÜM et al. 1988, BEGEMANN und BEGEMANN 1989, NIEPAGE 1989, ROMEIS 1989, SCHÄPERCLAUS et al. 1990, AMLACHER 1992). Bei der Pappenheimfärbung ist das Färbeergebnis streng von den pH-Werten der Färbe- und Spüllösungen abhängig, die möglichst an die zu untersuchenden Blutzellen der jeweiligen Tierart angepaßt werden müssen (BLÜM et al. 1988, ROMEIS 1989, SCHÄPERCLAUS et al. 1990, LEHMANN et al. 1994. ). Weiterhin ist für die Färbetechnik die Färbedauer sowie die Farbstoffkonzentration zu beachten (LEHMANN et al. 1994). Der als optimal ermittelte pH-Wert sowie die gesamte Färbetechnik sollten dann für jede Fischart konsequent beibehalten werden (LEHMANN et al. 1994). Aus diesen Gründen wurden für beide Schritte der Pappenheimfärbung verschiedene Farbstoffkonzentrationen, Färbezeiten und pH-Werte ausgetestet und das Ergebnis der Zellanfärbung untereinander sowie mit den Angaben nach BLÜM et al. (1988) und ELLIS (1977) verglichen.

Mit der Anwendung von pH-Werten von 6,9 bis 7,4 der Pufferlösung sowohl bei der May-Grünwald- als auch bei der sich anschließenden Giemsafärbung konnten keine befriedigende Resultate erzielt werden. Das Zytoplasma der Erythrozyten nahm eine graurosa Färbung an, wobei mit steigenden pH-Werten der Giemsalösung bis 7,4 die Farbe von graurosa - graublau bis nach dunkelblau wechselte. Eine 1- bis 5-minütige Einwirkdauer von konzentrierter May-Grünwaldfärbung, eine 25- bis 30-minütige Inkubationsdauer mit einer 1:30 bis 1:50 verdünnten Giemsalösung und die Verwendung von mit Phosphatsalzen gepuffertem A. dest. (0.01 molare PBS, pH 6,5 - 6,8) in beiden Färbeschritten konnte das Färbeergebnis verbessern. Das

Erythrozyten-Zytoplasma erschien hellrosa, die Grenzen zwischen Zellkern und Zytoplasma waren klar abgesetzt, die in den Granulozyten vorhandenen Granula deutlich sichtbar und die Farbintensität aller Zellbestandteile kräftig. Mit diesen Färbebedingungen konnten die Farbcharakteristika erreicht werden, wie sie bei BLÜM et al. (1988) für Forellenblut beschrieben werden. Höhere Farbstoffkonzentrationen oder längere Färbezeiten führten zu einer Überfärbung, so daß die einzelnen Zellarten schlecht bzw. nicht mehr differenziert werden konnten.

Die May-Grünwald-Lösung stellt eine gesättigte Lösung von eosinsaurem Methyleneblau in Methanol dar. Die Giemsa-Lösung enthält Eosin, Methyleneblau, Methylazur und Methylviolett mit Glycerin und Methanol als Lösungsmittelvermittler. Es färbt Chromatin rotviolett, allerdings tritt dieser Effekt nur bei pH-Werten zwischen 6,8 und 7,0 auf (ROMEIS 1989). Sinkt der pH der Färbelösung, so wird der Blutaussstrich rotstichig, steigt er, so erscheint das Erythrozytenplasma blau (NIEPAGE 1989, RICK 1989). Dies konnte an Hand der eigenen Ergebnissen bestätigt werden, der optimale pH-Bereich lag jedoch nicht wie häufig angegeben im neutralen oder alkalischen, sondern im sauren Bereich.

Je nach pH-Wert ändern sich die Ladungen der Farbstoffe, die wiederum die Affinität des Farbstoffs zum Gewebe bzw. zu den Zellbestandteilen bestimmen (ROMEIS 1989). LEHMANN et al. (1994) geben an, daß keine optimale panoptische Färbung für die gleichzeitige Anfärbung der Blutzellen vom Karpfen gefunden werden konnte und daß jede Färbemethode ihre Vor- und Nachteile besitzt. Je nach verwendeten Farbstoffen bzw. Färbemethoden stellten sich die Granula der Granulozyten farblich unterschiedlich intensiv dar. Die Pappenheimfärbung ist nach LEHMANN et al. (1994) eine adäquate "Kompromiß"-Färbung und sollte in der Routinearbeit bevorzugt verwendet werden. Sie verwendeten für die May-Grünwald-Lösung Färbezeiten von insgesamt 4 Minuten bei einem pH-Wert von 7,2. Die Giemsa-Stammlösung war im Verhältnis 1:33 mit Leitungswasser verdünnt, dessen pH-Wert bei 6,5 lag; die Färbedauer betrug 60 Minuten. Diese Werte stimmen insofern mit den eigenen Ergebnissen überein, als der pH-Wert für die Giemsa-Färbung in einem ähnlich niedrigen Bereich lag. Der für die Färbung gewählte pH-Bereich zwischen 6,5 bzw. 6,8 in den eigenen Untersuchungen für alle zwei Färbeschritte stellte für Bachforellenblut die optimalste Lösung dar.

Für jede Fischart sollte die optimale Färbemethode gesondert gefunden werden, denn für das Blut verschiedener Fischarten können unterschiedliche Optimalbedingungen herrschen. Dies könnte zum einen die relativ variablen Angaben für die Färbebedingungen in der Literatur erklären (ELLIS 1976, BLÜM et al. 1988, SCHÄPERCLAUS et al. 1990, HOUSTON 1990, AMLACHER 1992, LEHMANN et al. 1994, BRUNO und POPPE 1996). Ein weiterer Grund könnte in der kritiklosen Übernahme von human- oder veterinärmedizinischen Färbvorschriften liegen, die ohne Adaptation an das Fischblut angewendet werden.

DEUFEL und PÖLLNITZ (1977) geben an, daß Färbemethoden aus der allgemeinen medizinischen bzw. veterinärmedizinischen Literatur ohne Variationen für Fischblut übernommen werden können, was durch die eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden

konnte. Die Färbvorschriften sollten nur als prinzipielle Vorlagen verwendet werden, die dann in mehreren Schritten optimiert bzw. standardisiert werden müssen. Darauf machten auch schon LEHMANN et al. (1994) aufmerksam.

Bei der Übernahme von Färbvorschriften sind weiterhin folgende Faktoren mit zu berücksichtigen: Ein Problem stellt die Verwendung von A. dest. bzw. dem verwendeten Verdünnungspuffer dar ("gepuffertes A. dest."). A. dest. besitzt nur einen theoretischen, d.h. rein rechnerisch ermittelten pH-Wert von genau 7,0. Aufgrund der Diffusion von Luftkohlendioxid nimmt es geringere pH-Werte an (PLONAIT 1980). Die alleinige Angabe der Verwendung von "neutralem A. dest." oder nur "A. dest." ist ungenügend, sofern nicht Angaben über die Verwendung von gepuffertem A. dest. bei genau eingestelltem pH-Wert zu finden sind. Es besteht die Gefahr, daß der pH-Wert durch die Färbelösungen bestimmt wird oder die Färbung nicht im neutralen Milieu aufgrund der "Neutralitätsannahme" stattfindet. Dies kann zu starken Veränderungen der färberischen Qualität des Blutausrichs führen - wie in der eigenen Arbeit dargestellt. Von Wichtigkeit ist zudem die Angabe der Molarität der für die Abpufferung des A. dest. verwendeten Lösung. Denn die eigenen Ergebnisse zeigten, daß mit einer 0.01 molaren Phosphatpufferlösung der End-pH-Wert der Färbelösungen von 6.5 bzw. 6.8 nicht erreicht wurde (Tabelle 24; S. 124). Die Pufferkapazität reichte hierfür nicht aus. Es ist deshalb zu beachten, daß je nach Wahl bzw. Wechsel einer einmal gewählten Pufferkonzentration sich der pH-Wert verändert, der dann möglicherweise das Färberegebnis stark beeinflussen kann. Nur selten sind hierzu Angaben in der Literatur vorhanden; SCHÄPERCLAUS et al. (1990) geben für die Abpufferung des A. dest. eine 5 %-ige  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung an.

Die Romanowskyfärbung wurde mit der von HOUSTON (1990) angegebenen Technik durchgeführt, die im ersten Schritt eine Methanolfixierung mit anschließender Färbung mit Leishman'scher Lösung beinhaltet. Der zweite Färbeschritt wurde mit gepuffertem Giemsalösung durchgeführt. Die für die Färbung des Bachforellenblutes verwendete Leishman'sche Lösung enthielt Eosin-Methylenblau mit einem Methanolgehalt > 50 % (Merck), die Giemsalösung wurde im Verhältnis 1:10 mit gepuffertem A. dest. (pH 6.4) verdünnt. Die nach dieser Färbeprozedur beobachtete Zerreißen der Zellen und der hohe Abschwemmverlust von Zellen ist vermutlich auf die übermäßig lange Behandlung des Ausstrichs mit Methanol zurückzuführen: Zum einen erfolgte eine 5-minütige Methanolfixierung, zum anderen enthielt die Leishman'sche Lösung zusätzlich Methanol. Eine zu lange Methanolfixierung führt nach ROMEIS (1989) zu einer Zerstörung der Blutzellen, was nach den Ergebnissen auch für Fischzellen gilt. Die Anleitung für die Romanowskyfärbung, wie von HOUSTON (1990) beschrieben, ist unvollständig: Es ist die Angabe "kommerzielle gepufferte Giemsalösung" zu finden, jedoch fehlen Angaben über das Verdünnungsverhältnis oder den pH-Wert. Es ist hier nicht abzuklären, inwieweit die von HOUSTON verwendeten Farbstofflösungen schon vorgefertigte, d.h. standardisierte Lösungen darstellten. So kann eine

ohne Methanol angesetzte Leishman'sche Lösung die vorhergehende Fixation mit Methanol rechtfertigen. In ähnlicher Weise kann die Färbung, wenn es sich um eine standardisierte bzw. vorgefertigte "kommerzielle" Giemsalösung handelt, ohne vorhergehende Verdünnung oder pH-Werteinstellung erfolgen. Es ist festzuhalten, daß selbst für Fischblut angegebene Färbvorschriften nicht ohne weiteres übernommen werden dürfen, wenn ungenaue bzw. nicht genügende Angaben vorlagen. ROBERTS (1989) erwähnt, daß die Romanowskyfärbung unter anderem aufgrund der Verwendung von Fixativen zu unterschiedlichen Färbeergebnissen führen kann und das eine Vorschrift genaue Angaben über die Fixationsmethode enthalten soll.

Die Giemsa-Färbung führte zu ähnlich guten Ergebnissen wie die Pappenheimfärbung. BRUNO und POPPE (1996) verwendeten eine mit Puffer (pH 6,8) im Verhältnis 1:10 verdünnte Giemsalösung. Dies stimmte mit der schon bei der Pappenheimfärbung gefundenen Verdünnung der Giemsalösung mit gepuffertem A. dest. (pH-Wert 6.5) gut überein. Eine Zerreißung von Zellen trat nicht auf, da die Methanolfixierung nur 1 bis 2 Minuten andauerte.

Es ist zusammenfassend festzuhalten, daß die Beurteilung bzw. Auswertung der Färbeergebnisse in gewissen Grenzen der subjektiven Beurteilung des Untersuchers unterliegt, zudem verlangt die Bewertung der färberischen Qualität einige Zuverlässigkeit und Erfahrung des Betrachters. Man kann jedoch mit einem mehr oder weniger geringem Aufwand die jeweilige Färbetechnik nach Angaben aus der Literatur an die Fischart anpassen und nach Optimierung konsequent unter denselben Bedingungen durchführen. Mit den Literaturangaben als Vergleich gelangt man zu Ergebnissen, die eine sichere diagnostische Aussage an Hand des gefärbten Blutausrichs zulassen. Es existieren für die Farbstoffkonzentrationen und Färbedauer - wie die eigenen Ergebnisse zeigten - keine exakt definierten Optimalwerte, sondern lediglich Optimalbereiche. So konnte eine gleichbleibend gute Qualität der Anfärbung bei der May-Grünwaldfärbung zwischen 1 und 4 Minuten erzielt werden. Die Verdünnungen bei der Giemsaanfärbungen lagen bei guter färberischer Qualität zwischen 1:30 und 1:50, wenn eine Inkubationsdauer bis 30 Minuten und ein pH-Wert der Verdünnungslösung zwischen 6.5 und 6.8 gewählt wurden. Bei Verdünnungen von 1:10 oder 1:20 und einer Färbedauer > 30 Minuten konnten die Blutzellen aufgrund der Überfärbung schwer oder überhaupt nicht mehr differenziert werden.

### **Anfärbung der Blutzellen mit der *optimierten* Pappenheimmethode**

Die Färbeergebnisse bei Anwendung der optimierten Pappenheimfärbung wurden mit den Angaben nach BLÜM et al. (1988) verglichen. In Übereinstimmung mit ihren Angaben erschienen die Erythrozyten der Bachforellen von ovaler Gestalt mit rotvioletter Zellkern und hellrosa angefarbtem Zytoplasma. Charakteristisch für die Bachforellenlymphozyten war ihr dünner und kräftig blau angefarbter Zytoplasmasaum. Die Monozyten waren neben den

Erythrozyten die größten Zellen, sie imponierten besonders durch die Pleomorphie des Zellkerns. Im Vergleich zu den großen Lymphozyten erschien ihr Zytoplasma hellblau. Im Gegensatz zu den Angaben nach BLÜM et al. (1988) und HOUSTON (1990) erschien das Zytoplasma der ausgereiften Granulozyten schwach hellblau und nie hellrosa, die der Metagranulozyten und Granuloblasten stark blau. Die eosinophil granulären Zellen besaßen rotgefärbte und deutlich vom hellrosa Zytoplasma abgesetzte zytoplasmatische Granula. Basophile Granulozyten wurden bei den Bachforellen entsprechend den Angaben von BLAXHALL und DAISLEA (1976) sowie HOUSTON (1990) nicht identifiziert. Die Thrombozyten waren von wechselnder Gestalt. Analog der Zelldifferenzierung mit den Dacie'schen Färbelösungen traten neben überwiegend runden und ovalen Zellformen langgestreckte (spindelförmige) Zellen oder Thrombozyten mit spitz zulaufenden Zytoplasmafortsätzen auf. Im Unterschied zu den runden Lymphozyten war ihr Plasma nur schwach hellblau oder ungefärbt. Die von ELLIS (1976) beobachteten "lone nucleus" - Formen wurden in den eigenen Untersuchungen nicht gefunden, es war in allen Fällen ein schmaler Zytoplasmasaum erkennbar. Im Gegensatz dazu geben BOGNER und ELLIS (1977) an, daß ein durch Stressoren verursachter Zytoplasmaverlust der Thrombozyten, die Lympho- von den Thrombozyten nur schwer oder überhaupt nicht unterscheidbar werden läßt. Deshalb variieren die Angaben des Verhältnisses von Lymphozyten- zu Thrombozyten stark. McCARTHY et al. (1973) geben bei der Regenbogenforelle ein Verhältniss von 50:1, WEINREB (1958) eines von 2:1 an. ELLIS (1976) fand verschiedene Verhältnisse je nach verwendeter Differenzierungstechnik. Er stellt fest, daß die panoptische Anfärbung der Blutzellen die Methode der Wahl darstellt.

### **Bestimmung verschiedener Blutparameter**

Die Bestimmung des **Hämoglobingehaltes** erfolgte mit der Zyan-Methämoglobinmethode, die für Fische als standardisierte Methode anzusehen ist (SCHÄPERCLAUS et al. 1990). Da mit einem Filterphotometer gearbeitet wurde, war die Bestimmung des Hämoglobingehaltes mittels einer vorher aufgestellten Eichgeraden notwendig. Dies ist von Wichtigkeit, da das Lambert-Beer'sche Gesetz nur für monochromatisches Licht gültig ist (RICK 1989). Dies zeigte auch der Methodenvergleich: Die Ermittlung der Hämoglobinkonzentration aus der Ausgleichsgeraden führte im Vergleich zu der Berechnung mit dem Faktor 36,80 zu durchschnittlich 16 % höheren Werten.

Es ist fraglich, ob die Berechnung mittels des Faktors von 36,8 für die Hämoglobinbestimmung bei Fischen gerechtfertigt ist. Dieser Faktor wird auf Grund des Molekulargewichtes für humanes Hämoglobin berechnet (RICK 1989): 1 µmol Hämoglobin/ml, entsprechend einer Hämoglobinkonzentration von 64,5 mg/ml (Molekulargewicht von Hb = 64456), zeigt eine Extinktion von 44 (546 nm).

Eine Extinktion von 1,0 entspricht damit einem Verhältnis von 64,5 mg zu 44,0. Berücksichtigt man die Verdünnung von 1:251 so ergibt sich für die Berechnung der Hämoglobinkonzentration für den Menschen der Faktor 36,8 nach

$$\frac{6,45 \times 251}{44,0} = 36,8$$

Es gibt Hinweise, daß das Molekulargewicht von menschlichem Hämoglobin nicht mit dem der Fische übereinstimmt. IUCHI (1973) stellte bei adulten Regenbogenforellen ein Molekulargewicht von 55000 fest. Zudem ist der mikromolare Extinktionskoeffizient für Forellen nicht bekannt. Demzufolge muß - solange keine eigenen Standardlösungen für Forellenblut existieren - die Hämoglobinkonzentration mit einer Eichgeraden errechnet werden (LARSEN und SNIESZKO 1961, LEHMANN 1994, 1995 mündl. Mitt.).

Die **Hämatokritbestimmung** erfolgte mittels der Mikrohämatokritmethode. Für die Bestimmung muß für jede Tierart die Zentrifugationsbedingungen gesondert festgelegt werden (NIEPAGE 1989). Die Ergebnisse zeigten, daß mit einer Umdrehungszahl von 12500 U/min 4 bis 8 Minuten zentrifugiert werden mußte, um konstante Hämatokritwerte zu erhalten. Andere Autoren benutzten bei Forellenblut Umdrehungszahlen zwischen 10500 und 12000 U/min für 3 bis 5 Minuten (HESSER 1960, BLAXHALL und DAISLEA 1973, CYRIAC et al. 1989). Die von SCHÄPERCLAUS et al. (1990) geforderten Werte von 3 Minuten bei 3000 U/min oder von HOUSTON (1990) angegebenen Werte von 5 Minuten bei 7000 U/min sind für Bachforellenblut zu gering bemessen.

### **Beeinflussung verschiedener Blutparameter durch EDTA und Heparin**

Für die Hemmung der Blutgerinnung werden in der Fisch-Hämatologie gewöhnlich zwei auf verschiedenen Prinzipien basierende Antikoagulantien verwendet (HOUSTON 1990, AMLACHER 1992): Chelatoren, die das für die Blutgerinnung verantwortliche Kalzium abfangen und so die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin hemmen (SPAETHE 1984). Hierzu zählen Oxalat, Citrat und EDTA. Eine andere Wirksubstanz stellt Heparin dar, ein Mukopolysaccharid, das als Antithrombin fungiert. (HOUSTON 1990). EDTA und Heparin werden bevorzugt verwendet, da die anderen Antikoagulantien zu starken Veränderungen des Blutbildes führen. Heparin stellt hierbei das Mittel der Wahl dar (SMIT und HATTINGH 1980, HOUSTON 1990). Im allgemeinen werden Heparinkonzentrationen zwischen 0,30 und 0,75 mg für 1 ml Blut, entsprechend 50 - 100 USP-units, verwendet (BLAXHALL 1973, HATTINGH 1975; SMIT et al. 1977, HOUSTON 1990). In den eigenen Untersuchungen wurden für eine

Blutgerinnungshemmung Heparinkonzentrationen von 0,24 mg/ml Blut (41 USP-units) ermittelt, was mit der geringsten empfohlenen Konzentration von 0,30 mg/ml Blut annähernd übereinstimmt (HOUSTON 1990) und nahe der von HESSER (1960) und SMIT und HATTINGH (1980) angegebenen Konzentration von 0,4 bzw. 0,5 mg/ml Blut liegt.

Die eigenen Versuche zeigten, daß mit Erhöhung des Heparinvolumens die Blut-pH- und die Hämatokritwerte sowie die Hämoglobinkonzentrationen abnahmen. Die Osmolalität wurde hiervon nur wenig beeinflusst. Durch die Zugabe von verschiedenen Heparinvolumina (0-100 µl) wurde das Blut verdünnt, so daß der Hämatokritwert sowie die Hämoglobinkonzentration abnahmen. Die Verringerung des Blut-pH-Wertes ist auf den niedrigen pH-Wert der in PBS angesetzten Heparinlösung (pH 7,05) zurückzuführen. Dies kann durch die Ergebnisse von SMIT und HATTINGH (1980) bestätigt werden, die ebenfalls eine Abnahme der pH-Werte bei Verwendung von Heparin feststellten.

Neben dem Verdünnungseffekt als beeinflussende Größe führten noch andere Faktoren zu Veränderungen der Blutparameter. So waren der Hämatokritwert und die Blutosmolalität von der Wahl des Antikoagulans (Heparin, EDTA) abhängig. Besonders auffällig war der signifikante Hämatokritwert-Abfall bei Gewinnung des Blutes (genau 1 ml) in mit EDTA beschichteten Monovetten im Vergleich zu Nativblut, gleichzeitig wurde eine signifikante Erhöhung der Plasmaosmolalität festgestellt. Bei der Anwendung von Heparin (24 mg/ml Blut, 30 µl) wurde demgegenüber ein geringerer Hämatokritwertabfall ermittelt, die Abweichungen zwischen Serum- und Plasmaosmolalität war nicht signifikant voneinander unterschiedlich.

Weiterhin wurden in Abhängigkeit vom gewonnenen Blutvolumen der Hämatokritwert und die Blutosmolalität bei Verwendung von EDTA-Monovetten verändert. Mit Erhöhung der Blutmenge von 0.5 auf 2.5 ml nahmen die Hämatokritwerte zu, die der Osmolalität hierzu gegenläufig ab (Abb. 6; S. 135).

Eine mögliche Erklärung ist, daß sich bei Befüllung der Monovetten mit Blut und nach Vermischen das EDTA von der Wandung löste. Dies führte zu einem Anstieg der Plasmaosmolalität über die fischisoomolalen Verhältnisse hinaus. Der damit verbundene Wasseraustritt und die gleichzeitige Volumenverminderung der Blutzellen führten zu erniedrigten Hämatokritwerten. Die mit steigender Blutmenge zunehmenden Hämatokritwerte kamen durch die geringeren EDTA-Konzentration pro Volumeneinheit zustande.

Bei Verwendung von Heparin wurde aufgrund ähnlicher osmolaler Verhältnisse des Fischserums (328 mosm/kg) zur Heparinlösung (305 mosm/kg) der Hämatokritwert weniger beeinflusst; er sank gegenüber der Anwendung von EDTA (14 %-ige Reduktion) nur um 8 %.

In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen stellte ALLEN (1993) bei Buntbarschen (*Oreochromis aureus*) mit steigenden Heparinkonzentrationen abnehmende Hämatokritwerte fest. Hierbei wurde die geringste Abnahme bei der Verwendung von 25 IU/ml Heparin, das in 0.9 %-iger NaCl vorgelöst wurde, ermittelt. Die höchste Reduktion trat bei 500 IU/ml, gelöst in

A. dest. auf. Er kommt zu dem Schluß, daß die geringeren Abweichungen der Hämatokritwerte aufgrund der ähnlichen Osmolalität der Heparinlösung zum Fischblut zustande kamen; die Osmolalität des Plasmas betrug ebenso wie die der Kontrolle (Nativblut bzw. Serum) 313 mosm/kg. SMIT und HATTINGH (1980) fanden, daß die von ihnen verwendete Heparinlösung aufgrund ähnlicher pH-Werte und Osmolalität (7,04 bzw. 380 msom/kg) zum Fischblut zu den geringsten Hämatokritwertabweichungen führten. BLAXHALL (1973) stellte bei Verwendung von Heparin die geringsten Veränderungen des Zellvolumens fest, die höchsten Abweichungen traten bei Verwendung hoher EDTA-Konzentrationen infolge einer Erythrozytenschwellung auf.

Sowohl BLAXHALL (1973) als auch HATTINGH (1975) stellten demgegenüber mit Steigerung der Heparin- und EDTA-Konzentrationen eine Zellvolumenzunahme und damit eine Erhöhung der Hämatokritwerte fest. Zudem traten bei hohen EDTA-Konzentrationen (4-5 mg/ml Blut) eine Hämolyse auf. HATTINGH (1975) führt dies auf eine Desintegration der Zellmembrane oder auf eine durch die Antikoagulantien auftretende osmotische Imbalanz zurück. Die Gründe für eine von diesen Autoren gefundene Hämatokritwert-Erhöhung sind nur zu vermuten. Zum einen geben die Autoren nicht das gewonnene Blutvolumen an. Zum anderen könnte ein weiterer Grund in den für die Untersuchungen unterschiedlichen Fischarten zu suchen sein. HATTINGH (1975) verwendete Fischarten aus der Familie der Karpfenartigen (Cyprinidae; Carias, Labeo, Cyprinus und Barbus). Zudem trat innerhalb von 1-2 Stunden Hämolyse auf, so daß für diese Fischarten toxische Effekte des EDTA's zu vermuten sind, die mit einer Zellschwellung einhergingen. BLAXHALL (1973) verwendete Regenbogenforellen. Weder bestimmten die Autoren die Serum- oder Plasmaosmolalität des Fischblutes noch die der Heparin- bzw. EDTA-Lösungen.

Die Bestimmung der Hämatokrit- und pH-Werte, der Hämoglobinkonzentrationen sowie der Osmolalität als wichtige diagnostische Kenngrößen geben über den Gesundheitsstatus einer Fischpopulation Auskunft (BLAXHALL 1972, ANDERSON 1990, HOUSTON 1990, ALLEN 1993, WESTER et al. 1994). Besonders können hierdurch akute sowie chronisch vorliegende Stressoren aufgedeckt werden (CAIRNS und CHRISTIAN 1978, BARTON et al. 1985). Daneben stellen sie Bioindikatoren dar, die zusammen mit der Plasmaproteinkonzentration wertvolle Hinweise auf das Vorliegen von Anämien, Hypoproteinämien oder einer Leukozytose beim Fisch geben können (PLONAIT 1980, SCHÄPERCLAUS et al. 1990, KLONTZ 1994). Die Werte sind von verschiedenen Umweltfaktoren und von der Handhabung der Fische während der Blutentnahme abhängig.

Die vorliegenden Untersuchungen sowie die Hinweise in der Literatur unterstreichen somit die Notwendigkeit, je nach Fischart die Art des Antikoagulans sowie seine adäquate Konzentration zu ermitteln. Bei einem Wechsel des Antikoagulans bzw. bei Verwendung der in der Humanmedizin üblichen EDTA-Monovetten ist Vorsicht geboten, da dies zu veränderten und

bei Verlaufsuntersuchungen zu nicht mehr interpretierbaren Ergebnissen führt. Generell sollte bei der Bestimmung der pH- und Hämatokritwerte sowie der Hämoglobinkonzentrationen, wenn nicht vermeidbar, auf ein Antikoagulans verzichtet werden, da die absoluten Werte dieser Kenngrößen zwischen verschiedenen Autorengruppen vergleichbarer werden. Wenn sich die Verwendung eines Antikoagulans nicht vermeiden läßt, sollte Heparin angewendet werden, da es die Blutwerte beim Fisch am wenigsten verändert (HESSER 1960, BLAXHALL 1972, 1973, SMIT und HATTINGH 1980). Diese Aussage konnte durch die eigenen Ergebnisse bestätigt werden.

Die Fragilität der Erythrozyten wurde bei adulten Bachforellen, die im Wasserdurchlaufsystem gehalten wurden, gemessen. Da in der Literatur keine Daten über die Minimal- und Maximalresistenz für Bachforellen-Erythrozyten existieren, kann ein Vergleich nicht angestellt werden. BARHAM et al. (1988) fanden bei mit Benzocain betäubten Buntbarschen (*Oreochromis mossambicus*) eine 100 %-ige Hämolyse, wenn eine 0,2 bis 0,3 %-ige, FERREIRA et al. (1981a) bei Karpfen (*Cyprinus carpio*), wenn eine 0,22 %-ige NaCl-Lösung verwendet wurde. Die Hämolyse war zudem von der Benzocainkonzentration und vom pH-Wert der Betäubungslösung abhängig. Ab 50 mg Benzocain/l Wasser sank die Maximalresistenz bei Verwendung von ungepuffertem Benzocain-HCl von 0,34 auf 0,30 (80 mg Benzocain/l) und stieg bei noch höheren Konzentrationen wieder an (FERREIRA et al. 1981a). Auffallend ist, daß die Bachforellen-Erythrozyten ähnliche Werte aufweisen wie Hühner-Erythrozyten. Tabelle 44 zeigt vergleichend die verschiedenen Minimal- und Maximalresistenzen (nach EDER 1987 und BARHAM et al. 1988) und die in den eigenen Untersuchung bei Bachforellen festgestellten Werte. Vermutlich führen gleichartige Membraneigenschaften der Erythrozyten zu einer vergleichbaren Fragilität der Membranen (beiden Arten besitzen kernhaltige Erythrozyten).

**Tabelle 44:** Osmotische Resistenz der Erythrozyten bei verschiedenen Tierspezies (nach EDER 1987 und BARHAM et al. 1988) im Vergleich zu den gefundenen Werten bei Bachforellen.

Tierspezies	Minimalresistenz [% NaCl-Lösung]	Maximalresistenz [% NaCl-Lösung]
Katze	0,69	0,50
Pferd	0,59	0,39
Hund	0,46	0,33
Huhn	0,40	0,32
<b>Bachforellen</b>	<b>0,40</b>	<b>0,27</b>
Buntbarsch	o.A.	0,20 - 0,30
Karpfen	o.A.	0,22 - 0,30

o.A. ohne Angaben

## 5.3 BLUTBILDUNTERSUCHUNGEN

### 5.3.1 VERGLEICH DES BLUTBILDES VON IM WASSERDURCHLAUF- UND KREISLAUFSYSTEM GEHALTENEN BACHFORELLEN

Bei den Blutbildveränderungen der im Wasserkreislauf- bzw. Durchlaufsystem gehaltenen Bachforellen müssen für eine Interpretation verschiedene Aspekte berücksichtigt werden:

I. Die Blutbildveränderungen, wie sie im Kreislaufsystem vorlagen, sind als Antwort der Fische auf die summarische Wirkung aller Wasserinhaltsstoffen zu verstehen. Weitere Untersuchungen müßten hier zeigen, inwieweit die Einzelbestandteile im Wasser das Blutbild bzw. die zellulär-immunologische Blutparameter beeinflussen.

II. Die Fische im Wasserkreislaufsystem waren an die Haltungsbedingungen (Beckenform, Besatzdichte) adaptiert, befanden sich jedoch hinsichtlich der Wasserparameter (Nitrat, Sulphat, Phosphat, pH-Wert) in einem sich ständig an die veränderten Werte adaptierenden Zustand: Wie Abbildungen 7 und 8 (S. 138) zeigen, nahmen die Nitrat-, Sulfat- und Phosphatwerte im Wasserkreislaufsystem fortlaufend zu, die Blutwerte wurden jedoch zu einem definierten Zeitpunkt gewonnen. Die Fische mußten sich stetig an die neuen Milieubedingungen anpassen. Demgegenüber befanden sich die im Wasserdurchlaufsystem gehaltenen Bachforellen aufgrund der konstanten und für Forellen optimalen Wasserqualität in einem annähernd gleichbleibenden adaptierten Zustand. LLOYD (1992) sowie HAMERS (1995c) trafen die allgemeine Aussage, daß der Fisch wegen seiner besonderen Lebensweise im Wasser sich permanent an wechselnde Milieu- oder Haltungsbedingungen adaptieren muß.

III. OIDTMANN (1994) machte darauf aufmerksam, daß bei der Beurteilung hämatologischer Veränderungen keine umfassenden Normwerte bei verschiedenen Altersstadien vorliegen und daß deshalb der Vergleich ihrer Werte mit denen anderer Untersuchungen schwierig ist. Der Vergleich der in ihren Untersuchungen ermittelten Ergebnisse mit den Normwerten, die von LEHMANN et al. (1976) für Regenbogenforellen festgestellt wurden, würde eine massive Immunsuppression anzeigen. OIDTMANN (1994) argumentierte, daß das Blutbild nur mit anderen Ergebnissen verglichen werden dürfe, wenn sich die Methodik ähnelte. Die zellulären und biochemisch-physikalischen Blutwerte sind von der Fischart bzw. Herkunft, Größe, Alter, Haltungsart, Meßmethode, Wasserqualität und Betäubungsart abhängig (SMIT et al. 1979, HILLE 1982, LOWE-JINDE und NIIMI 1983, ELLSAESSER und CLEM 1987). Über die verwendeten Anaesthetika oder anderer Einflußgrößen sind in Übersichtsarbeiten (SCHÄPERCLAUS et al. 1990, AMLACHER 1992) keine Angaben zu finden, was die Interpretationen und Vergleichbarkeit der Normwerte mit den eigenen Ergebnissen erschwert. Weiterhin sind der Versuchsaufbau bzw. die in den Versuchen herrschenden Bedingungen zu

unterschiedlich, so daß ein Vergleich mit "Normwerten" aus der Literatur nur bedingt angebracht bzw. sinnvoll ist. Für Bachforellen existieren nach Auswertung der gesichteten Literatur nur sehr wenige Angaben zum Blutbild. In Tabelle 45 (S. 172) sind die von CATTON (1951), LARSEN und SNIESZKO (1961), BLAXHALL und DAISLEA (1973) sowie die von PICKERING et al. (1982) ermittelten Blutnormalwerte für Bachforellen aufgelistet.

**Tabelle 45:** Blutwerte für Bachforellen nach verschiedenen Autoren.

	BLAXHALL und DAISLEA (1973)	PICKERING et al. (1982)	LARSEN und SNIESZKO (1961)	CATTON (1951)	PALACKOVA und ADAMEK (1992)
Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /μl]	0,606 - 1,31 0,995 ± 0,160	0,949		1,00 - 1,45	
Thrombozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]		0,87		0,20	
Leukozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	0,20 - 6,30 1,154 ± 0,906		2,3 - 4,6		
Lymphozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	*0,646 - 1,154	4,0			
%	56 - 100				
Monozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]					
Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	*0 - 0,289	0,13			
%	0 - 25				
Metamyelozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	*0 - 0,127				
%	0 - 11 1,4 ± 2,3				
Myelozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	*0 - 0,092				
%	0 - 8 1,6 ± 1,9				
Blasten [x10 <sup>4</sup> /μl]	*0 - 0,046				
%	0 - 4 0,3 ± 0,7				
Hämoglobin [g/100 ml]			8,8		6,77
Hämatokrit [%]	20 - 43 32 ± 4,88				

\* berechnet nach den Prozentzahlen, als Bezugsgröße diente die absolute Anzahl der Leukozyten.

Die Blutbildveränderungen der im Kreislaufsystem gehaltenen Bachforellen können auf die veränderte Wasserqualität zurückgeführt werden. Die Haltungsbedingungen, wie Besatzdichte, Temperatur, Einzelgewichte, Beckenform, Fütterung, Betäubung und "Handling" waren zwischen den beiden Haltungssystemen vergleichbar. Bei den Wasserwerten konnten jedoch

Unterschiede festgestellt werden. Im Kreislaufwasser akkumulierten Sulphat-, Phosphat-, Nitrit sowie Nitrat-Ionen, die Karbonathärte war erniedrigt. Besonders auffällig war die im Vergleich zur Durchlaufhaltung um das 25- bis 44 - fach erhöhte Nitratkonzentration. Die Erhöhungen der anderen Ionen im Kreislaufwasser betragen das 1 bis 2- (Sulfat), 4 bis 8- (Phosphat) und 2-fache (Chlorid). Die toxikologisch relevanten Ammoniak- sowie Nitritkonzentrationen lagen um den Faktor 5 bzw. 7 höher als im Wasserdurchlaufsystem. Wie die Nitratkonzentrationen erreichten sie jedoch nicht die für Forellen in der Literatur angegebenen toxischen Grenzwerte (BRAUN 1971, WEDEMEYER und YASUTAKE 1978, BOHL 1982)

Die erhöhten Konzentrationen dieser Stickstoffverbindungen im Kreislaufsystem waren eine Folge der mikrobiellen Umsetzung des Exkretionsproduktes Ammoniak: Im Kreislaufwasser wurde das für Fische hochgiftige Ausscheidungsprodukt Ammoniak in den Biofiltern im Verlaufe der mikrobiellen Nitrifikation zu dem mindergiftigen Nitrat oxidiert (OLIVER 1957, SPOTTE 1970, PAINTER 1977, MUDRAK und KUNST 1991, LANDAU 1992, SCHLEGEL 1992, SCHWOERBEL 1993). Die bei der Nitrifikation gebildeten Säureäquivalente werden durch das im Wasser enthaltenen Hydrogenkarbonat abgepuffert, dabei werden 7,2 mg CaCO<sub>3</sub> für die Oxidation von 1 mg NH<sub>3</sub>-N verbraucht. Erkennbar ist dieser Prozess, wie in den eigenen Ergebnissen dargestellt, an der sinkenden Karbonathärte bzw. sinkenden Alkalität (SAEKI 1958, HIRAYAMA 1970, HAUG und McCARTY 1972).

Auffällig war, daß bei gleichbleibender Erythrozytenanzahl, geringgradig verringerten MCHC- Werten und erhöhten Hämoglobinkonzentrationen, die MCH-, MCV- und Hämatokritwerte bei den Tieren des Kreislaufsystems signifikant erhöht waren. Dies deutet auf eine Hämokonzentration und eine Vergrößerung der Erythrozyten hin. Die Ursache für die Erythrozytenschwellung war ein höherer Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (steigender MCH-Wert). Somit ist auch der erhöhte Hämatokritwert erklärbar, der nicht, wie die Ergebnisse der Zellzählung zeigten, auf eine Zunahme der Erythrozytenanzahl zurückzuführen, sondern Ausdruck der erhöhten Hämoglobinkonzentration in den Einzelzellen war.

Wodurch die Hämokonzentration zustande kam, kann nur vermutet werden. Eine Erklärungsmöglichkeit bieten LOCHMILLER et al. (1989), die bei Felsenbarschen (*Morone saxatilis*) nach chronischem Stress eine Suppression der Erythrozytenproduktion in der Niere feststellten. In Einklang mit diesen Untersuchungen stehen die Ergebnisse von PETERS und SCHWARZER (1985), die bei Einwirkungen von chronischen Stressoren eine Abnahme der Hämoblasten in der Vorniere fanden. Der von LOCHMILLER et al. (1989) beobachtete erhöhte Hämoglobingehalt der Einzelerythrozyten (MCH) und die damit verbundene Zellvergrößerung (MCV-Wert) kamen aufgrund der geringeren Zellzahlen unreifer Erythrozyten zustande; verminderte MCH- oder MCHC-Werte werden mit dem geringeren Hämoglobingehalt der in den Blutstrom entlassenen jungen Erythrozyten bzw. erythroblastären Stadien erklärt (SOIVIO et al.

1977, LIMSUWAN et al. 1983). Einen weiteren Hinweis hierfür liefert die Tatsache, daß Erythroblasten bei Fischen - im Gegensatz zu den Säugern - ein kleineres Volumen einnehmen als die reifen Zellen (FERGUSON 1989). Mit einer Störung der Erythropoese durch chronische Streßeinwirkung kann ein verminderter Anteil der Erythroblasten zu einem erhöhten Hämoglobingehalt führen. Voraussetzung ist jedoch hierbei, daß die Erythrozyten in genügendem Maße bzw. über ein bestimmtes Maß hin nachgebildet werden können.

In der eigenen Arbeit wurden die Erythroblasten nicht von den Erythrozyten getrennt ausgewertet. Hier könnten Untersuchungen über das Verhältnis der Blastenstadien und Erythrozyten zur weiteren Klärung der Frage beitragen, ob und in welchem Maße eine Störung der Erythropoese vorliegt.

Weiterhin kann eine Hämokonzentration durch eine Verringerung des Plasmavolumens bei unveränderten Erythrozytenzahlen auftreten. Dies könnte die steigenden MCH- und MCV-Werte erklären. So konnten BARTON et al. (1987) eine Hämatokritwert-Steigerung bei Verfütterung von Kortisol feststellen, die nicht auf eine Steigerung der Erythropoese zurückführbar war, sondern durch eine (kortisolabhängige) Umverteilung der Extrazellulärflüssigkeit relativ zum Blutvolumen zustande kam. Die sich im Kreislaufsystem ständig verschlechternde Wasserqualität könnte bei den Bachforellen zu einer vermehrten Kortisolausschüttung geführt haben, die, in ähnlicher Weise wie von BARTON et al. (1987) beobachtet, zu der Hämokonzentration führte.

Charakteristische Veränderungen bei Einwirkung von Stressoren sind Erhöhung der Blutglukose- und Laktatkonzentrationen, verminderte Blutgerinnungszeit und erhöhte Diurese, gefolgt von einem Elektrolytverlust und Verschlechterung der osmoregulatorischen Mechanismen. Veränderungen des roten und weißen Blutbildes, wie z.B. eine Lymphozytopenie, Granulozytose oder Hämokonzentration sind hierfür weitere Beispiele (MAZEAUD et al. 1977, DONALDSON 1981, MAZEAUD und MAZEAUD 1981, SCHRECK 1981, PICKERING et al. 1982, KLINGER et al. 1983). In ihren Untersuchungen stellten KLINGER et al. (1983) fest, daß mit Verschlechterung der Wasserqualität Veränderungen des roten und weißen Blutbildes bei Katzenwelsen (*Ictalurus punctatus*) auftraten. Die Fische wurden zum einen in einem Kreislaufsystem gehalten, als Vergleich dienten in Durchlaufsystemen gehaltene Tiere. Verglichen mit der Wasserqualität im Wasserdurchlaufsystem waren die Konzentrationen der fischtoxisch wirkenden Stickstoffverbindungen Ammonium und Nitrit im Kreislaufsystem um das 80-fache bzw. 100-fache erhöht. Die Konzentration des mindergiftigen Nitrats nahm auf Grund der Nitrifikation im Kreislaufsystem auf 234 mg/l gegenüber 7.2 mg/l Wasser in der Durchlaufhaltung zu. Ebenso akkumulierten die ein- und zweiwertigen Ionen (Phosphat, Kalzium, Sulfat, Chlorid) im Kreislaufwasser. KLINGER et al. (1983) führten die festgestellte Hämokonzentration der im Kreislaufsystem gehalten Fische auf die schlechtere Wasserqualität zurück; sie bewerteten die Hämokonzentration als ein charakteristisches Anzeichen für die Alarmphase des AAS, die zum einen durch Störungen der ionalen Regulationsmechanismen mit

Veränderungen (Verminderung) des Wassergehaltes des Blutes zustande kommen kann. Zum anderen vermuteten KLINGER et al. (1983) eine durch die höheren Nitritkonzentrationen verschlechterte Kiemenfunktion, die in eine Hämokonzentration mündete. FIVELSTAD et al. (1993) fanden bei Atlantischen Lachsen eine Erhöhung des Hämatokritwertes bei chronischer Exposition der Fische von Ammoniakkonzentrationen zwischen 0,045 und 0,073 mg NH<sub>3</sub>/l Wasser. Die Autoren vermuteten eine Verminderung des Plasmavolumens durch eine ammoniakinduziert erhöhte Urinproduktion. Ähnliches fanden LLOYD und ORR (1969).

Erhöhte MCV-Werte werden jedoch auch bei einer gesteigerten Erythropoese gesehen (nach akuten Blutverlusten) oder bei Cobalamin- oder Folsäuremangel (makrozytäre Anämie; KLONTZ 1994). Es ist hier nicht auszuschließen, daß die veränderte Wasserqualität zu einer reduzierten Futterraufnahme bei den im Kreislaufsystem gehaltenen Fischen führte, die einen Vitaminmangel zur Folge hatte. Einzuwenden ist jedoch, daß bei Fischen mit fortschreitender Heranreifung der roten Blutzellen die Zellgröße zunimmt („physiologische Makrozytose“; FERGUSON 1989), so daß bei einem Vitaminmangel der MCV-Wert abnehmen müßte. Hier müssen eingehendere Untersuchungen zum Fischwachstum und zur Futterraufnahme zeigen, inwieweit Hungern zu Veränderungen der hämatologischen Kennwerte bzw. des Blutbildes führen.

Erhöhte MCH-Werte werden gesehen, wenn die Bildung der Erythrozyten stärker gestört ist als die Hämoglobinsynthese (hyperchrome = makrozytäre Anämie); auf den Einzelerythrozyten entfällt absolut mehr Hämoglobin als normalerweise (BEGEMANN und BEGEMANN 1989, RICK 1990). In den meisten hyperchromen Erythrozyten liegt der Hämoglobinsättigungsindex (MCHC) im physiologischen Bereich. Die Hyperchromie beruht in den meisten Fällen auf einer Vergrößerung der Erythrozyten, erkennbar an erhöhten MCV-Werten. Eine Mangelernährung mit Cobalamin ist für das Krankheitsbild bei Menschen nicht von Bedeutung, vielmehr sind Autoimmunantikörper gegen die Vitamin B<sub>12</sub>-Bindungsstelle (Typ I) oder gegen den Vitamin B<sub>12</sub>-Intrinsic-Faktor-Komplex (Typ II) ausschlaggebend (BEGEMANN und BEGEMANN 1989). Daneben spielen verminderte Resorption (Erkrankung der Dünndarmmukosa) oder eine verminderte Sekretion des Intrinsic-Faktors eine Rolle (PETRIDES 1990). Die in der eigenen Arbeit festgestellten erhöhten MCH-Werte können ursächlich nicht mit den genannten Faktoren in Zusammenhang gebracht werden. Bei einer makrozytären Anämie sind immer erniedrigte Hämoglobin- und Hämatokritwerte und stark verminderte Erythrozytenzahlen feststellbar. Dies war bei den Kreislauftieren nicht der Fall. Über das Vorliegen von Autoantikörpern bei Fischen wurden in der gesichteten Literatur keine Angaben gefunden.

Zu denken ist an eine Steigerung der Erythropoese durch die Wasserparameter per se (Phosphat, Sulphat, Chlorid, Nitrat). Über die Beeinflussung dieser anorganischen Verbindungen

auf die Blut- oder Hämoglobinbildungsrate wurden in der gesichteten Literatur keine Angaben gefunden.

Im Vergleich zu den in den Durchlaufbecken gehaltenen Bachforellen konnten bei den Kreislauftieren niedrigere pH-Werte und eine geringere Serumosmolalität ermittelt werden. Dies kann ursächlich mit den im Kreislaufwasser verminderten pH-Werten in Zusammenhang gebracht werden. Chronische Exposition von niedrigeren pH-Werten (7,5 bis 6,0) des Wassers führten bei Regenbogenforellen zu einer Abnahme der Serumosmolalität und Veränderungen der Elektrolytkonzentrationen im Blut (GILES et al. 1984). Im allgemeinen wird die pH-wertabhängige Verminderung des osmotischen Druckes mit einer Hypoglykämie und Verminderung der Plasmaelektrolyte in Zusammenhang gebracht (LEE et al. 1983, BROWN et al. 1984, GILES et al. 1984). Die Abnahme wird vor allem mit einem Natriumionen-Nettoausstrom aus Kiemen, Haut und Niere (gesteigerte Exkretion) erklärt (McWILLIAMS 1980, McDONALD und WOOD 1981), wobei sich Fische bei chronischer Säureexposition an die veränderten Bedingungen akklimatisieren können, erkennbar an einem reduzierten Natriumausstrom (GILES et al. 1984).

Bei den im Kreislaufsystem gehaltenen Bachforellen waren im Vergleich zur Durchlaufhaltung sowohl die absoluten Zellzahlen als auch die prozentualen Verteilungen der weißen Blutzellen verändert. Die absolute und relative Thrombozyten- und Leukozytenanzahl waren erhöht. Die Leukozytose konnte auf eine Zunahme der absoluten sowie relativen Granulozyten- und Monozytenanzahl zurückgeführt werden: Im Vergleich zu den Durchlauftieren zeigten die Kreislauftiere etwa 2-3 mal höhere (Granulozyten) bzw. 1,5 - 2 mal höhere (Monozyten) absolute und relative Zellzahlen. Auffällig war die im Blut der Kreislauftiere sowohl prozentual als auch absolut erhöhte Anzahl der Granulozytenjugendformen (Metagranulozyten, Granuloblasten) und das Fehlen der eosinophilen Granulozyten. Die relative Anzahl der Lymphozyten war erniedrigt (80 % in der Kreislaufhaltung, 91 % in Durchlaufhaltung).

Die Ergebnisse deuten auf das Vorliegen eines milden Streßgeschehens hin. Die beobachtete absolute wie auch relative Neutrophilie mit Zunahme der blastären Stadien sowie eine Lymphopenie stehen in Einklang mit den von OIDTMANN (1994) ermittelten Resultaten. Sie stellte bei Langzeiteinwirkung von verschiedenen Wasserinhaltsstoffen (Ammoniak, Phosphat) Blutbildveränderungen fest, wie sie bei einem akutem Streßgeschehen beschrieben werden. Vergleichbar sind die eigenen Ergebnisse auch mit denjenigen von WLASOW et al. (1990) sowie KLINGER et al. (1983), die bei Verschlechterung der Wasserqualitätsparametern eine Thrombozytose, Lymphopenie und Neutrophilie beobachteten.

Die in den vorliegenden Untersuchungen festgestellte Linksverschiebung der im Kreislaufsystem gehaltenen Bachforellen kann mit einer durch die Veränderungen der

Wasserqualität als chronischen Stressor erhöhten Granulopoese erklärt werden. Typische Anzeichen von chronischem Stress ist die Stimulierung der unspezifischen Abwehr mit Erhöhung der Granulozyten-Jugendformen (SECOMBES et al. 1991, OIDTMANN 1994).

Ein Grund bzw. biologischer Sinn für die Ausschüttung von Granulozyten in Streßsituationen kann in Anlehnung an die von LEHMANN und STÜRENBERG (1981) sowie KLINGER et al. (1983) geäußerten Vermutungen erklärt werden: Sie sehen in einer Zunahme der Thrombozyten im Blut schon vor Auftreten von Verletzungen einen Schutzmechanismus der Fische gegenüber kommenden Schäden. Für eine Zunahme der Granulozyten kann ein ähnlicher Grund angenommen werden, da die Verletzungsgefahr und ein Eindringen von Erregern unter Stress erhöht ist; demnach wäre eine Ausschüttung von unspezifischen Abwehrzellen sinnvoll.

Es existieren nach Sichtung der Literatur nur wenig Arbeiten, die die Langzeitwirkung von Wasserschadstoffen, besonders die in Kreislaufsystemen anfallenden "klassischen" Wasserschadstoffe Ammoniak, Nitrit oder Nitrat, auf das Blutbild beschreiben. Diese Untersuchungen beinhalten vor allem die Einzelwirkung dieser Verbindungen bei anderen Fischarten (Karpfen, Klieschen, Regenbogenforellen). Im überwiegenden Teil beschäftigen sich Untersuchungen bei Bachforellen insbesondere auf Blutbildveränderungen nach akuten "handling-stress" oder Kortisoladministration, die einen stressähnlichen Zustand verursachen (PICKERING et al. 1982, PICKERING und DUSTON 1983, PICKERING 1984, PICKERING und POTTINGER 1985, PICKERING und POTTINGER 1987a, PICKERING 1990, POTTINGER et al. 1994).

Akute Nitritintoxikationen führen bei Karpfen neben einer Verschlechterung der humoralen und zellvermittelten Abwehr zu einer Abnahme der Gesamtleukozyten (MYSZKOWSKI und SIWICKI 1994). MAZIK et al. (1991) konnten bei Felsenbarschen (*Morone saxatilis*) mit Erhöhung der Nitritkonzentration im Wasser ein Anstieg des Blut-Kortisollevels nachweisen.

SECOMBES et al. (1991) untersuchten die Wirkung von Abwässerschlämmen auf das Immunsystem der Kliesche (*Limanda limanda*), ohne die Inhaltsstoffe näher zu analysieren. Die Autoren fanden bei hoher Belastung (0,032 % Abwässerschlämme) eine signifikante prozentuale Reduktion der Thrombozyten- und eine Erhöhung der absoluten neutrophilen Granulozytenzahlen. Eine Steigerung der Granulopoese ist ein charakteristisches Anzeichen für das Vorliegen von chronischem Stress (SECOMBES et al. 1991).

OIDMANN & HOFFMANN (1994) konnten zeigen, daß Chloridkonzentrationen > 20 mg/l eine Leuko- und Lymphopenie sowie eine relative Neutrophilie hervorriefen; erhöhte Phosphatwerte führten ebenfalls zu einer Zunahme der Neutrophilenzahlen. Nitrat-Konzentrationen > 26 mg/l zogen eine Stimulation des Immunsystems nach sich (Zunahme der absoluten und relativen Granuloblasten). Bei geringen Härtegraden konnte eine absolute wie relative Leuko-

/Lymphopenie sowie eine Neutrophilie mit verminderter Granuloblastenzahl festgestellt werden, was als Hinweis für eine Verminderung der Abwehrlage interpretiert wurde. KLINGER et al. (1983) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß im Gegensatz zu in Durchlaufsystemen gehaltenen Welsen die höhere Granulozytenzahl der im Wasserkreislauf gehaltenen Tiere persistierte und die Lymphozytenzahlen nicht abnahmen. Die Autoren argumentieren, daß diese Wirkung, d.h. Aktivierung des Immunsystems durch die veränderte Wasserqualität ausgelöst werden könnte, wobei ein schädigender Effekt des Kreislaufwassers auf Kiemen, Haut oder Magen-Darmtrakt nicht auszuschließen wäre. Es ist bekannt, daß Verletzungen (Injektionen, Bißwunden) zu einer Ansammlung von Granulozyten in Wunden führen und als Granulozytose in Erscheinung treten (ELLIS 1977, JOHANNSON-SJÖBECK et al. 1978).

In welcher Phase des Allgemeinen Adaptationssyndroms (AAS) sich die Bachforellen befanden, kann nur abgeschätzt werden. Messungen der Blutkortisolkonzentration könnten hier Hinweise geben, welche Stadien (Alarm- Adaptations- oder Erschöpfungsphase) vorliegen. Eine durch chronische Stressoren hervorgerufene Hämokonzentration bei Welsen bewerteten KLINGER et al. (1983) als das Vorliegen der Alarmphase, die gleichzeitig niedrigen Kortisolwerte als Zeichen dafür, daß sich die Tiere an die Stressoren adaptieren. Die Autoren sind der Ansicht, daß die "lokalen Symptome" (Neutrophilie), hervorgerufen durch die Wasserqualität, als ein Teil des "Lokalen Adaptationssyndrom" (LAS) verstanden werden müsse, aus dem spezifische Blutbildveränderungen hervorgehen. Beide Syndrome, das LAS und AAS, sind eng miteinander verflochten und beeinflussen sich gegenseitig. So besteht die Möglichkeit, daß bei Dominanz des LAS ein Shift von der Adaptationsphase in die Erschöpfungsphase eintreten kann, was zu hohen Verlusten führte. In der eigenen Arbeit stiegen im Kreislaufsystem die Nitrat-, Sulphat-, Chlorid- oder Phosphatkonzentrationen an, die der Ammoniak- und Nitritkonzentrationen lagen unter den toxisch wirkenden Grenzwerten für Forellen (PUND und BERNOTH 1992), veränderten aber zusammen mit den anderen Wasserinhaltsstoffen (Phosphat, Chlorid, Sulphat) die Blutparameter. Weiterhin zeigte sich, daß bei charakteristischen stressassoziierten Blutbildveränderungen (Hämokonzentration, Neutrophilie) keine erhöhte Sterblichkeitsrate oder klinische Anzeichen von infektiösen Krankheiten festgestellt werden konnten. Dies kann als Hinweis für eine Adaptation im Sinne des Selye'schen Streßkonzeptes gewertet werden, da die im Vergleich zum Durchlaufsystem veränderte Wasserqualität im Kreislaufsystem nur einen milden Stressor darstellte.

Es muß hier betont werden, daß die vergleichenden Blutuntersuchungen während eines definierten Zeitraumes erfolgten, wobei im Kreislaufwasser bestimmte Milieubedingungen herrschten (status quo). Längerfristige Messungen zeigten jedoch, daß die Konzentrationen verschiedener anorganischer Wasserinhaltsstoffe (Sulphat, Chlorid, Nitrat, Phosphat) weiterhin zunahmen, ohne daß Krankheiten auftraten oder die Mortalität anstieg. Weitere Untersuchungen müssen hier zeigen, inwieweit Blutbildveränderungen als diagnostisches Hilfsmittel für eine Abschätzung der Schwere des Stressors bei Bachforellen verwendet und für eine langfristige

prognostische Bewertung ausgenutzt werden können. So ist es nicht auszuschließen, daß bei einer weiteren Verschlechterung der Wasserwerte die Fische das Erschöpfungsstadium erreichen. KLINGER et al. (1983) wiesen darauf hin, daß die von ihnen beobachteten Blutbildveränderungen bei Welsen als Zeichen für das Vorliegen von Stress gewertet werden könnten und als diagnostisches Hilfsmittel auf eine bevorstehende Maladaptation mit hohen Verlusten hindeuten könnten.

Das Nichtauftreten von Krankheiten oder Sterblichkeit zeigte, daß sich die Bachforellen an die veränderte Wasserqualität adaptierten, schließt aber Langzeiteffekte (Auftreten von Krankheiten) bzw. Spätfolgen nicht aus. Es ist bekannt, daß sich Fische an mangelhafte bzw. suboptimalen Wasserbedingungen anpassen (BROWN und McLEAY 1975, WEDEMEYER und YASUTAKE 1978, HANSON und GRIZZLE 1985, LLOYD 1992, FIVELSTAD et al. 1993). Regenbogenforellen können sich nach 7 Wochen an erhöhte Nitritkonzentrationen (0,06 mg NO<sub>2</sub>-N/l Wasser) adaptieren (WEDEMEYER und YASUTAKE 1978); ähnliches galt für Atlantische Lachse bei Exposition von subletalen Ammoniakkonzentrationen (FIVELSTAD et al. 1993).

Bei Blutbildveränderungen müssen verschiedene Aspekte in die Betrachtungen des Streßkonzeptes einfließen. Im allgemeinen wird angenommen, daß die Neutrophilie Ausdruck einer Stimulation des Immunsystems ist. Umgekehrt besteht die Auffassung, daß eine relative oder absolute Lymphopenie einer Immunsuppression bei dadurch zunehmender Infektanfälligkeit gleichzusetzen ist. In den eigenen Untersuchungen konnten trotz veränderter Blutparameter, die auf das Vorliegen von Stressoren hindeuten, keine erhöhte Infektanfälligkeit bzw. Mortalität festgestellt werden. Es stellt sich hierdurch die Frage, ob eine Verallgemeinerung, daß die Abnahme bzw. Erhöhung der Immunzellanzahl im Blut hinweisend für eine Verschlechterung bzw. Verbesserung des funktionellen Zustandes des Immunsystems ist, beibehalten werden kann. Hier müßten eingehendere Untersuchungen zeigen, inwieweit die funktionelle Kapazität des Immunsystems von der Wasserqualität beeinflusst wird. Eine Möglichkeit besteht in der Messung der proliferativen Stimulationsbereitschaft von aus dem Blut isolierten Lymphozyten mit dem Lymphozytentransformationstest, der eine Aussage über die Funktion der zellvermittelten Immunmechanismen erlaubt. Weiterhin können mittels des Chemilumineszenz- oder Phagozytostests die unspezifischen Abwehrmechanismen (Monozyten/Makrophagen, Granulozyten) überprüft werden.

Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, daß das Dogma der Kausalkette Stress - Kortisolserhöhung - Infektanfälligkeit nicht in jedem Fall aufrechterhalten werden kann. So stellte SCHEDLOWSKI (1994) beim Menschen eine durch akute Stressoren ausgelöste erhöhte Funktion verschiedener immunologischer Parameter fest. Er ist deshalb der Auffassung, daß auch die Verminderung der Lymphozytenzahlen und -funktionen, die noch Tage nach einem akuten Streßgeschehen festzustellen sind, nicht im Zusammenhang mit einer gleichzeitigen erhöhten

Krankheitsinzidenz zu sehen sind. Genauso gut könnte durch eine Streßsituation eine größere Flexibilität des Immunsystems erreicht werden, das sich dann leichter an verändernde Umweltbedingungen anpasst, wodurch langfristig die Immunkompetenz gestärkt werden würde. In der Veterinärmedizin existieren ähnliche Hinweise. Die stressinduzierte Kortisolserhöhung führt nicht in jedem Fall bei Fischen zu einer erhöhten Infektanfälligkeit oder ist Anzeichen für das Vorliegen von Stress, sie kann umgekehrt zu einer Steigerung bestimmter Immunmechanismen führen (GRANT und MEHRLE 1973, SCHRECK und LORZ 1978, PICKERING et al. 1982, PICKERING und POTTINGER 1985, WOO et al. 1987, LAIDLEY et al. 1988, LAIDLEY und LEATHERLAND 1988, THUVANDER 1989, BARTON und GROSH 1991, BARTON und IWAMA 1991, ESPELID et al. 1996).

### 5.3.2 REAKTIONEN DER BACHFORELLEN AUF AKUTE STRESSOREN UND SAISONALE BLUTBILDVERÄNDERUNGEN IM WASSERDURCHLAUFSYSTEM.

Die Zellzahl variierte besonders stark nach Umsetzen der Bachforellen von der Kreislauf- in die Durchlaufhaltung und zum Zeitpunkt der Heranreifung der Geschlechtsprodukte. Zu den Variationen der Blutwerte nach Transfer der Fische in das Wasserdurchlaufsystem trugen verschiedene Faktoren bei: die etwa über eine Woche andauernde reduzierte Futtersaufnahme, der beim Transfer der Tiere ausgelöste akute "handling stress" (Herauskeschern, Transport in engen Behältern, Umsetzen der Tiere), die veränderten Haltungsbedingungen (Form der Fischbecken) und der Wechsel der Milieubedingungen, d.h. die veränderte Wasserqualität im Durchlaufsystem.

In der Literatur werden verschiedene Modelle beschrieben, die über die Antwort der Fische auf akute Stressoren Auskunft geben sollen. Hierbei wird vor allem darauf geachtet, daß die Streßbedingungen möglichst denen in der Praxis gleichen. So wird die Besatzdichte gesteigert (PICKERING und POTTINGER 1987) oder die Fische werden aus den Haltungseinheiten gekeschert und für eine kurze Zeit an der Luft liegen gelassen (HEMING 1989). Das von ANGELIDIS et al. (1987) verwendete Streßmodell basierte auf einem 15- und 30-minütigen Aufenthalt der Fische in unbelüftetem seichtem Wasser. ISHIOKA (1984b) transportierte die Fische über zwei Stunden in engen Behältern, FLOS et al. (1988) untersuchten die primäre und sekundäre Streßantwort auf das beim Sortieren der Fische übliche Vermessen und Transportieren. POTTINGER et al. (1995) untersuchten die primären und sekundären Streßantworten nach Umsetzen von Regenbogenforellen von großräumigen Haltungseinheiten in 50-Literbecken (sog. "confinement studies").

Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Streßmodelle wird eine starke Variation der primären, sekundären oder tertiären Streßparameter (PICKERING und POTTINGER 1987, ESPELID et al. 1996) sowie die Mobilisierung verschiedener hormoneller Mechanismen

beobachtet (SUMPTER et al. 1986, VERBURG-KEMENADE et al. 1994). Die in den eigenen Untersuchungen gefundenen Blutbildveränderungen sind deshalb nur bedingt mit den in der Literatur beobachteten Ergebnissen vergleichbar. Weiterhin muß in die Betrachtungen miteinbezogen werden, daß es sich um eine Antwort der Fische auf die Summe von verschiedenen Stressoren handelte und eine Gewichtung der Einzelparameter nicht vorgenommen werden konnte. Das Vorgehen in den eigenen Untersuchungen orientierte sich jedoch an praktischen Erwägungen, denn der Transport in engen Behältern oder das Umsetzen von Fischen in andere Haltungssysteme stellt eine in der Praxis übliche Maßnahme dar. Deshalb ist die Antwort der Fische auf die Summe der Stressoren von Interesse und nicht die Auswirkung der jeweils herrschenden einzelnen Streßfaktoren. Zudem ist zu vermuten, daß bei den in der Literatur beschriebenen Modellen nicht auf begleitende bzw. unvermeidbare Stressoren eingegangen wurde. So zeigten die eigenen Beobachtungen, daß nach Umsetzen der Fische die Nahrungsaufnahme über einen Zeitraum von einer Woche verringert war bzw. die Tiere nicht auf das dargebotene Futter reagierten. Es läßt sich bei den in der Literatur beschriebenen Streßuntersuchungen nicht ausschließen, daß nach schweren Streßeinwirkungen u.a. eine mehr oder weniger lange Hungerperiode mit einer Wachstumsreduktion auftreten kann. Die Wachstumsverlangsamung bzw. der nach Streßeinwirkung verminderte Konditionsfaktor wird neben der reduzierten Nahrungsaufnahme (STRANGE et al. 1978, PICKERING und STEWARD 1984, DURGA PRASAD et al. 1989) auf die katabole Stoffwechsellage infolge erhöhter Kortisolkonzentrationen (DAVIS et al. 1985) und einer Abnahme der Verdauungskapazität aufgrund einer Degeneration der Magenmukosazellen (BARTON et al. 1987) zurückgeführt. Weitere Ursachen sind die nach akuter Streßeinwirkung kurzfristige Hemmung des Growth Hormones sowie die verringerte Wirkung der anabol wirksamen Steroidhormone Testosteron und 11-keto-Testosteron (PICKERING 1990).

Blutbildveränderungen werden nach Hungern (Hungerstress), Umsetzen der Tiere (akuter "handling stress") oder nach Veränderung der Wasserqualität beschrieben.

SOIVIO und OIKARI (1976) sowie DURGA PRASAD et al. (1989) untersuchten die Veränderungen verschiedener Blutparameter bei hungernden Hechten (*Esox lucius*) bzw. Tarpunfischen (*Megalops cyprinoides*, "Ochsenauge"). DURGA PRASAD et al. (1989) stellten im Vergleich zu Wildfängen eine über 15 Tage andauernde Hämokonzentration fest, erkennbar an einem Anstieg der Erythrozytenanzahl, der Hämoglobinkonzentrationen sowie der Hämatokritwerte. Danach fielen die Werte 60 Tage nach Streßeinwirkung wieder ab. Die Leukozytenanzahl nahm während des gesamten Untersuchungszeitraumes (60 Tage) von  $12 \times 10^4/\mu\text{l}$  Blut ab, wobei die relativen Zahlen der Lympho- und Granulozyten zu-, die der Mono- und Thrombozyten abnahmen. SOIVIO und OIKARI (1976) fanden bei hungernden Hechten eine Abnahme der Erythrozytenzahlen sowie der Hämatokritwerte und der Hämoglobinkonzentrationen. RAM BHASKAR und RAO (1990) untersuchten die kombinierte

Auswirkungen des Crowdings und Hungerns bei Milchfischen (*Chanos chanos*). Sie stellten nach 120 Tagen eine normochrome, mikrozytäre Anämie sowie Leuko- und Thrombozytose fest.

POTTINGER et al. (1994) fanden, daß die Antwort von Regenbogenforellen auf akute und chronische Stressoren vom Fischstamm abhängig ist. Sie untersuchten die stressinduzierte Antwort von zwei genetisch unterschiedlichen Regenbogenforellen-Stämmen. Sie fanden in Abhängigkeit von der Herkunft der Fische unterschiedliche Reaktionsmuster, wobei die sog. "High Responder"-Tiere sensibler auf akute Stressoren, währenddessen die "Low-Responder" sensibler auf chronisch auf sie einwirkende Stressoren reagierten. POTTINGER et al. (1994) stellten noch 4 Tage nach Umsetzen der Fische eine signifikante Zunahme der Erythrozytenanzahl fest. Die Lympho- und Thrombozytenanzahl waren im Vergleich zum Ausgangswert über drei Tage lang stark vermindert. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten stieg demgegenüber über einen Zeitraum von zwei Tagen stark an und erreichte erst nach 10 Tagen die Ausgangswerte ("poststress level"). Die Blutbildveränderungen wurden in Zusammenhang mit Veränderungen des Kortisolkonzentrationen gesehen.

Die in den eigenen Untersuchungen festgestellten und mit der Literatur übereinstimmenden langfristigen Veränderungen der Zellzahlen deuten auf das Vorliegen eines chronischen Streßgeschehens hin. Hierbei spielten die veränderte Besatzdichte, das Umsetzen selber (Herauskeschern der Fische) sowie die in der Durchlaufhaltung veränderte Wasserqualität sicherlich eine Rolle. Nach etwa 4 Wochen adaptierten sich die Bachforellen an die veränderten Haltungsbedingungen, erkennbar an einem Wiederanstieg auf Werte vor der Streßeinwirkung ("Normalisierung" der Blutwerte). In vielen Untersuchungen zum Streßgeschehen bei Fischen oder bei toxikologischen Untersuchungen werden oftmals 4 Wochen für eine ausreichende Adaptation der Fische an veränderte Umweltbedingungen angegeben (WEDEMEYER und YASUTAKE 1978, PICKERING et al. 1982, LAIDLEY und LEATHERLAND 1988). Diese Zeitdauer stimmt mit den eigenen Untersuchungen insofern überein, als diese Zeit für die "Normalisierung" des Blutbildes benötigt wurde.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die in den eigenen Versuchen gefundenen stressassoziierten Blutbildveränderungen, die über 30 bis 40 Tage andauerten, von endogen-saisonale Einflüssen überlagert wurden. Hier müßten weitere Verlaufsuntersuchungen zeigen, ob das zelluläre Bild auch in den Winter- und Frühjahrsmonaten saisonalen Schwankungen unterworfen ist.

Die Veränderungen des Blutbildes im August/September sind vermutlich auf die Gonadenheranreifung zurückzuführen. Die Tiere waren an die Haltungssysteme adaptiert und die Wasserqualität in der Durchlaufhaltung varrierte geringfügig und lag im Optimalbereich für Forellen, so daß eine Beeinflussung hiervon nicht angenommen werden kann.

Die Heranbildung der Sexualprodukte oder das Geschlecht kann bei Fischen das Blutbild bzw. Immunsystem beeinflussen (BARNHARDT 1969, PICKERING 1984, ROBERTS 1989, ZAPATA et al. 1992). Verglichen mit juvenilen Tieren stellte PICKERING (1984) bei sexualreifen männlichen Bachforellen eine mit chronisch erhöhter Kortisolkonzentration assoziierte Reduktion der Blutlymphozytenanzahl von 3.36 auf  $1.98 \times 10^4/\mu\text{l}$  fest. Die Erythrozytenzahlen nahmen demgegenüber zu. Die erhöhte Empfänglichkeit von heranreifenden Salmoniden gegenüber Infektionserregern läßt sich z.T. mit der festgestellten Lymphopenie erklären (PICKERING 1984). Steigende Androgenkonzentrationen, wie sie bei der Heranreifung der männlichen Geschlechtsprodukte bei Bachforellen festgestellt werden, verursachten den beobachteten Anstieg der Erythrozytenzahlen. APANIUS (1994) weist darauf hin, daß Testosteron bzw. allgemein Steroidhormone bei Fischen immunsuppressiv wirken können. Die Wirkung von Sexualhormonen auf das zelluläre Immunsystem ist auch bei Säugetieren bekannt; so konnten STAPLES et al. (1983) bei Wiederkäuern eine Hemmung der mitogeninduzierten Proliferation von Lymphozyten bei Anwesenheit von Progesteron, Testosteron und Östrogen in vitro beobachten.

Es ist bei den Interpretationen der eigenen Untersuchung bedacht worden, daß die Bachforellen innerhalb des Untersuchungszeitraues von Mai bis September an Körpermasse zunahmten, was das zelluläre Blutbild möglicherweise beeinflussen könnte. Die Ergebnisse zeigten jedoch, daß das Blutbild von dem Fischgewicht unabhängig war, so daß diese Einflußgröße ausgeschlossen werden konnte.

Obwohl die eigenen Ergebnisse nur tendentiell bewertet werden können, zeigen die Daten, daß die Zellzahlen in Abhängigkeit von der Jahreszeit stark variieren können. Die Untersuchungen unterstreichen die Notwendigkeit, von einer Fischpopulation über einen längeren Zeitraum das rote und weiße Blutbild zu untersuchen, sollten die Tiere als Vergleichsgruppe für Blutuntersuchungen herangezogen werden. Es ist nicht ausreichend, zu einem bestimmten Zeitpunkt das zelluläre Blutbild zu bestimmen und als Vergleichsmaßstab im Sinne von Blutnormalwerten heranzuziehen. Es könnten dann Fehlinterpretationen entstehen. Es stellt sich weiterhin die Frage, inwieweit es gerechtfertigt ist, die in der Literatur angegebenen Normwerte auch bei ähnlichen Versuchsbedingungen als Vergleichsmaßstab zu verwenden. Wichtig ist die Kenntnis, zu welchem Zeitpunkt bzw. Jahreszeit diese Werte ermittelt wurden. In der Literatur ist der Zeitpunkt der Blutentnahme bzw. die Jahreszeit oftmals nicht angegeben. HAMERS (1995c) betont in diesem Zusammenhang, daß "Kontroll"- oder "Normwerte" nur innerhalb eines Versuchsaufbaus und gleicher Fischgruppen als Referenzwerte gelten; eine Verallgemeinerung - etwa das Aufstellen von Normwerttabellen wie in der Säugerhämatologie - ist bei Fischen nur eingeschränkt möglich ist.

LEHMANN et al. (1976) sowie SANO (1960) stellten für Regenbogenforellen, ELLSAESSER und CLEM (1987) für Welse (*Ictalurus punctatus*) eine saisonale Schwankung verschiedener Blutmeßwerte fest. ELLSAESSER und CLEM (1987) hielten fest, daß Normalwerte in Abhängigkeit von Nahrung, Jahreszeit und Stressoren schwanken. So zeigten die Variationen der Harnstoff-, Cholesterin-, Protein- und Kreatinin-Konzentrationen im Blutserum eher eine unterschiedliche Fütterung als einen pathologischen Zustand an. Normwerte, die bei einer Art in einer Teichwirtschaft gewonnen werden, müssen nicht gleichzeitig als Maßstab für die gleiche Art eines anderen Produktionsbetriebes gelten (ELLSAESSER und CLEM 1987). Periodische Schwankungen der biochemischen und/oder zellulären Blutparameter werden durch Schwankungen der Temperatur und Sauerstoffkonzentration (ELLSAESSER und CLEM 1987, LOCHMILLER et al. 1989), Photoperiode (LOCHMILLER et al. 1989), temperaturunabhängige, endokriologisch vermittelte Prozesse (Smoltifikation, Heranreifung der Geschlechtsprodukte) oder Stressoren ausgelöst (ZAPATA et al. 1992). Ebenso ist die Lymphozytenproduktion in Thymus, Milz und Niere saisonalen Rhythmen unterworfen (ZAPATA et al. 1992). LOCHMILLER et al. (1989) stellten bei Felsenbarschen (*Morone saxatilis*) im August und Winter bei optimalen Sauerstoffkonzentrationen eine Polycythämie fest. Demgegenüber fielen die Erythrozytenanzahlen, die Hämoglobinkonzentrationen sowie die Hämatokrit- und Leukritwerte im Sommer infolge reduzierter Sauerstoffkonzentrationen im Wasser ab. Die von ihnen beobachtete Abnahme der Erythrozyten sowie des Hämoglobins und Hämatokrits im Frühjahr/Sommer führten sie auf die zunehmende Tageslänge, die weitere Abnahme im Hochsommer auf die erhöhte Wassertemperatur und den damit niedrigeren Sauerstoffgehalt zurück. Dieser kombinierte physikalische Stress führte zu einer Suppression der Erythrozytenproduktion in der Niere, erkennbar an steigenden MCV- und MCH-Werten; denn die beobachteten geringeren Zellzahlen unreifer Erythrozyten sowie Makrozytose mündete in einem höheren Hämoglobingehalt der Einzelzellen. SANDES et al. (1988) wiesen bei Atlantischen Lachsen nach, daß die Photoperiode das rote zelluläre Blutbild beeinflusste (Erythrozytenzahl, MCV, MCHC, MCH). Mit Verlängerung der Tageslänge fiel der MCV- (Erythrozytenvolumen) und der MCH-Wert, der Anteil der Erythroblasten nahm zu. Weitere Hinweise für die Beeinflussung des Hämoglobingehaltes sowie der Erythrozytenanzahl von Stressoren bzw. Umwelteinflüssen (Sauerstoffgehalt des Wassers, Alter bzw. Größe, Geschlecht und Herkunft der Fische lieferten HAIDER (1977), LOWE-JINDE und NIIMI (1983) und ELLIS et al. (1989).

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Blutentnahmetechniken bei Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) untersucht sowie verschiedene hämatologische Untersuchungsmethoden daraufhin überprüft, inwieweit sie für Bachforellenblut geeignet sind.

Nach Optimierung und Standardisierung der Methoden wurde das Blutbild von im Wasserkreislauf- und -durchlaufsystemen gehaltenen Bachforellen vergleichend untersucht. Weiterhin wurde überprüft, inwieweit akut auf die Fische einwirkende Stressoren ("handling stress") langfristige Auswirkungen auf das zelluläre Blutbild haben und inwieweit saisonale Variationen über einen Zeitraum von fünf Monaten existieren. In einer weiteren Studie wurde die Abhängigkeit des zellulären Blutbildes von dem Gewicht der Fische ermittelt.

Die Blutentnahme aus dem Cuvier'schen Gefäß war im Vergleich zu der Entnahme aus dem Herzen oder der Kaudalarterie bzw. -vene schnell und einfach durchzuführen. Das Verletzungsrisiko war im Vergleich zur Herz- und Schwanzvenenpunktion sehr gering.

Für die Hemmung der Blutgerinnung mit Heparin war eine Konzentration von mindestens 0,24 mg/ml, entsprechend 41 USP-units/ml Blut notwendig.

Für die Zählung der Erythro-, Leuko- und Thrombozyten im Hämozytometer eigneten sich die Blutverdünnungslösungen nach Dacies und Natt-Herrick am besten. Mit diesen Lösungen konnten die verschiedenen Zellen aufgrund der unterschiedlichen Anfärbung sowie erhaltener Morphologie eindeutig identifiziert werden.

Die vergleichende Untersuchung des Differentialblutbildes mit drei verschiedenen Färbemethoden zeigte für die Anfärbung nach Pappenheim die besten Resultate; es konnten die Granulozyten, Thrombozyten, Monozyten und Lymphozyten aufgrund ihrer Morphologie und färberischen Charakteristika eindeutig voneinander differenziert werden. Die Anfärbung wurde von dem pH-Wert, der Inkubationszeit und Konzentration der Färbelösungen beeinflusst. Die Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen bzw. eine differenzierte Anfärbung der Zellen konnten mit einer 1,5 minütigen Inkubation des Blutausrichs mit einer konzentrierten May-Grünwald-Lösung und einer 1 : 50 Verdünnung der Giemsalösung mit phosphatgepuffertem A. bidest., dessen pH-Wert zwischen 6,5 und 6,8 lag, erzielt werden.

Bei den Untersuchungen zur Fragilität der Bachforellenerythozyten wurden ähnliche Werte wie für Vogelerythozyten gefunden. Vermutlich spielen hier gleichartige Membraneigenschaften aufgrund der Kernhaltigkeit der Erythrozyten eine Rolle.

Bei Umdrehungszahlen von 12500 U/min konnten nach 4- bis 8 -minütiger Zentrifugation konstante Hämatokritwerte ermittelt werden.

Der Hämatokritwert, die Hämoglobinkonzentration, der Blut-pH-Wert als auch die Blutosmolalität als wichtige diagnostische Kenngrößen waren von der Wahl des Antikoagulans, seiner Konzentration sowie von der abgenommenen Blutmenge abhängig. Dies konnte sowohl auf einen Verdünnungseffekt der Heparinlösungen als auch auf die im Blut vorhandene

unterschiedliche EDTA-Konzentrationen zurückgeführt werden, die die Osmolalität stark veränderte. Im Gegensatz zu EDTA veränderte Heparin aufgrund seiner Isoosmolalität zum Fischblut am geringsten die Blutparameter. Unter der Voraussetzung, daß auf die Anwendung eines Antikoagulans nicht verzichtet werden kann, sollte die Heparinlösung auf fisch-isoosmolale Verhältnisse eingestellt werden, wobei das Volumen der Heparinlösung so klein wie möglich gehalten werden sollte. Auf EDTA sollte aufgrund der starken Veränderungen der o.g. Blutparameter gänzlich verzichtet werden.

Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration erfolgte mit der Zyan-Methämoglobinmethode. Die Berechnung der Hämoglobinkonzentrationen aus der Eichgeraden ergab im Vergleich zu den mit dem Faktor 36,8 ermittelten Ergebnissen um etwa 16 % signifikant höhere Werte.

Blutuntersuchungen von Bachforellen, die im Wasserkreislaufsystem gehalten wurden, zeigten im Unterschied zu im Wasserdurchlaufsystem aufgezogenen Fischen Veränderungen, die ursächlich auf die schlechtere Wasserqualität im Kreislaufsystem zurückgeführt werden konnten. Durch die ablaufenden Nitrifikationsvorgänge akkumulierten Ammoniak, Nitrit, Nitrat sowie Phosphat, Sulphat, Chlorid und Kalzium. Durch die dabei gebildeten Säureäquivalente sank die Karbonathärte. Besonders auffällig war die im Vergleich zur Durchlaufhaltung um das 25- bis 44 - fach erhöhte Nitratkonzentration. Die Erhöhungen der anderen Ionen im Kreislaufwasser betragen das 1- bis 2- (Sulfat), 4- bis 8- (Phosphat) und 2-fache (Chlorid). Die toxikologisch relevanten Ammoniak- sowie Nitritkonzentrationen lagen um den Faktor 5 bzw. 7 höher als im Wasserdurchlaufsystem. Wie die Nitratkonzentrationen erreichten sie jedoch nicht die für Forellen in der Literatur angegebenen toxischen Grenzwerte.

Die Untersuchung des Blutbildes zeigte im Kreislaufsystem eine relative Lymphopenie, Neutrophilie und eine Linksverschiebung mit Erhöhung der blastären granulozytären Zellstadien. Weiterhin konnte eine Hämokonzentration festgestellt werden. Im gesamten Untersuchungszeitraum wurde jedoch keine Mortalität beobachtet. Die veränderten Blutwerte deuteten auf ein mildes Streßgeschehen hin, die Erschöpfungsphase innerhalb des Allgemeinen Adaptationssyndroms wurde nicht erreicht.

Akut auf die Fische einwirkende Stressoren (Herauskeschern, Transport, Umsetzen der Fische) bewirkten langfristige Blutbildveränderungen. Die absolute Anzahl der Erythro- und Leukozyten (Lympho- und Monozyten) nahmen 5 bis 10 Tage nach Einwirkungen der Stressoren um das anderthalbfache bzw. zweifache zu und fielen dann im weiteren Verlauf bis zum 40. Tag nach Einwirkung der Stressoren ab. Sie erreichten jedoch nicht die Ausgangswerte ("pre-stress-level"). Der Verlauf der Thrombo- und Granulozytenzahlen verhielten sich zu den anderen Zellen gegenläufig. Die Anzahl der Thrombozyten fiel nach etwa 5 Tagen auf etwa die Hälfte, die der Granulozyten auf etwa 1/6 des Ausgangswertes ab.

30 bis 40 Tage nach Stresseinwirkung stiegen die Erythro- und Lymphozytenzahlen wieder an, die der Granulozyten sanken ab, erreichten jedoch nicht die Ausgangswerte. Bis zur

Heranbildung der Geschlechtsprodukte im August/September blieb die Anzahl aller Zellen relativ konstant. Danach wurde eine Abnahme der Leuko- und Thrombozyten auf etwa 1/3 des Ausgangswertes festgestellt, die Anzahl der Erythro- und Monozyten veränderte sich nur geringfügig. Die Veränderungen sind vermutlich auf die während dieser Zeit ansteigenden Sexualhormone zurückzuführen. Ein Beeinflussung durch das Fischgewicht oder andere Einflußgrößen konnte ausgeschlossen werden.

## Summary

### **The application of hematological methods to fish blood and the impact of endogenous and environmental factors on the blood composition of brown trouts (*Salmo trutta f. fario*)**

In the present thesis, three different blood withdrawal techniques and several hematological methods were evaluated regarding their applicability to brown trouts (*Salmo trutta f. fario*) and their blood, respectively.

After standardization and optimization of methods it was investigated whether the water quality due to keeping fish in recirculating or flow-through systems had any influence on trout blood parameters.

In a further study the variations of the cellular blood composition were evaluated when the fish were subjected to harmful acute stressors. Resulting longtime shifts in blood composition as well as possible seasonal variations or dependency on fish body weight were monitored over 5 months.

The results are as follows:

In contrast to the blood sampling from the caudal vein or the cardiac puncture the withdrawal from the Ductus Cuvieri provide the most convenient procedure. It was safe for the fish and easy to handle. A adequate volume of blood could be obtained in a short time, no injuries in contrast to the other methods could be detected.

A heparin concentration of at least 0,24 mg/ml blood (41 USP-units/ml), solved in phosphate buffered saline (pH 7,05) was necessary to prevent clotting completely.

Best results for counting erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in the hemocytometer were obtained by blood diluting fluids according to Dacie's and Natt-Herrick. Thereby it was possible to clearly identify the cell types because of their different staining properties and preserved morphology.

For the differential leukocytes counts three different staining methods were evaluated. The modified Pappenheim staining technique gives adequate results concerning the differentiation between mature and immature granulocytes, monocytes, lymphocytes and thrombocytes. The different cell types could be distinguished by their colorability and preserved morphology. The resulting color intensity was strongly influenced by the pH value, incubation time and the concentrations of the staining solutions. Incubation of blood smears for 1,5 min in a concentrated May-Grünwald and a Giemsa solution diluted 1:50 in phosphate buffered A. bidest. (pH 6,5-6,8) each yielded a distinguishing coloration of cells.

The investigation of the erythrocyte fragilities revealed similar values in comparison with erythrocytes of birds, probably because of similar membrane properties due to their nucleated cells.

Hematocrit values became reproducible by centrifugation of the blood at 12500 rpm for 8 to 10 minutes in standard microhematocrit tubes.

The hematocrit and pH values, hemoglobin concentration and the osmolality of the blood, all of them important diagnostic parameters, were influenced by the choice of the anticoagulant, its concentration and the sampled blood volume. This could be attributed to a diluting effect of heparin, the concentration of EDTA and to the changing blood osmolality. Unlike EDTA, heparin with its isoosmolality to fish blood caused only minor changes of blood parameters investigated. Given that the use of an anticoagulant is indispensable, the smallest possible amount of heparin solution should be applied. The use of EDTA should be avoided because of its strong influence on the above cited blood parameters.

Hemoglobin concentrations were measured by the cyanmethemoglobin method. The calculation of the hemoglobin values from the standard curve gave significantly higher concentrations in comparison with the determination with 36.8, a factor which is used for calculating the hemoglobin content of human blood.

In comparison with fish which were reared in flow-trough systems, the blood picture of fish kept in recirculating systems revealed changes of several blood parameters. This could be attributed to the poor water quality in the recirculation unit. By the nitrification process, ammonia, nitrite, and nitrate as well as phosphate, sulphate, chloride, and calcium ions accumulated, thus lowering the carbonate hardness. Most striking was the elevated nitrate concentration, 25 to 44 times higher than in the flow-through system. Other ions in the recirculating water were raised 1-2 fold (sulphate), 4-8 fold (phosphate), and 2 fold (chloride). The toxicologically relevant ammonia and nitrite concentrations were here 5 to 7 times higher but, like nitrate values, did not reach toxic limits published for trouts.

The stress-associated response consisted of a neutrophilia, lymphopenia and an increase of the blastogenic stages of the granulocytes. Furthermore, a hemoconcentration could be observed. On the other hand, no mortalities could be observed during the whole examination period. Therefore, the changed blood parameters indicated only mild stress for the fish without reaching exhaustion level as a part of the General Adaptation Syndrome.

Acute stressors like transport and confinement of the fish, resulted in long lasting blood changes. 5 to 10 days after stress the absolute numbers of erythrocytes and leukocytes (lympho- and monocytes) increased 1,5 and 2 times, respectively, and declined again until day 40 without reaching the prestressed level again. Thrombocyte and granulocyte numbers followed a reversed course, thrombocyte counts were reduced by half, granulocytes to 1/6 after 5 days. Thereafter, all cell numbers kept nearly constant.

With maturation of the gonadal products in august/september leukocytes and thrombocytes decline, whereas erythrocyte and monocyte counts changed only marginally. Increase of sexual

hormones in this time of the year was the most probable reason for the alterations observed. Any influence of fish body weight or variable environmental conditions was excluded.

## 7. Literaturverzeichnis

ADAMS; S.M. (1990):

Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish.

Am. Fish. Soc.Symp. **8**, 1 - 8.

AGRAWAL, U. und A.K. SRIVASTAVA (1978):

Cold shock induces changes in the interrenal tissue of a fresh water tropical teleost, *Colisa fasciatus*.

Arch. Anat. Micros. Morphol. Exp. **67**, 1 - 10.

AHMED, I.I., G. PETERS und M. FAISAL (1987):

Emotional stress in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*.

Vet. Med. J. **35**, 471 - 485.

AINSWORTH, A.J., C. DEXIANG und P.R. WATERSTRAT (1991):

Changes in peripheral blood leukocyte percentages and function of neutrophils in stressed channel catfish.

J. Aquat. Animal Health **3**, 41 - 47.

ALFORD, P.B., J.R. TOMASSO, A.B. BODINE und C. KENDALL (1994):

Apoptotic death of peripheral leucocytes in channel catfish: effect of confinement-induced stress.

J. Aquat. Anim. Health **6**, 64 - 69.

ALLEN, P. (1993):

Determination of haematological parameters of *Oreochromis aureus* Steindachner and the effects of heparin on these.

Comp. Biochem. Physiol. **106A**, 355 - 358.

AMIN, A.B., L. MORTENSEN und T.T. POPPE (1992):

Blood and Lymph. In: A.B. AMIN, L. MORTENSEN und T.T. POPPE: Histology Atlas.

Verlag Akvapatologisk Laboratorium AS, Bodo - Norway, Seite 84 - 93.

AMLACHER, E. (1992):

Taschenbuch der Fischkrankheiten, 6. Auflage.

Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, S. 45 - 50.

ANDERSON, D.P. (1990):

Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks.

Am. Fish. Soc. Symp. **8**, 38 - 50.

ANGELIDIS, P., F. BAUDIN-LAURENCIN und P. YOUINOU (1987):

Stress in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: effects upon phagocyte chemiluminescence, circulating leucocytes and susceptibility to *Aeromonas salmonicida*.

J. Fish Biol. **31** (Suppl. A), 113 - 122.

AXELROD, J. und T.D. REISINE (1984):

Stress hormones: their interaction and regulation.

Science **224**, 452 - 459.

BARHAM, W.T., H.J. SCHOONBEE, J.G.J. VISSER und G.L. SMIT (1988):

A comparison of red-cell fragilities of electronarcotized and chemically anaesthetized freshwater bream, *Oreochromis mossambicus*.

Comp. Biochem. Physiol. **91 A**, 241 - 244.

BARNHART, R.A. (1969):

Effects of certain variables on hematological characteristics of rainbow trout.

Trans. Amer. Fish. Soc. **98**, 411 - 418.

BARTON, B.A. und R.S. GROSH (1991):

Physiological responses of five salmonid fishes to handling and transport. Unpublished results.

In: B.A. BARTON und G.K. IWAMA (1991): Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.

Annual Rev. Fish Dis. 3 - 26.

BARTON, B.A., C.B. SCHRECK und L.D. BARTON (1987):

Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout.

Dis. Aquat. Org. **2**, 173 - 185.

BARTON, B.A. und G.K. IWAMA (1991):

Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.

Annual Rev. Fish Dis. 3 - 26.

BARTON, B.A. und R.E. PETER (1982):

Plasma cortisol response in fingerling rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to various transport conditions, anaesthesia, and cold shock.

J. Fish Biol. **20**, 39 - 51.

BARTON, B.A., C.B. SCHRECK, R.D. EWING, A.R. HEMMINGSEN und R. PATINO (1985):  
Changes in plasma cortisol during stress and smoltification in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*.  
Gen. Comp. Endocrinol. **59**, 468 - 471.

BARTON, B.A., G.S. WEINER und C.B. SCHRECK (1985):  
Effect of prior acid exposure on physiological responses of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to  
acute handling stress.  
Can. J. Fish. Aquat. Sci. **42**, 710 - 717.

BEGEMANN, H. und M. BEGEMANN (1989):  
Praktische Hämatologie, 9. Aufl.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 569 S.

BERNOTH, E.-M. (1991):  
Intensivhaltung von Süßwasserfischen.  
Dtsch. tierärztl. Wschr. **98**, 121-125

BLAXHALL, P.C. (1972):  
The haematological assessment of the health of freshwater fish. A review of selected literature.  
J. Fish Biol. **4**, 593 - 604.

BLAXHALL, P.C. (1973):  
Error in hematocrit value produced by inadequate concentration of ethylenediamin-tetra-acetate.  
J. Fish Biol. **5**, 767 - 769.

BLAXHALL, P.C. und K.W. DAISLEA (1973):  
Routine haematological methods for use with fish blood.  
J. Fish Biol. **5**, 771 - 781.

BLAXHALL, P.C. und K. HOOD (1985):  
Cytochemical enzyme staining of fish lymphocytes separated on a percoll gradient.  
J. Fish Biol. **27**, 749 - 755.

BLÜM, V., J. CASADO, J. LEHMANN und E. MEHRING (1988):  
Farbatlas der Histologie der Regenbogenforelle.  
Herausgeber: Landesanstalt für Fischerei Nordrhein-Westfalen, Springer-Verlag.

BOGNER, K.-H. und A.E. ELLIS (1977):

Properties and function of lymphocytes and lymphoid tissues in teleost fish. In: H.-H. REICHENBACH - KLINKE (Hrsg.): Beiträge zur Histopathologie der Fische, Fisch und Umwelt, Heft 4. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

BOHL, M (1982):

Zucht und Produktion von Süßwasserfischen.  
DLG-Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt, 334 S.

BOLLARD, B.A., N.W. PANKHURST und R.M.G. WELLS (1993):

Effects of artificially elevated plasma cortisol levels on blood parameters in the teleost fish *Pagrus auratus* (Sparidae).  
Comp. Biochem. Physiol. **106** A, 157 - 162.

BOND, C.E. (1996):

Biology of fishes, 2. Aufl.  
Saunders College Publishing, Philadelphia, 750 S.

BOUCK, G.R. und R.C. BALL (1966):

Influence of capture methode on blood characteristics and mortality in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).  
Trans. Amer. Fish. Soc. **95**, 170 - 176

BRALEY, H. und T.A. ANDERSON (1992):

Changes in blood metabolite concentrations in response to repeated capture, anaesthesia and blood sampling in the golden perch, *Macquaria ambigua*.  
Comp. Biochem. Physiol. **103** A, 445 - 450.

BRANSON, E. (1993):

Basic anatomy and physiology. In: L. Brown (Hrsg.): Aquaculture for Veterinarians.  
Pergamon Press, Oxford, New York, Seoul, Tokyo, S. 1 - 30.

BRANSON, E. (1993a):

Environmental aspects of aquaculture. In: L. Brown (Hrsg.): Aquaculture for Veterinarians.  
Pergamon Press, Oxford, New York, Seoul, Tokyo, S. 57 - 68

BRAUN, F. (1972):

Kreislaufhaltung mit biologischer Reinigung.  
Münchener Beiträge Abwasser Fisch. Flußbiologie **23**, 163 - 170

BRETT, J.R. (1958):

Implications and assesment of environmental stress. In: H.R. McMILLAN: Lectures in Fisheries: The Investigation of Fish Problems. Univ. Columbia, 1958, S. 69 - 97.

Zit. in SINDERMANN, C.J. (1984): Fish and environmental impacts. Arch. Fisch.Wiss. **35**, 125 - 160.

BRILL, R.W. und D.R. JONES (1994):

The influence of hematocrit, temperature and shear rate on the viscosity of blood from a high-energy-demand teleost, the yellowfin tuna *Thunnus albacares*.

J. exp. Biol. **189**, 199 -212.

BROWN, S.B., J.G. EALES, R.E. EVANS und J.H. TOSHIAKI (1984):

Interrenal, thyroidal, and carbohydrate responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental acidification.

Can. J. Fish. Aquat. Sci **41**, 36 - 45.

BROWN, D.A. & D.J. McLEAY (1975):

Effect of nitrite on methemoglobin and total hemoglobin of juvenile rainbow trout.

Prog. Fish Cult. **37**, 36 - 38

BRUNO, D.W. und T.TR. POPPE (1996):

Salmonid diseases. Academic Press, 194 S.

BRUNO, D.W. und A.L.S. MUNRO (1986):

Haematological assessment of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoninarum*.

J. Fish Dis. **9**, 195 - 204.

BURCK, H.-Ch. (1981)

Histologische Technik, 4. Aufl.

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 205 S.

CAIRNS, M.A. und A.R. CHRISTIAN (1978):

Effects of hemorrhagic stress on several blood parameters in adult rainbow trout (*Salmo gairdneri*).

Trans. Am. Fish. Soc. **107**, 334 - 340.

CANNON, W.B. (1914):

The interrelations of emotions as suggested by recent physiological researchers.

Am. J. Psych. **25**, 256 - 282.

CANNON, M.S., H.H. MOLLENHAUER, T.E. EURELL, D.H. LEWIS, A.M. CANNON und C. TOMPKINS (1980):

An ultrastructural study on the leucocytes of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*.  
*J. Morphol.* **164**, 1 - 23.

CARBALLO, M., M.J. MUNOZ, M. CUELLAR und J.V. TARAZONA (1995):

Effects of waterborne copper, cyanide, ammonia, and nitrite on stress parameters and changes in susceptibility to Saprolegniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).  
*Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2108 - 2112.

CARRAGHER, J.F., J.P. SUAMTER, T.G. POTTINGER und A.D. PICKERING (1989):

The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L., and *Salmo gairdneri* Richardson.  
*Gen. Comp. Endocrinol.* **76**, 310 - 321.

CATTON, W.T. (1951):

Blood cell formation in certain teleost fish.  
*Blood* **6**, 39 - 60.

CHEN, M.F., J.S. ROHOVEV und J.L. FRYER (1983):

Effect of methotrexat, kenalog and cyclophosphamide on the antibody response of steelheads to *Aeromonas salmonicida*.  
*Transact. Americ. Fish. Soc.* **112**, 561 - 564.

CHILMONCZYK, S. (1992):

The thymus in fish: development and possible function in the immune response.  
*Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 181 - 200.

CYRIAC, P.J., A. ANTONIE und P.N.K. NAMBISAN (1989):

Hemoglobin and hematocrit values in the fish *Oreochromis mossambicus* (PETERS) after short term exposure to copper and mercury.  
*Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **43**, 315 - 320.

DAVIS, K.B., P. TORRANCE, N.C. PARKER und M.A. SUTTLE (1985):

Growth, body composition, and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol-fed channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque.  
*J. Fish Biol.* **27**, 177 - 184.

DeLUCA, D., M. WILSON und G.W. WARR (1983):

Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur. J. Immunol.* **13**, 546 - 551.

DEUFEL, J. und CH. V. PÖLLNITZ (1977):

Zytodiagnostik von Krankheiten bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* Richardson). In: H.-H. Reichenbach-Klinke (Hrsg.): *Fisch und Umwelt. Beiträge zur Histopathologie der Fische.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, Seite 15 - 24.

DICK, P.T. und D.G. DIXON (1985):

Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, following acute and chronic exposure to copper. *J. Fish Biol.* **26**, 475 - 481.

DONALDSON, E.M. (1981):

The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: A.D. PICKERING (Hrsg.): *Stress and Fish.* Academic Press London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco. S. 11 - 47.

DUNIER, M., A.K. SIWICKI; J. SCHOLTENS, S.D. MOLIN, C. VERGNET und M. STUDNICKA (1994):

Effects of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. III. Effect on nonspecific immunity and B lymphocyte functions. *Ecotox. Environ. Safety* **27**, 324 - 334.

DURGA PRASAD, Y.V.K., B. RAM BHASKAR, D. PANDURANGA RAO und K. SRINIVASA RAO (1989):

Haematological variations due to stress in Tarpon, *Megalops cyprinoides* (Broussonet). *Indian J. Comp. Anim. Physiol.* **7**, 62 - 69.

EALLES, J.G., M. RANSOM, S. SHOSTAK und D. PRIMEAN (1986):

Effects of catecholamines on plasma thyreoid levels in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**, 393 - 399.

EDER, H. (1987):

Blut und Lymphe. In: A. SCHEUNERT, A. TRAUTMANN und G. WITTKKE (Hrsg.): *Lehrbuch der Veterinär-Physiologie*, 7. Auflage. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S.160 - 208.

EL-DOMIATY, N.A. (1987):

Stress response of juvenile *Clarias lazera* elicited by copper.  
Comp. Biochem. Physiol. **88** C, 259 - 262.

ELLIS, A.E. (1976):

Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronecta platessa*.  
J. Fish Biol. **8**, 143 - 156.

ELLIS, A.E. (1977):

The leucocytes of fish: a review.  
J. Fish Biol. **11**, 453 - 491.

ELLIS, A.E. (1989):

The immunology of teleosts. In: R.J. Roberts (Ed.): Fish Pathology, 2. Aufl.  
Bailliere Tindall, London, Philadelphia, Sydney, Tokyo, Toronto, S. 135 - 152.

ELLIS, A.E., R.J. ROBERTS und P. TYTLER (1989):

The Anatomy and Physiology of Teleosts. In: R.J. Roberts (Ed.): Fish Pathology, 2. Aufl.  
Bailliere Tindall, London, Philadelphia, Sydney, Tokyo, Toronto, S. 27 - 30.

ELLSAESSER, C.F. und L.W. CLEM (1986):

Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport.  
J. Fish Biol. **28**, 511 - 521.

ELLSAESSER, C.F. und L.W. CLEM (1987):

Blood serum chemistry measurements of normal and acutely stressed channel catfish.  
Comp. Biochem. Physiol. **88** A, 589 - 594.

EMERSON, K., R.C. RUSSO, R.E. LUND und R.V. THURSTON (1975):

Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature.  
J. Fish. Res. Board Can. **32**, 2379 - 2383.

EPPLER, A., C.B. HATHAWAY und B. NIBBIO (1989):

Circulatory catecholamines in the eel: origins and functions.  
Fish Physiol. Biochem. **7**, 273 - 278.

ESCH, G.W., J.W. GIBBONS und J.E. BOURQUE (1975):

An analysis of the relationship between stress and parasitism.  
Am. Midl. Nat. **93**, 339 - 353.

ESPELID, S., G.B. LOKKEN, K. STEIRO und J. BOGWALD (1996):

Effects of cortisol and stress on the immune system in atlantic salmon (*Salmo trutta* L.).  
Fish & Shellfish Immunol. **6**, 95 - 110.

ETLINGER, H.M., H.O. HODGINS und J. CHILLER (1976):

Evolution of the lymphoid system. I. Evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogen responses.  
J. Immunol. **116**, 1547 - 1553.

EVENBERG, D., P. De Graff, W. FLEUREN und W.B. Van MUISWINKEL (1986):

Blood changes in carp *Cyprinus carpio* induced by ulcerative *Aeromonas salmonicida* infections.  
Vet. Immunol. Immunopathol. **12**, 321 - 330.

FAGERLUND, U.H.M., J.R. McBRIDE und E.T. STONE (1981):

Stress-related effects of hatchery rearing density on coho salmon.  
Trans. Am- Fish. Soc. **110**, 644 - 649.

FAISAL, M. und R.J. HUGGET (1993):

Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the lymphocyte mitogenic responses in spot, *Leiostomus xanthurus*.  
Mar. Environ. Res. **35**, 121 - 124.

FERREIRA, J.T., G.L. SMIT und H.J. SCHOONBEE (1981a):

The effect of the anaesthetic benzocain hydrochloride on red cell fragilities in *Cyprinus carpio*.  
J. Fish Biol. **18**, 123 - 126.

FERREIRA, J.T., G.L. SMIT und H.J. SCHOONBEE (1981b):

Haematological evaluation of the anaesthetic benzocain hydrochloride in the freshwater fish *Cyprinus carpio* L.  
J. Fish Biol. **18**, 291 - 297:

FERGUSON, H.W. (1989):

Systemic pathology of fish.  
Iowa State University Press / Ames, 263 S.

FEVOLDEN, S.E. und K.H. ROED (1993):

Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high and low tolerance to stress.  
J. Fish Biol. **43**, 919 - 930.

FEVOLDEN, S.E., K.H. ROED und B. GJERDE (1994):

Genetic components of post-stress cortisol and lysozyme activity in atlantic salmon; correlations to disease resistance.

Fish & Shellfish Immunol. **4**, 507 - 519.

FEVOLDEN, S.E., R. REFSTIE und B. GJERDE (1993):

Genetic and phenotypic parameters for cortisol and glucose stress response in atlantic salmon and rainbow trout.

Aquaculture **118**, 205 - 216.

FEVOLDEN, S.E., R. REFSTIE und K.H. ROED (1991):

Selection for high and low cortisol response in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Aquaculture **95**, 53 - 65.

FEVOLDEN, S.E., R. REFSTIE und K.H. ROED (1992):

Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response.

Aquaculture **104**, 19 - 29.

FIJAN, N.N. (1968):

The survival of *Chondrococcus columnaris* in waters of different quality.

Bull. Off. int. Epizoot. **69**, 1159 - 1166.

FINDLAY, C. und M.F. TATNER (1994):

A comparative study of T and B lymphocytes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following their separation by nylon wool adherence and lectin agglutination techniques

Comp. Haematol. Int. **4**, 55 - 60.

FIVELSTAD, S., H. KALLEVIK, H.M. IVERSEN, T. MORETRO, K. VAGE und M. BINDE (1993):

Sublethal effects of ammonia in soft water on atlantic salmon at low temperature.

Aquaculture International **1**, 157 - 169.

FLOS, R., L. REIG, P. TORRES und L. TORT (1988):

Primary and secondary stress responses to grading and hauling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*.

Aquaculture **71**, 99 - 106

FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL und K. STARKE (1992):

Pharmakologie und Toxikologie, 6. Aufl.

BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich. 899 S.

FRYER, J.N. und R.E. PETER (1977):

Hypothalamic control of ACTH secretion in goldfish. III. Hypothalamic cortisol implant studies.  
Gen. Comp. Endocrinol. **33**, 215 - 225.

GILL, T.S. und A. EPPLÉ (1993):

Stress-related changes in the hematological profile of the american eel (*Anguilla rostrata*).  
Ecotox. Environ. Safety **25**, 227 - 235.

GRAHAM, M.S., C.M. WOOD und J.D. TURNER (1982):

The physiological response of the rainbow trout to strenuous exercise: interactions of water hardness and environmental acidity.  
Can. J. Zoo. **60**, 3153 - 3164.

GRANT, B.F. und P.M. MEHRLE (1973):

Endrin toxicosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).  
J. Fish Res. Board Can. **30**, 31 - 40.

GRIMM, A.S. (1985):

Suppression by cortisol of the mitogen-induced proliferation of peripheral blood leucocytes from plaice, *Pleuronecta platessa* L.  
In: I. MANNING und M.F. TATNER (Hrsg.): Fish Immunology. Academic Press., London, S. 263 - 271.

GRONOW, G. (1974):

Über die Anwendung des an Säugetieren erarbeiteten Begriffs Stress auf Knochenfische.  
Zool. Anz. **192**, 316 - 331.

HAMERS, R. (1995a):

Granulation staining and cytochemistry of peripheral blood leucocytes in healthy carp (*Cyprinus carpio* L.) II: Monocytes  
J. Appl. Ichthyol. **11**, 94 - 99.

HAMERS, R. (1995b):

Granulation staining and cytochemistry of peripheral blood leucocytes in healthy carp (*Cyprinus carpio* L.) II: Granulocytes  
J. Appl. Ichthyol. **11**, 86 - 93.

HAMERS; R. (1995c):

Hämatologische Untersuchungen zur Beurteilung von Stresszuständen beim Fisch.

Forschungs- und Tagungsberichte "Hygienestrategien in der Fischhaltung" aus dem Institut für Anatomie, Physiologie und Hygiene der Haustiere, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Heft Nr. 2,

S. 33 - 42.

HANKE, W. (1970):

Hormones.

Fortschr. Zool. 20, 317 - 380

HANSON, L.A. und J.M. GRIZZLE (1985):

Nitrite-induced predisposition of channel catfish to bacterial diseases.

Prog. Fish-Cult. **47**, 98 - 101.

HART, P. und D. O'SULLIVAN (1993):

Recirculation systems: design, construction and management.

Aquaculture Sourcebook, S. 111 - 127.

HATTINGH, J. (1975):

Heparin and EDTA as anticoagulants for fish blood.

Pflügers Arch. **355**, 347 - 352.

HAUG, R.T. und P.L. McCARTY (1972):

Nitrification with submerged filters.

Wat. Poll. Contr. Fed. **44**, 2086 - 2102.

HAWKEY , C.M. und T.B. DENNETT (1990):

Farbatlas der Hämatologie.

Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei, 192 S.

HEMING, A. (1989):

Clinical studies of fish blood: importance of sample collection and measurement techniques.

Am. J. Vet. Res. **50**, 93 - 97.

HENNING, H.-G., W. JUGELT und G. SAUER (1976):

Praktische Chemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 3. Aufl.

Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt am Main, 434 S.

HESSER, E.F. (1960):

Methods for routine fish hematology.

Prog. Fish-Cult. **22**, 164 - 170.

HIERHOLZER, K. und M. FROMM (1987):

Wasser- und Elektrolythaushalt; Physiologie der Niere. In: A. SCHEUNERT, A. TRAUTMANN und G. WITTKKE (Hrsg.): Lehrbuch der Veterinär-Physiologie, 7. Auflage.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S. 360 - 436.

HILLE, S. (1982):

A literature review of the blood chemistry of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich.

J. Fish Biol. **20**, 535 - 569.

HINES, R. und D.T. SPIRA (1973):

Ichthyophthiriasis in the mirror carp. III. Leucocyte response.

J. Fish. Biol. **5**, 527 - 534.

HIRAYAMA, K. (1970):

Studies on water control by filtration through sand bed in a marine aquarium with closed circulating system. IV. Acidification of aquarium water.

Bull. Japanese Society of Scientific Fisheries **36**, 26 - 34.

HLAVEK, R.R. und R.V. BULKLEY (1980):

Effects of malachit green on leucocyte abundance in rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson).

J. Fish biol. **17**, 431 - 444.

HOFFMANN, R. und R. LOMMEL (1984):

Effects on repeated blood sampling on some blood parameters in freshwater fish.

J. Fish Biol. **24**, 245 - 251.

HOFFMANN, R., R. LOMMEL und M. RIEDL (1982):

Influence of different anaesthetics and bleeding methods on hematological values un fish.

Arch. FischWiss. **33**, 91 - 103.

HOUSTON, A.H. (1990):

Blood and Circulation. In: C.B. SCHRECK und P.B. MOYLE (Hrsg.): Methods for Fish Biology.

American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA. S. 273 - 334.

HOUSTON, A.H., J.A. MADDEN, R.J. WOODS und H.M. MILES (1971):

Some physiological effects of handling and tricaine-methane-sulphonate anesthetization upon brook trout, *Salvelinus fontinalis*.

J. Fish. Res. Bd. Can. **28**, 625 - 633.

HOUSTON, A.H., J.A. MADDEN, R.J. WOODS und H.M. MILES (1971a):

Variations in the blood and tissue chemistry of brook trout, *Salvelinus fontinalis*, subsequent to handling, anesthesia, and surgery.

J. Fish. Res. Bd. Can. **28**, 635 - 642.

HUNN, J.B. und J.L. ALLEN (1974):

Movement of drugs across the gills of fishes.

Ann. Rev. Pharmacol. **14**, 47 - 55.

HUNN, J.B., R.H. WIEDMEYER, I.E. GREER und A.W. GRADY (1992):

Blood chemistry of laboratory-reared golden Trout.

J. Aquat. Anim. Health **4**, 218 - 222.

ISAACSON, P.A. und N.I. MORRISON (1980):

Occult hemoglobin as an indicator of impingement stress in fishes.

Prog. Fish-Cult. **42**, 9.

ISHIOKA, H. (1980):

Stress reactions in the marine Fish - I. Stress reactions induced by temperature changes.

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. **46**, 523 - 531.

ISHIOKA, H. (1984a):

Effects of handling and anaesthetization with MS 222 on the blood constituents of red sea bream, *Pagrus major*.

Bull. Nansei Reg. Fish. Res. Lab. **16**, 53 - 62.

ISHIOKA, H. (1984b):

Stress response to transportation in the red sea bream, *Pagrus major*.

Bull. Nansei Reg. Fish. Res. Lab. **16**, 63 - 71.

IUCHI, I. (1973):

Chemical and physiological properties of the larval and the adult hemoglobins in rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*.

Comp. Biochem. Physiol. **44 B**, 1087 - 1101.

IWAMA, G.K. und A. ISHIMATSU (1994)

Cannulation of blood vessels. In: J.S. STOLEN, T.C. FLETCHER, A.F. ROWLEY, J.T. ZELIKOFF, D.P. ANDERSON, S.L. KAATTARI und S.A. SMITH (Hrsg.): Techniques in Fish Immunology. Fish Immunology Technical Communications No. 3. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, 1994, S. 1 - 17.

JÄRVI, T. (1990):

Cumulative acute physiological stress in Atlantic salmon smolts: the effect of osmotic imbalance and the presence of predators.

Aquaculture 89, 337 - 350.

JOHANNSSON-SJÖBECK, M.-L., G. DAVE A. LARSSON, K. LEWANDER und U. LIDMAN (1978):

Hematological effects of cortisol in the European eel, *Anguilla anguilla* L.

Comp. Biochem. Physiol. **60** A, 165 - 168.

JUJENA, C.J. und C.L. MAHAJAN (1983):

Haematological and haemopoietic changes in fish *Channa punctatus* due to mercury pollution in water.

Indian J. Anim. Res. **17**, 63 - 71.

KAATTARI, S.L. und R.A. TRIPP (1987):

Cellular mechanisms of glucocorticoid immunosuppression in salmon.

J. Fish Biol. **31** (Suppl. A), 129 - 132.

KEBUS, M.J., M.T. COLLINS, M.S. BROWNFIELD, C.H. AMUNDSON, T.B. KAYES und J.A.

MALISON (1992):

Effects of rearing densities on the stress response and growth of rainbow trout.

J. Anim. Health **4**, 1 - 6.

KIME, D.E. und N.J. MANNING (1982):

Seasonal pattern of free and conjugated androgens in the brown trout *Salmo trutta*.

Gen. Comp. Endocrinol. **48**, 222 - 231.

KJARTANSSON, H., S. FIVELSTAD, J.M. THOMASSEN und M.J. SMITH (1988):

Effect of different stocking densities on physiological parameters and growth of adult atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in circular tanks.

Aquaculture **73**, 261 - 274.

KLINGER, H., H. DELVENTHAL und V. HILGE (1983):

Water quality and stocking density as stressors of channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf.).  
*Aquaculture* **30**, 263 - 272.

KLONTZ; G.W. (1994):

Fish hematology. In: J.S. STOLEN, T.C. FLETCHER, A.F. ROWLEY, J.T. ZELIKOFF, D.P. ANDERSON, S.L. KAATTARI und S.A. SMITH (Hrsg.): *Techniques in Fish Immunology*. Fish Immunology Technical Communications No. 3. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, 1994, S. 121 - 131.

KNITTEL, M.D. (1981):

Susceptibility of steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson to redmouth infection *Yersinia ruckeri* following exposure to copper.  
*J. Fish Dis.* **4**, 33 - 40.

KOLLER, L.D. (1979):

Effects of environmental contaminants on the immune system.  
*Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **23**, 267 - 295.

KORT, W.J. (1994):

The effect of chronic stress on the immune response.  
*Adv. Neuroimmunol.* **4**, 1 - 11.

KREUTZMANN, H.L. (1984):

Ergebnisse zur Morphologie der Erythrozytenreihe gesunder und belasteter Fische.  
*Z. Binnenfisch. DDR* **31**, 167 - 172.

LADU, B.M.B und L.G. ROSS (1992):

The effect of methods of immobilization on the haematology and tissue chemistry of rainbow trout.  
*Aquaculture* **100**, 172.

LAGLER, K.F., J.E. BARDACH, R.R. MILLER und D.R.M. PASSINO (1977): *Ichthyology*, 2. Aufl. John Wiley und Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 506 S.

LAIDLEY, C.W. und J.F. LEATHERLAND (1988):

Cohort sampling, anaesthesia and stocking-density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson.  
*J.Fish Biol.* **33**, 73 - 88.

- LAIDLEY, C.W., P.T.K. WOO und J.F. LEATHERLAND (1988):  
The stress-response of rainbow trout to experimental infection with the blood parasite cryptobia salmositica.  
J. Fish Biol. **32**, 253 - 261.
- LANDAU, M. (1992):  
Introduction to aquaculture.  
John Wiley und Sons Inc. New York, 440 S.
- LANG, T.G., G. PETERS, R. HOFFMANN und E. MEYER (1988):  
Experimental investigations on the toxicity of ammonia: effects on ventilatory frequency, growth and epidermal mucous cells of *Salmo gairdneri* (Rich.).  
Dis. Aquat. Org. **3**, 159 - 165.
- LARSEN, H.N. und S.F. SNIESZKO (1961):  
Comparison of various methods of determination of hemoglobin in trout blood.  
Progr. Fish-Cult. **23**, 8 - 11.
- LARSSON, P.O. (1985):  
Predation on migrating smolts as an important regulating factor for salmon, *Salmo salar*, populations.  
J. Fish Biol. **26**, 391 - 397.
- LEATHERLAND, J.F. (1993):  
Stocking densities and cohort sampling effects on endocrine interactions in rainbow trout.  
Aquaculture Intern. **1**, 137 - 156.
- LEATHERLAND, J.F. und C.Y. CHO (1985):  
Effects of rearing density on thyroid and interrenal gland activity and plasma and hepatic metabolite levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson.  
J. Fish Biol. **27**, 583 - 592.
- LEE, R.M., S.D. GERKING und B. JEZIERSKA (1983):  
Electrolyte balance and energy metabolism in acid-stressed rainbow trout (*Salmo gairdneri*), and their relation to reproductive stress.  
Environ. Biol. Fish. **8**, 115 - 123.
- LEHMANN, J. und F.-J. STÜRENBERG (1980):  
Techniken zur Blutentnahme bei Süßwassernutzfischen.  
Fisch und Umwelt **8**, 78 -88.

LEHMANN, J. und F.-J. STÜRENBERG (1981):

Die Auswertbarkeit von Blutparametern und Methoden zu ihrer Bestimmung in der Fischtoxikologie. *Fisch & Umwelt* 9, 25 - 50.

LEHMANN, J., F.-J. STÜRENBERG und F. HESSE (1976):

Hämatologisch-serologische Substratuntersuchungen an der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Richardson). III. Normwerte des Hämogramms unter Berücksichtigung alters- und jahreszeitlicher Schwankungen.

*Gewässer und Abwässer* **59**, 1 - 32.

LEHMANN, J., F.-J. STÜRENBERG und D. MOCK (1989):

Changes in the haemogram of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) following an experimental infection with a strain of *Aeromonas salmonicida salmonicida*.

In: K. LILLELUND und H. ROSENTHAL (Hrsg.): Contributions to the Canadian-German Cooperation Programme. Hamburg/Bonn, Bundesministerium für Forschung und Technologie, S. 259 - 284.

LEHMANN, J., F.-J. STÜRENBERG und D. MOCK (1989a):

The changes of the hemogram of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to an artificial and a natural infection with *Yersinia ruckeri*.

*J. Appl. Ichthyol.* **3**, 174 - 183.

LEHMANN, J., R. HAMERS und F.-J. STÜRENBERG (1994):

Hämatologie des Karpfen (*Cyprinus carpio* L.).

Landesanstalt für Fischerei NRW, Fischphysiologie und Fischkrankheiten, 70 S.

LEVINE, S. und URSIN, H. (1991):

What is stress. In: M.R. BROWN, M.R. RIVIER und G. KOOB (Hrsg.): Neurobiology and Neuroendocrinology of Stress. Marcel Decker Verlag, New York, 1991.

LEWIS, W.M. und D.P. MORRIS (1986):

Toxicity of nitrite to fish: a review.

*Trans. Amer. Fish. Soc.* **115**, 183 - 195.

LLOYD, R. (1992):

Effect of some common pollutants on fish. In: R. Lloyd (Hrsg.): Pollution and Freshwater Fish. Fishing News Books, S. 62 - 95.

LLOYD, R. und L.D. ORR (1969):

The diuretic response by rainbow trout to sub-lethal concentrations of ammonia.  
Wat. Res. **3**, 335 - 344.

LIMSUWAN, C., T. LIMSUWAN, J.M. GRIZZLE and J.A. PLUMB (1983):

Stress response and blood characteristics of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after anesthesia with etomidate.  
Can. J. Fish. Aquat. Sci. **40**, 2105 - 2112.'

LOCHMILLER, R.L., J.D. WEICHMANN und A.V. ZALE (1989):

Hematological assessment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of striped bass (*Morone saxatilis*).  
Comp. Biochem. Physiol. **93 A**, 535 - 541.

LÖFFLER, G. und P.E. PETRIDES (1990):

Physiologische Chemie, 4. Aufl.  
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1036 S.

LORENZ, R.J. (1992):

Grundbegriffe der Biometrie, 3. Aufl.  
Gustav Fischer Verlag, 241 S.

LOWE-JINDE, L. und A.J. NIIMI (1983):

Influence of sampling on the interpretation of haematological measurements of rainbow trout, *Salmo gairdneri*.  
Can. J. Zool. **61**, 396 - 402.

MARGIOCCO, C., A. ARILLO, P. MENSI und G. SCHENONE (1983):

Nitrite bioaccumulation in *Salmo gairdneri* Rich, and hematological consequences.  
Aquat. Toxicol. **3**, 261 - 270.

MATTHEIS, TH. (1989):

Umweltrelevanz landwirtschaftlicher Abbauprodukte aus binnenwirtschaftlicher Sicht.  
Fortschr. Fisch.wiss. **8**, 59 - 71.

MAULE, A.G., C.B. SCHRECK und S.L. KAATTARI (1987):

Changes in the immun system of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during parr-smolt transformation and after implantation of cortisol.  
Can. J. Fish. Aquat. Sci. **44**, 161 - 166.

- MAULE, A.G., R.A. TRIPP, S.L. KAATTARI und C.B. SCHRECK (1989):  
Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).  
J. Endocrinol. **120**, 135 - 142.
- MAWDESLEY-THOMAS, L.E. (1971):  
Toxic chemicals - the risk to fish.  
New Sci **14**, 74 - 75.
- MAYR, A. (1990):  
Beliebte Krankheitsursachen. In: H. STÜNZI und E. WEISS (Hrsg.): Allgemeine Pathologie für Tierärzte  
und Studierende der Tiermedizin, 8. Aufl.  
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S. 48 - 64.
- MAZIK, P.M., M.L. HINMAN, D.A. WINKELMANN, S.J. KLAINÉ, B.A. SIMCO und N.C. PARKER  
(1991):  
Influence of nitrite and chloride concentrations on survival and hematological profiles of striped bass.  
Trans. Am. Fish. Soc. **120**, 247 - 254.
- MAZEAUD, M.M., F. MAZEAUD und E.M. DONALDSON (1977):  
Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review.  
Trans. Am. Fish. Soc. **106**, 201 - 211.
- MAZUR, C.F. und G.K. IWAMA (1993):  
Handling and crowding stress reduces the number of plaque-forming cells in Atlantic salmon  
(*Salmo salar* L.).  
J. Aquat. Anim. Health **5**, 98 - 101.
- McCARTHY, D.H., J.P. STEVENSON und M.S. ROBERTS (1973):  
Some blood parameters of rainbow trout (*Salmo gairdneri*).  
J. Fish Biol. **5**, 1 - 8.
- McDONALD, D.G. (1983):  
The interaction of environmental calcium and low pH on the physiology of the rainbow trout, *Salmo  
gairdneri*. I. Branchial and renal net ion and H<sup>+</sup> fluxes.  
J. Exp. Biol. **102**, 123 - 140.
- McDONALD, D.G. und C.M. WOOD (1981):  
Branchial and renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at low environmental pH.  
J. Exp. Biol. **93**, 101 - 118.

McLEAY, D.J. (1973):

Effects of cortisol and dexamethason on the pituitary-interrenal axis and abundance of white blood cell types in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*.

Gen. Comp. Endocrinol. **21**, 441 - 450.

McLEAY, D.J. (1973a):

Effects of a 12-hr and 25-day exposure to kraft pulp mill effluent on the blood and tissues of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).

J. Fish. Res. Board Can. **30**, 395 - 400.

McLEAY, D.J. (1975):

Sensitivity of blood cell counts in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to stressors including sublethal concentrations of pulpmill effluents and zink.

J. Fish. Res. Board Can. **32**, 2357 - 2364.

McLEAY, D.J. und D.A. BROWN (1974):

Growth stimulation and biochemical changes in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to a bleached kraft pulp mill effluent for 200 days.

J. Fish. Res. Board Can. **31**, 1043 - 1049.

McLEAY, D.J. und D.A. BROWN (1975):

Effects of acute exposure to bleached kraft pulpmill effluent on carbonate metabolism of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during rest and exercise.

J. Fish. Res. Board Can. **32**, 753 - 760.

McLEAY, D.J. und M.R. GORDON (1977):

Leucrit: a simple hematological technique for measuring acute stress in salmonid fish, including stressful concentrations of pulpmill effluent.

J. Fish. Res. Board Can. **34**, 2164 - 2175.

McWILLIAMS, P.G. (1980):

Acclimatisation to an acid medium in the brown trout *Salmo trutta*.

J. Exp. Biol. **88**, 269 - 280.

MELOTTI, P., A. RONCARATI, E. GARELLA, O. CARNEVALI, G. MOSCONI und A.

POLZONETTI-MAGNI (1992):

Effects of handling and capture stress on plasma glucose, cortisol and androgen levels in brown trout, *Salmo trutta morpha fario*.

J. Appl. Ichthyol. **8**, 234 - 239.

MERKENS, J.C. und K.M. DOWNING (1957):

The effect of tension of dissolved oxygen on the toxicity of un-ionized ammonia to several species of fish.

Ann. Appl. Biol. **45**, 521 - 527.

MESSER, J.J., J. HO und W.J. GRENNEY (1984):

Ionic strength correction for extent of ammonia ionization in freshwater.

Can. J. Fish. Aquat. Sci **41**, 811 - 815.

MILLER, W.R., A.C. HENDRICKS und J. CAIRNS (1983):

Normal ranges for diagnostically important hematological and blood chemistry characteristics of rainbow trout (*Salmo gairdneri*).

Can. J. Fish. aquat. Sci. **40**, 420 - 425.

MÖCK, A. und G. PETERS (1990):

Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution.

J. Fish Biol. **37**, 873 - 885.

MUDRAK, K. und S. KUNST (1991):

Biologie der Abwasserreinigung, 3. Aufl.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 194 S.

MURRAY, S.A. (1980):

Effects of loading density on catfish blood.

Experimentia **36**, 205 - 206.

MURRAY, S.A. und BURTON, C.B. (1979):

Effects of density on goldfish blood. II. Cell morphology.

Comp. Biochem. Physiol. **62 A**, 559 - 562.

MYSZKOWSKI, L. und A.K. SIWICKI (1994):

Compensating effect of chlormetin on immuno-suppression caused by nitrit in juvenile common carp.

Dev. Comp. Immunol. **18** (Suppl 1), S 156.

NAGAE, M., H. FUDA, A. HARA, M. SANEYOSHI und K. YAMAUCHI (1994):

Changes in serum concentrations of immunoglobulin M (IgM), cortisol and thyroxine (T4) during smoltification in the masu salmon (*Oncorhynchus masou*).

Fiheries Science **60**, 241 - 242.

NIEPAGE, H. (1989):

Methoden der praktischen Hämatologie für Tierärzte, 2. Auflage.  
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 77 S.

NISHIOKA, R.S., E.G. GRAU und H.A. BERN (1985):

In vitro release of growth hormone from the pituitary gland of tilapia, *Oreochromis mossambicus*.  
Gen. Comp. Endocrinol. **60**, 90 - 94.

OIDTMANN, B. (1994):

Untersuchungen zum Auftreten von Schäden und Veränderungen des Blutbildes bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) in Teichhaltungen im Vergleich mit Wildforellen.  
Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München.

OIDTMANN, B. und R.W. HOFFMANN (1994):

Einfluß der Haltungsbedingungen auf die Regenbogenforellen.  
Tagung der Fachgruppe Tierschutzrecht und Gerichtliche Veterinärmedizin und Fischkrankheiten,  
"Tierschutzgerechte Haltung von Heimtieren sowie Zier- und Nutzfischen", Stuttgart-Hohenheim 10.3. -  
11.3.94, S. 50 - 72.

OLIVER, J.H. (1957):

The chemical composition of the sea water in the aquarium.  
Proceedings of the Zoological Society, London, S. 137 - 145.

PALACKOVA, J. und Z. ADAMEK (1992):

The application of methaemoglobin concentration assessment for the estimation of sublethal disturbances in fish.  
EIFAC/FAO Symposium on Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish, Lugano, Switzerland, 19-22 May 1992.

PAINTER, H.A. (1977):

Microbial transformations of inorganic nitrogen.  
Prog. Wat. Tech. **8**, 3 - 29.

PAULY, D. (1979):

Gill size and temperature as governing factors in fish growth: a generalization of Von Bertalanffy's growth formula.  
Berichte aus dem Institut für Meereskunde, Nr. 63, 156 S.

PEARSON, M.P. und E.D. STEVENS (1991):

Size and hematological impact of the splenic erythrocyte reservoir in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.

Fish Physiol. Biochem. **9**, 39 - 50.

PEARSON, C.M., P.J. CLEMENTS und D.T.Y. YU (1978):

The effects of corticosteroids on lymphocyte functions.

Eur. J. Rheumatol. Inflamm. **1**, 216 - 225.

PEDDIE, C.M. und V.J. SMITH (1995):

Lymphocyte-like cells in ascidians: precursors for vertebrate lymphocytes ?

Fish & Shellfish Immunol. **5**, 613 - 629.

PETERS, G. (1982):

The effect of stress on the stomach of the european eel, *Anguilla anguilla* L..

J. Fish Biol. **21**, 497 - 512

PETERS, G., H. DELVENTHAL und H. KLINGER (1980):

Physiological and morphological effects of social stress in the eel (*Anguilla anguilla*).

Arch. FischWiss. **30**, 157 - 180.

PETERS, G., A. NÜßGEN, A. RAABE und A. MÖCK (1991):

Social stress induces structural and functional alterations of phagocytes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Fish & Shellfish Immunol. **1**, 17 - 31.

PETERS, G. und R. SCHWARZER (1985):

Changes in hemopoietic tissue of rainbow trout under influence of stress.

Dis. Aquat. Org. **1**, 1 - 10.

PETRIDES, P.E. (1990):

Intermediärstoffwechsel IV: Aminosäuren. In: G. LÖFFLER und P.E. PETRIDES (1990):

Physiologische Chemie, 4. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, S. 443 - 505.

PEFFER, E. (1987):

Absorption. In: A. SCHEUNERT, A. TRAUTMANN und G. WITTKE (Hrsg.): Lehrbuch der Veterinär-Physiologie, 7. Auflage.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S. 360 - 436.

PICKERING, A.D. (1984):

Cortisol induced lymphopenia in brown trout, *Salmo trutta* L.  
Gen. Comp. Endocrinol. **53**, 253 - 259.

PICKERING, A.D. (1990):

Stress and the suppression of somatic growth in teleost fish.  
Progress in Comparative Endocrinology, Wiley-Liss, Inc., S. 473 - 479.

PICKERING, A.D. und J. DUSTON (1983):

Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L., and its effect on the susceptibility to saprolegnia infection and furunculosis.  
J. Fish Biol. **23**, 163 - 175.

PICKERING, A.D. und T.G. POTTINGER (1985):

Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta* L., to disease without reducing the blood cell count.  
J. Fish Biol. **27**, 611 - 619.

PICKERING, A.D. und T.G. POTTINGER (1987):

Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimatisation.  
J. Fish. Biol. **30**, 701 - 712.

PICKERING, A.D. und T.G. POTTINGER (1987a):

Lymphocytopenia and interrenal activity during sexual maturation in the brown trout, *Salmo trutta* L.  
J. Fish Biol. **30**, 41 - 50.

PICKERING, A.D. und T.G. POTTINGER (1989):

Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effect of chronic elevation of plasma cortisol.  
Fish Physiol. Biochem. **34**, 253 - 258.

PICKERING, A.D., T.G. POTTINGER und P. CHRISTIE (1982):

Recovery of brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study.  
J. Fish Biol. **20**, 229 - 244.

PICKERING, A.D., T.G. POTTINGER und J.P. SUMPTER (1987):

On the use of dexamethason to block the pituitary-interrenal axis in brown trout, *Salmo trutta* L.  
Gen. Comp. Endocrinol. **65**, 346 - 353.

PICKERING, A.D. und A. STEWARD (1984):

Acclimatisation of the interrenal tissue of the brown trout, *Salmo trutta* L., to chronic crowding stress.  
J. Fish Biol. **24**, 731 - 740.

PLONAIT, H. (1980):

Labordiagnostik für die tierärztliche Praxis.  
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1489 S.

POTTINGER, T.G., T.A. MORAN und J.A.W. MORGAN (1994):

Primary and secondary indices of stress in the progeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high and low responsiveness to stress.  
J. Fish Biol. **44**, 149 - 163.

POTTINGER, T.G., A.D. PICKERING und M.A. HURLEY (1992):

Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.  
Aquaculture **103**, 275 - 289.

PULSFORD, A.L., M. CRAMPE, A. LANGSTON und P.J. GLYNN (1995):

Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and vitamine E on the immune system of flatfish.  
Fish & Shellfish Immunol. **5**, 631 - 643.

PUND, R.P. (1983):

Versuche über die Wachstumsleistung von *Coregonus lavaretus* in Abhängigkeit vom Salzgehalt.  
Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

PUND, R.P. und E.-M. BERNOTH (1992):

Standardisierung der Haltung von Bachforellen (*Salmo trutta* L.) im geschlossenen Kreislauf zur Infektion mit *Aeromonas salmonicida* über das Wasser.

Vortrag, gehalten anlässlich der gemeinsamen Tagung der deutschen Sektion der EAFP (European Association of Fish Pathologists) und der Fachgruppe Fische der DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft), Tierärztliche Hochschule Hannover, 20. - 22 September 1992.

RAILO, E., M. NIKINMAA und A. SOIVIO (1985):

Effects of sampling on blood parameters in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson.  
J. Fish Biol. **26**, 725 - 732.

RAM BHASKAR, B. und S. RAO (1990):

Use of hematological parameters as diagnostic tools in determining the health of milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.), in brackishwater culture.

Aquacult. Fish. Manag. 21, 125 - 129

REDDING, J.H., R. PATINO und C.B. SCHRECK (1984):

Clearance of corticosteroids in yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in fresh water and seawater and after stress.

Gen. Comp. Endocrinol. **54**, 433 - 443.

RICK, W (1990):

Klinische Chemie und Mikroskopie. 6. Aufl.

Springer Verlag, Berlin, 543 S.

RIVA, M.C. und R. FLOS (1993):

Hematological values of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* W., exposed to premetallized dyes.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. **51**, 274 - 281.

ROBERTS, R.J. und H.-J.- SCHLOTTFELDT (1985):

Grundlagen der Fischpathologie. Verlag Paul Parey, 450 S.

ROBERTS, R.J. (1989):

Laboratory Methods. In: R.J. Roberts (Ed.) Fish Pathology, 2<sup>nd</sup> Ed.

Bailliere Tindall, London, Philadelphia, Sydney, Tokyo, Toronto, S. 374 - 405.

ROBERTS, R.J. (1989a):

The pathophysiology and systemic pathology of teleosts. In: R.J. ROBERTS (Hrsg.): Fish Pathology, 2<sup>nd</sup> Ed. Bailliere Tindall, London, Philadelphia, Sydney, Tokyo, Toronto, S.56 - 134.

ROHBOM, R.A. und M.F. NITKOWSKY (1974):

Physiological response of the cunner, *Tautoglabrus adspersus* to cadmium. IV. Effects on the immune system. Zit. in: SINDERMANN, C.J. (1984): Fish and environmental impacts.

Arch. Fisch.Wiss. **35**, 125 - 160.

ROMEIS, B. (1989):

Mikroskopische Technik. 17. Aufl.

Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, Seite 469 - 490.

ROWLEY, A.F. (1990):

Collection, separation and identification of fish leucocytes. In: J.S. STOLEN, T.C. FLETCHER, D.P.

ANDERSON, B.S. Roberson und W.B. VAN MUISWINKEL (Hrsg.): Techniques in Fish Immunology.

Fish Immunology Technical Communications No. 1. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, 1990,

S. 113 - 136.

SACHS, L. (1978):

Angewandte Statistik, 5. Aufl.

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 520 S.

SCHÄPERCLAUS, W., H.KULOW und K. SCHRECKENBACH (1990):

Fischkrankheiten, Teil I, 5. Auflage.

Akademie-Verlag Berlin, 508 S.

SAEKI, A. (1958):

Studies on the fish culture in the aquarium of closed circulating system. Its fundamental theory and standart plan.

Bull. Japanese Society of Scientific Fisheries **23**, 684 - 695.

SANO, T. (1960):

Hematological studies of culture fishes in Japan. II. Seasonal variation of the blood constituents of rainbow trout.

J. Tokyo Univ. Fish. **46**, 67 - 75.

SHAW, A.F.B. (1930):

A direct method for counting leucocytes, thrombocytes and erythrocytes of birds' blood.

J. Path. and Bact. **33**, 833 - 835.

SCHEDLOWSKI, M. (1994):

Stress, Hormone und zelluläre Immunfunktionen.

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.

SCHRECK, C.B., C.M. BRADFORD, M.S- FITZPATRICK und R. R. PATINO (1989):

Regulation of the interrenal of fishes: non-classical control mechanisms.

Fish Physiol. Biochem. **7**, 259 - 265.

SCHRECK, C.B. und H.W. LORZ (1978):

Stress resonance of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) elicited by cadmium and copper and potential use of cortisol as an indicator of stress.

J. Fish. Res. Board Can. **35**, 1124 - 1129.

SCHRECK, C.B. und P.B. MOYLE (1990):

Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, 684 S.

SCHWOERBEL, J. (1993):

Einführung in die Limnologie.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, 387 S.

SECOMBES, C.J. und T.C. FLETCHER (1992):

The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish.

Ann. rev. Fish Dis. **2**, 53 - 71.

SECOMBES, C.J., T.C. FLETCHER, J.A. O'FLYNN, M.J. COSTELLO, R. STAGG und D.F. HOULIHAN (1991):

Immunocompetence as a measure of the biological effects of sewage sludge pollution in fish.

Comp. Biochem. Physiol. **100 C**, 133 - 136.

SELYE, H. (1936):

A syndrom produced by diverse nocuous agents.

Nature **138**, 32.

SELYE, H. (1950):

Stress and general adaptation syndrome.

Br. Med. J. **1**, 1383 - 1392.

SELYE, H. (1956):

The stress of life.

New York, McGraw-Hill, 1956.

Zitiert in: SCHEDLOWSKI, M. (1994): Stress, Hormone und zelluläre Immunfunktionen. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.

SINDERMAN, C.J. (1983):

An examination of some relationships between pollution and disease.

Rapp. P.-v. Reun. Cons. int. Explor. Mer. **182**, 37 - 43.

SINDERMANN, C.J. (1984):

Fish and environmental impacts.

Arch. Fisch.Wiss. **35**, 125 - 160.

SIRE, M.F. und J.-M. VERNIER (1995):

Partial characterization of eosinophilic granule cells (EGC's) and identification of mast cells in the intestinal lamina propria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biochemical and cytochemical study.

Biol. Cell **85**, 35 - 41.

SIWICKI, A.K. and M. STUDNICKA (1992):

Stimulation of nonspecific immunity after immunosuppression induced by chemical stress in carp (*Cyprinus carpio*).

FAO/EIFAC/XVII/92/Symp. **E 17**, Lugano, Switzerland.

SIWICKI, A.K., D.P. ANDERSON und M. STUDNICKA (1994):

The immune system of fish.

Archives of Polish Fisheries **2**, 67 - 79.

SIWICKI, A.K. und M. DUNIER (1994):

Effects of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. II. In vitro restoration of antibody-secreting cells and lymphocyte proliferation activity by nitrogranulogen after in vivo immunosuppression due to lindane.

Ecotox. Environ. Safety **27**, 316 - 323.

SMIT, G.L., P.S.J. HALLIDAY und J. HATTINGH (1978):

The effect of neutralization of the anaesthetic MS 222 on freshwater quality.

J. Limn. Soc. S. Afr. **4**, 31 - 34.

SMIT, G.L. und H.J. SCHOONBEE (1976):

Problems encountered with EDTA as an anticoagulant for fish blood.

South Afr. J. Sci **72**, 380 - 381.

SMIT, G.L., J. HATTINGH und H.J. SCHOONBEE (1977):

Observations on some effects of disodium ethylene-diamine-tetra-acetate and heparine on fish blood.

Comp. Biochem. Physiol. **57 C**, 35 - 38.

SMIT, G.L., J. HATTINGH und A.P. BURGER (1979a):

Haematological assessment of the effects of the anaesthetic MS 222 in natural and neutralized form in three freshwater fish species: interspecies differences.

J. Fish Biol. **15**, 633 - 643.

SMIT, G.L. und J. HATTINGH (1979b):

Anaesthetic properties of MS 222 and neutralized MS 222 as studied in three freshwater fish species.

Comp. Biochem. Physiol. **55**, 12 - 20.

SMIT, G.L. und J. HATTINGH (1980):

Haematological assessment of generally used freshwater fish blood anticoagulants.

J. Fish Biol. **17**, 337 - 341.

SMITH, A.C. und F. RAMOS (1976):

Occult haemoglobin in fish skin mucus as an indicator of early stress.

J. Fish Biol. **9**, 537 - 541.

SNIESZKO, S.F. (1974):

The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fish.

J. Fish Biol. **6**, 197 - 208.

SOIVIO, A., K. NYHOLM und M. HUHTI (1977):

Effects of anesthesia with MS 222, neutralized MS 222 and benzocaine on blood constituents of rainbow trout, *Salmo gairdneri*.

J. Fish Biol. **10**, 91 - 101.

SOIVIO, A. und A. OIKARI (1976):

Haematological effects of stress on a teleost, *Esox lucius* L.

J. Fish Biol. **8**, 397 - 411.

SPAETHE, R. (1984):

Hämostase.

AHS/Deutschland GmbH, 166 S.

SRIVASTAVA, A.K. und U. AGRAWAL (1977):

Involvement of pituitary-interrenal axis and cholinergic mechanisms during the cold shock leucocyte sequence in a fresh water teleost, *Colisa fasciatus*.

Arch. Anat. Micros. **66**, 97 - 108.

STAPLES, L.D., R.M. BINNS und R.B. HEAP (1983):

Influence of certain steroids on lymphocyte transformation in sheep and goats studies in vitro.

J. Endocr. **98**, 55 - 69.

STAVE, J.W. und B.S. ROBERSON (1985):

Hydrocortison suppresses the chemiluminescent response of striped bass phagocytes.

Dev. Comp. Immunol. **9**, 77 - 84.

STEFFENS; W. (1985):

Grundlagen der Fischernährung.

VEB Gustav Fischer Verlag Jena.

STOSKOPF, M. (1993):

Anaesthesia. In: L. Brown (Hrsg.): Aquaculture for Veterinarians.  
Pergamon Press, Oxford, New York, Seoul, Tokyo, S. 161 - 168

STRANGE, R.J. und C.B. SCHRECK (1978):

Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling chinook salmon (*Oncorhynchus tshawitscha*).  
J. Fish. Res. Bd. Can. **35**, 345 - 349.

STRANGE, R.J., C.B. SCHRECK und R.D. EWING (1978):

Cortisol concentrations in confined juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).  
Trans. Am. Fish. Soc. **107**, 812 - 819.

SUMPTER, J.P. und E.M. DONALDSON (1986):

The development and validation of a radioimmunoassay to measure plasma ACTH levels in salmonid fishes.  
Gen. Comp. Endocrinol. **62**, 367 - 376.

SUMPTER, J.P., A.D. PICKERING und T.G. POTTINGER (1985):

Stress-induced elevation of plasma  $\alpha$ -MSH and endorphin in brown trout, *Salmo trutta* L.  
Gen. Comp. Endocrinol. **59**, 257 - 265.

SUMPTER, J.P., H.M. DYE und T.J. BENFEY (1986):

The effects of stress on plasma ACTH,  $\alpha$ -MSH, and cortisol levels in salmonid fishes.  
Gen. Comp. Endocrin. **62**, 377 - 385.

TAM, W.H., L. BIRKETT, R. MAKARAN, P.D. PAYSON, D.K. WHITNEY und Ck.C. YU (1987):

Modification of carbohydrate metabolism and liver vitellogenic function in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by exposure to low pH.  
Can. J. Fish. Aquat. Sci. **44**, 630 - 635.

THUVANDER, A. (1989):

Cadmium exposure of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: effects on immune functions.  
J. Fish Biol. **35**, 521 - 529.

TRIPP, R.A., A.G. MAULE, C.B. SCHRECK und S.L. KAATTARI (1987):

Cortisol mediated suppression of salmonid lymphocyte responses in vitro.  
Dev. Comp. Immunol. **11**, 565 - 576.

TRUSSEL, R.P. (1972):

The percent un-ionized ammonia in aqueous ammonia solutions at different pH levels and temperatures.  
J. Fish. Res. Board Can. **29**, 1505 - 1507.

TUCKER, C.S., R. FRANCIS-FLOYD und M. H. BELEAU (1989):

Nitrit-induced anemia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque.  
Bull. Environ. Contam. Toxicol. **43**, 295 - 301.

TWITCHEN, I.D. und EDDY, F.B. (1994):

Sublethal effects of ammonia.  
Aquatic Toxicol. **30**, 27 - 45.

URSIN, H. und M. OLFF (1993):

The stress response. In: C. STANFORD, P. SALOMON und J. GRAY (Hrsg.): Stress, an Integrated Approach. Academic Press, San Diego 1993.

VERBUG-Van KEMENADE, B.M.L., F.A.A. WEYTS und G. FLIK (1994):

The hypothalamus-hypophysis-interrenal axis in carp (*Cyprinus carpio* L.) and its relation to the immune system.  
Dev. und Comp. Immunol. **18** (Suppl. 1), S 69.

WALCZAK, B.Z., B.R. BLUNT und P.V. HODSON (1987):

Phagocytic function of monocytes and hematological changes in rainbow trout injected intraperitoneally with benzo(a)-pyrene (B(a)P) and benzo(a)anthracene (B(a)A).  
J. Fish Biol. **31** (Suppl. A), 251 - 253.

WALTERS, G.R. und J.A. PLUMB (1980):

Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque.  
J. Fish Biol. **17**, 177 - 185.

WARING, C.P., R.M. STAGG und M.G. POXTON (1992):

The effects of handling on flounder (*Platyichthys flesus* L.) and atlantic salmon (*Salmo salar* L.).  
J. Fish Biol. **41**, 131 - 144.

WEDEMEYER, G.A., B.A. BARTON und D. J. McLEAY (1990):

Stress and acclimation. In: C.B. SCHRECK und P.B. MOYLE (Hrsg.): Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA. S. 451 - 477.

WEDEMEYER, C.A. UND W.T.YASUTAKE (1978):

Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*).  
J. Fish. Res. Board Can. **35**: 822 - 827.

WEDEMEYER, G. (1970a):

Stress of anaesthesia with MS-222 and benzocain in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).  
J. Fish Res. Board Can. **27**, 1162 - 1164.

WEDEMEYER, G. (1970 b):

The role of stress in the disease resistance of fishes.  
Am. Fish. Soc. Spec. Publ. **5**, 30 - 35

WEDEMEYER, G. (1976):

Physiological response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to handling and crowding stress in intensive fish culture.  
J. Fish Res. Board Can. **33**, 2699 - 2702.

WEDEMEYER, G.A., R.W. GOULD und W.T. YASUTAKE (1983):

Some potentials and limits of the leucrit test as a fish health assessment method.  
J. Fish Biol. **23**, 711 - 716.

WEDEMEYER, C.A. und W.T.YASUTAKE (1978):

Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*).  
J. Fish. Res. Board Can. **35**, 822 - 827.

WEEKS, B.A. und E. WARINNER (1984):

Effects of toxic chemicals on macrophage phagocytosis in two estuarine fishes.  
Mar. Environ. Res. **14**, 327 - 335

WEEKS, B.A. und E. WARINNER (1986):

Functional evaluation of macrophages in fish from a polluted estuary.  
Vet. Immunol. Immunopathol. **12**, 313 - 320.

WEEKS, B.A., E. WARINNER, P.L. MASON und D.S. McGINNIS (1986):

Influence of toxic chemicals on the chemitactic response of fish macrophages.  
J. Fish Biol. **28**, 653 - 658.

WEINREB, E.L. (1958):

Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. I. Haematology under normal and experimental conditions of inflammation.

Zoologica **43**, 145 - 154.

WELLS; R.M.G. und P.S. DAVIE (1985):

Oxygen binding by the blood and haematological effects of capture stress in two big gamefish: mako shark and striped marlin.

Comp. Biochem. Physiol. **81** A, 643 - 646.

WELLS, R.M.G., R.H. McINTYRE, A.K. MORGAN und P.S. DAVIE (1986):

Physiological stress response in big gamefish after capture: observations on plasma chemistry and blood factors.

Comp. Biochem. Physiol. **84** A, 565 - 571.

WELLS, R.M.G., V. TETENS und A.L. DEVRIES (1984):

Recovery from stress following capture and anaesthesia of antarctic fish: haematology and blood chemistry.

J. Fish Biol. **25**, 567 - 576.

WESTER, P.W., A.D. VETHAAK und W.B. MUISWINKEL (1994):

Fish as biomarkers in immunotoxicology.

Toxicology **86**, 213 - 232.

WIJK, R., K. ANDERSEN, I. UGLENES und E. EGIDIUS (1989):

Cortisol-induced increase in susceptibility of atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with effects on the blood cell pattern.

Aquaculture **83**, 201 - 215.

WILLIAMS, R.W. und M.C. WARNER (1976):

Some observations on the stained blood cellular elements of channel cat fish, *Ictalurus punctatus*.

J. Fish Biol. **9**, 491 - 497.

WLASOW, T. und H. DABROWSKA (1990):

Hematology of carp in acute intoxication with ammonia.

Polski Arch. Hydrobiol. **37**, 419 - 428.

- WLASOW, T., H. DABROWSKA und E. ZIOMEK (1990):  
Hematology of carp in prolonged sublethal ammonia intoxication.  
Polski Arch. Hydrobiol. **37**, 429 - 438.
- WOOD, C.M., J.D. TURNER and M.S. GRAHAM (1983):  
Why do fish die after severe exercise ?.  
J. Fish Biol. **22**, 189 - 201.
- WOO, P.T.K., J.F. LEATHERLAND und M.S. LEE (1987):  
Cryptobia salmositica: cortisol increases the susceptibility of Salmo gairneri Richardson to experimental cryptobiosis.  
J. Fish Dis. **10**, 75 - 83.
- YOUNG, G., B.Th. BJÖRNSSON, P. PRUNET, R.J. LIN und H.A. BERN (1989):  
Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (Oncorhynchus kisutch): plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones, and cortisol.  
Gen. Comp. Endocrinol. **74**, 335 - 345.
- ZAPATA, A.G., A. VARAS und M. TORROBA (1992):  
Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates.  
Immunol. Today **13**, 142 - 147.
- ZEEMAN, M.G. und W.A. BRINDLEY (1981):  
Effects of toxic agents upon fish immune systems: a review. In: R.P. SHARMA (Hrsg.): Immunologic Considerations in Toxicology, Vol. 1.  
CRC Press, S. 1 - 60.
- ZIDAR, B., B. KAMPL, E. SREBOCAN und Z. KOZARIC (1994):  
Der Einfluß der Dauer der Methoxyethyl-Quecksilberazetatexposition auf die Lymphozyten im peripheren Blut des Karpfens (Cyprinus carpio L.).  
Dtsch. tierärztl. Wschr. **101**, 444 - 446.



## 8. Anhang

Tabelle A-1: Einzelwerte der absoluten und relativen Anzahl der Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten sowie Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten der im **Wasserdurchlaufsystem** gehaltenen Bachforellen.

	Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /μl]	Leukozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Thrombozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Lymphozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Monozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]
	1%	1%	1%	2%	2%	2%
1	1,60 96,14	4,45 2,67	1,98 1,19	4,32 95,08	0,151 3,40	0,068 1,52
2	2,03 96,55	4,81 2,29	2,45 1,17	4,46 92,82	0,313 6,51	0,032 0,67
3	1,76 95,84	4,94 2,69	2,69 1,47	4,69 94,90	0,178 3,61	0,074 1,49
4	1,24 94,84	5,88 4,49	1,13 0,86	5,70 96,99	0,154 2,62	0,023 0,39
5	1,93 97,33	3,35 1,69	1,95 0,98	3,04 90,81	0,292 8,72	0,016 0,47
6	1,15 96,47	2,01 1,69	2,20 1,85	1,78 88,44	0,209 10,39	0,024 0,42
7	1,47 96,07	4,56 2,98	1,46 0,95	4,07 89,14	0,429 9,41	0,066 1,17
8	1,06 92,54	7,09 6,19	1,45 1,27	6,52 92,01	0,531 7,49	0,035 0,50
9	1,03 93,88	4,63 4,22	2,08 1,90	4,42 95,51	0,182 3,93	0,026 0,56
10	1,44 96,28	3,52 2,35	2,05 1,37	3,15 89,47	0,342 9,72	0,029 0,81
11	1,58 96,98	3,03 1,88	1,83 1,14	2,65 87,58	0,342 11,29	0,034 1,13
12	1,38 95,80	3,45 2,4	2,60 1,81	3,05 88,50	0,370 10,72	0,027 0,78
13	1,37 94,84	5,30 3,67	2,15 1,49	4,62 87,24	0,657 12,40	0,019 0,36
14	0,83 90,84	7,12 7,80	1,25 1,37	6,62 92,94	0,440 6,18	0,019 0,88
15	1,19 95,66	3,45 2,78	1,65 1,33	3,15 91,19	0,268 7,76	0,036 1,05

Tabelle A-1: Einzelwerte der absoluten und relativen Anzahl der Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten sowie Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten der im **Wasserdurchlaufsystem** gehaltenen Bachforellen.

	Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /μl]	Leukozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Thrombozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Lymphozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Monozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]
	1%	1%	1%	2%	2%	2%
16	1,06 95,34	3,75 3,37	1,43 1,29	3,53 94,17	0,119 3,18	0,099 2,65
17	1,21 96,25	1,92 1,56	2,75 2,23	1,76 91,55	0,122 6,34	0,041 2,11
18	1,27 94,36	5,37 3,99	2,23 1,66	4,95 92,23	0,341 6,35	0,076 1,42
19	1,27 96,95	2,70 2,07	1,28 0,98	2,41 89,23	0,253 9,36	0,038 1,41
20	1,06 94,70	4,24 3,79	1,70 1,52	3,74 88,21	0,461 10,87	0,024 0,57
21	1,23 96,63	2,62 2,07	1,35 1,07	2,37 90,65	0,220 8,40	0,025 0,95
22	1,46 96,93	3,25 2,16	1,38 0,92	2,93 90,09	0,287 8,83	0,035 1,08
23	1,18 95,95	3,61 2,95	1,35 1,10	3,39 93,71	0,190 5,24	0,038 1,05
24	1,55 97,75	1,98 1,25	1,60 1,01	1,77 89,64	0,191 9,67	0,014 0,69
25	0,88 95,57	2,48 2,69	1,60 1,74	2,34 94,37	0,112 4,51	0,028 1,12
26	1,31 96,31	3,34 2,46	1,67 1,23	3,01 90,29	0,291 8,72	0,035 1,05
27	1,39 96,92	2,69 1,87	1,74 1,21	2,38 88,77	0,287 10,69	0,014 0,54
28	1,25 95,76	3,87 2,97	1,65 1,00	3,54 91,58	0,235 6,07	0,091 2,35
29	1,30 95,88	4,01 2,95	1,59 1,17	3,62 90,18	0,360 8,98	0,034 0,84
30	1,30 95,84	3,93 2,90	1,70 1,26	3,60 91,55	0,308 7,84	0,024 0,61

1 bezogen auf Gesamtzellzahl (Summe aus Erythrozyten, Leukozytem und Thrombozyten)

2 bezogen auf Leukozyten

Tabelle A-2: Einzelwerte der absoluten und relativen Granulozytenanzahl der im **Wasserdurchlaufsystem** gehaltenen Bachforellen.

	Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	stabkernige [x10 <sup>4</sup> /μl]	segmentkernige [x10 <sup>4</sup> /μl]	Metagranulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Granuloblasten [x10 <sup>4</sup> /μl]	<sup>3</sup> EGZ [x10 <sup>4</sup> /μl]
	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %
1	0,151 3,40	0,056 1,27	0,095 2,13	- -	- -	- -
2	0,313 6,51	0,104 2,17	0,209 4,34	- -	- -	- -
3	0,178 3,61	0,030 0,61	0,178 3,00	- -	- -	- -
4	0,154 2,62	- -	0,154 2,62	- -	- -	- -
5	0,292 8,72	0,087 2,41	0,211 6,31	- -	- -	- -
6	0,209 10,39	0,042 0,080	0,167 8,31	- -	- -	- -
7	0,429 9,41	0,019 2,16	0,331 7,25	- -	- -	- -
8	0,531 7,49	0,118 1,67	0,271 3,82	0,012 0,17	0,059 0,83	0,071 1,00
9	0,182 3,93	- -	0,147 3,17	0,008 0,17	0,027 0,59	- -
10	0,342 9,72	0,106 1,22	0,634 7,29	- -	0,071 0,81	0,035 0,40
11	0,342 11,29	0,068 2,26	0,198 0,52	0,039 0,13	0,015 0,50	0,057 1,88
12	0,370 10,72	0,079 2,29	0,230 6,64	0,014 0,41	0,035 0,39	0,034 0,98
13	0,657 12,40	0,232 4,38	0,271 5,11	0,058 1,09	0,019 0,36	0,077 1,46
14	0,440 6,18	0,094 1,32	0,221 3,10	0,031 0,44	0,031 0,44	0,063 0,88
15	0,268 7,76	0,059 1,71	0,179 5,17	0,017 0,50	- -	0,013 0,38

Tabelle A-2: Einzelwerte der absoluten und relativen Granulozytenanzahl der im **Wasserdurchlaufsystem** gehaltenen Bachforellen.

	Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	stabkernige [x10 <sup>4</sup> /μl]	segmentkernige [x10 <sup>4</sup> /μl]	Metagranulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Granuloblasten [x10 <sup>4</sup> /μl]	<sup>3</sup> EGZ [x10 <sup>4</sup> /μl]
	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %
16	0,119 3,18	0,020 0,53	0,058 1,56	0,012 0,31	0,009 0,25	0,020 0,53
17	0,122 6,34	- -	0,100 5,18	- -	- -	0,022 1,16
18	0,341 6,35	0,038 0,70	2,66 4,95	- -	- -	0,038 0,70
19	0,253 9,36	0,072 2,65	0,151 5,57	- -	0,010 0,38	0,021 0,76
20	0,461 10,87	0,109 2,55	0,273 6,44	- -	- -	0,080 1,88
21	0,220 8,40	0,050 1,92	0,128 4,88	0,084 0,32	0,008 0,32	0,025 0,96
22	0,287 8,83	0,095 2,91	0,192 5,92	- -	- -	- -
23	0,190 5,24	0,206 0,57	0,169 4,67	- -	- -	- -
24	0,191 9,67	0,020 1,03	0,129 6,54	0,014 0,69	0,007 0,34	0,021 1,07
25	0,112 4,51	0,028 1,12	0,084 3,39	- -	- -	- -
26	0,291 8,72	0,082 2,47	0,209 6,25	- -	- -	- -
27	0,287 10,69	0,029 1,07	0,215 8,01	0,015 0,54	- -	0,029 1,07
28	0,235 6,07	0,048 1,25	0,158 4,07	0,009 0,24	- -	0,020 0,51
29	0,360 8,98	0,097 2,43	0,206 5,14	0,008 0,19	0,012 0,31	0,037 0,91
30	0,308 7,84	0,114 2,89	0,178 4,42	0,021 0,53	- -	- -

2 bezogen auf Leukozyten

3 eosinophile granuläre Zellen

Tabelle A-3: Hämoglobin-Konzentrationen, Hämatokritwerte sowie hämatologische Kennwerte der Bachforellen in der **Durchlaufhaltung**.

	Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /μl] %	Hämoglobin [g/100 ml]	Hämatokrit [%]	MCH [pg]	MCHC [g/100 ml]	MCV [fl]
1	1,60 96,14	8,75	38	54,39	23,03	237,5
2	2,03 96,55	10,48	37	51,63	28,32	182,3
3	1,76 95,84	11,50	40	65,34	28,75	227,3
4	1,24 94,84	9,62	38	44,95	25,32	177,6
5	1,93 97,33	8,96	44	46,42	20,36	228,0
6	1,15 96,47	8,79	37	76,44	23,73	322,09
7	1,47 96,07	8,90	47	60,54	19,10	317,0
8	1,06 92,54	10,01	41	94,43	24,66	383,0
9	1,03 93,88	8,88	32	86,21	27,54	313,0
10	1,44 96,28	8,88	38	61,67	23,37	264
11	1,58 96,98	8,54	37	54,74	23,08	237,2
12	1,38 95,80	7,55	40	54,71	18,86	289,9
13	1,37 94,84	7,94	35	57,96	22,69	255,5
14	0,83 90,84	6,12	26	73,74	23,54	313,3
15	1,19 95,66	7,26	36	61,01	20,17	302,5
16	1,06 95,34	10,01	34	94,44	29,44	320,8

Tabelle A-3: Hämoglobin-Konzentrationen, Hämatokritwerte sowie hämatologische Kennwerte der Bachforellen in der **Durchlaufhaltung**.

	Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /μl] %	Hämoglobin [g/100 ml]	Hämatokrit [%]	MCH [pg]	MCHC [g/100 ml]	MCV [fl]
17	1,21 96,25	7,70	38	63,64	20,26	314,1
18	1,27 94,36	10,00	40	76,74	25,00	315,0
19	1,27 96,95	12,63	46	99,45	27,26	364,8
20	1,06 94,70	9,89	42	93,30	29,45	397,8
21	1,23 96,63	9,78	40	79,51	24,67	322,4
22	1,46 96,93	9,00	40	61,64	22,64	272,3
23	1,18 95,95	9,27	40	78,56	20,93	375,4
24	1,55 97,75	10,43	39	67,29	26,97	249,5
25	0,88 95,57	7,95	32	90,34	25,05	360,0
26	1,31 96,31	9,35	40	71,37	23,38	305,3
27	1,39 96,92	8,58	38	61,73	22,58	273,4
28	1,25 95,76	8,77	39	70,16	22,49	312,0
29	1,30 95,88	9,65	38	74,15	25,37	292,3
30	1,30 95,84	7,68	39	60,62	20,21	300,0

Tabelle A-4: Einzelwerte der absoluten und relativen Anzahl der Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten sowie Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten der im **Wasserkreislaufsystem** gehaltenen Bachforellen.

	Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /μl]	Leukozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Thrombozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Lymphozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Monozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]
	<sup>1</sup> %	<sup>1</sup> %	<sup>1</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %
1	0,96 93,6	5,08 4,95	1,48 1,45	4,43 87,27	0,554 10,91	0,093 1,52
2	1,16 95,42	3,68 2,98	1,98 1,60	2,97 80,71	0,643 17,46	0,065 1,77
3	1,17 94,91	4,49 3,64	1,78 1,44	3,71 82,61	0,780 17,39	- -
4	1,20 93,80	5,83 4,56	2,18 1,64	3,76 64,40	1,780 30,51	0,030 5,09
5	1,44 94,28	6,73 4,41	2,08 1,31	5,35 79,51	1,297 19,27	0,082 1,22
6	1,26 95,76	3,28 2,49	2,30 1,75	2,89 88,13	0,389 11,86	- -
7	0,98 93,28	5,03 4,78	2,03 1,93	3,94 78,30	1,01 20,15	0,078 1,55
8	1,15 93,42	5,45 4,43	2,65 2,15	4,03 73,85	1,32 24,18	0,107 1,96
9	1,52 93,91	4,40 2,72	2,78 1,72	3,96 90,00	0,377 8,57	0,063 1,43
10	1,00 94,60	4,33 4,12	1,35 1,28	3,75 86,57	0,545 12,58	0,047 1,09
11	1,12 93,68	5,23 4,37	2,33 1,95	4,41 84,36	0,786 15,03	0,032 0,61
12	0,77 92,77	3,93 4,77	2,03 2,46	3,34 85,09	0,518 13,16	0,069 1,75
13	1,47 95,68	3,88 2,53	2,75 1,79	3,22 83,00	0,631 16,27	0,028 0,73
14	1,46 97,06	2,10 1,40	2,33 1,55	1,70 81,00	0,366 17,43	0,033 1,59
15	1,15 95,83	2,34 2,34	2,20 1,83	1,76 75,37	0,576 24,63	- -

Tabelle A-4: Einzelwerte der absoluten und relativen Anzahl der Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten sowie Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten der im **Wasserkreislaufsystem** gehaltenen Bachforellen.

	Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /μl]	Leukozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Thrombozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Lymphozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Monozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]
	<sup>1</sup> %	<sup>1</sup> %	<sup>1</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %
16	1,20 95,29	2,58 2,58	2,68 2,13	1,83 70,88	0,660 25,57	0,092 3,55
17	1,92 96,08	2,32 2,32	3,20 1,60	1,66 71,58	0,646 27,87	0,013 0,55
18	1,33 95,21	4,45 3,18	2,25 1,61	3,57 80,25	0,835 18,76	0,044 0,99
19	1,25 94,47	5,28 3,99	2,04 1,54	3,80 71,98	1,381 26,15	0,099 1,87
20	1,15 93,88	4,95 4,04	2,55 2,08	3,74 75,55	1,325 26,76	0,034 0,69
21	1,18 94,51	4,64 3,72	2,21 1,77	3,83 82,57	0,722 15,56	0,087 1,87
22	1,22 94,81	4,40 3,42	2,28 1,77	3,41 77,41	0,875 19,88	0,119 2,71
23	1,45 95,38	4,43 2,91	2,59 1,70	3,62 81,78	0,770 17,38	0,037 0,84
24	1,55 95,13	5,74 3,52	2,20 1,35	4,58 79,7	1,048 18,25	0,118 2,05
25	1,23 94,07	5,64 4,31	2,12 1,62	4,62 81,87	0,950 16,85	0,072 1,28
26	1,19 94,56	4,77 3,79	2,08 1,65	3,83 80,22	0,893 18,71	0,051 1,07
27	1,25 95,33	3,89 2,97	2,24 1,71	2,89 74,33	0,938 24,11	0,061 1,56
28	1,34 96,29	2,99 2,15	2,17 1,56	2,59 86,76	0,339 11,35	0,057 1,89

1 bezogen auf Gesamtzellzahl (Summe aus Erythrozyten, Leukozytem und Thrombozyten)

2 bezogen auf Leukozyten

Tabelle A-5: Einzelwerte der absoluten und relativen Granulozytenanzahl der im Wasserkreislaufsystem gehaltenen Bachforellen.

	Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	stabkernige [x10 <sup>4</sup> /μl]	segmentkernige [x10 <sup>4</sup> /μl]	Metagranulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Granuloblasten [x10 <sup>4</sup> /μl]
	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %	<sup>2</sup> %
1	0,554 10,91	0,114 2,25	0,254 5,00	0,108 2,12	0,078 1,54
2	0,643 17,46	0,147 4,00	0,425 11,54	- -	0,071 1,92
3	0,780 17,39	0,160 3,56	0,474 10,57	0,146 3,26	- -
4	1,780 30,51	0,553 9,47	1,030 17,65	0,113 1,93	0,085 1,46
5	1,297 19,27	0,391 5,81	0,583 8,66	0,243 3,61	0,081 1,20
6	0,389 11,86	0,083 2,54	0,194 5,93	0,070 2,13	0,041 1,26
7	1,01 20,15	0,225 4,49	0,552 11,01	0,155 3,10	0,077 1,56
8	1,32 24,18	0,265 4,85	0,913 16,72	0,072 1,31	0,071 1,30
9	0,377 8,57	0,050 1,15	0,103 2,35	0,097 2,21	0,126 2,86
10	0,545 12,58	0,118 2,72	0,310 7,15	0,047 1,09	0,070 1,62
11	0,786 15,03	0,162 3,10	0,399 7,63	0,064 1,23	0,160 3,06
12	0,518 13,16	0,832 2,11	0,262 6,66	0,035 0,88	0,138 3,51
13	0,631 16,27	0,154 3,98	0,389 10,02	0,039 1,00	0,049 1,27
14	0,366 17,43	0,081 3,64	0,171 8,16	0,068 3,00	0,054 2,41
15	0,576 24,63	0,105 4,48	0,437 18,56	0,018 0,75	0,017 0,74

Tabelle A-5: Einzelwerte der absoluten und relativn Granulozytenanzahl der im **Wasserkreislaufsystem** gehaltenen Bachforellen.

	Granulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	stabkernige [x10 <sup>4</sup> /μl]	segmentkernige [x10 <sup>4</sup> /μl]	Metagranulozyten [x10 <sup>4</sup> /μl]	Granuloblasten [x10 <sup>4</sup> /μl]
	2%	2%	2%	2%	2%
16	0,660 25,57	0,284 10,99	0,311 12,03	0,014 0,55	0,052 2,00
17	0,646 27,87	0,177 7,65	0,418 18,03	0,038 1,64	0,013 0,55
18	0,835 18,76	0,216 4,85	0,560 12,58	0,032 0,72	0,027 0,61
19	1,381 26,15	0,361 6,84	0,804 15,24	0,098 1,86	0,117 2,21
20	1,325 26,76	0,389 7,86	0,732 14,79	0,100 2,01	- -
21	0,722 15,56	0,149 3,22	0,458 9,87	0,047 1,02	0,037 1,45
22	0,875 19,88	0,260 5,91	0,464 10,54	0,044 0,99	0,107 2,44
23	0,770 17,38	0,154 3,48	0,526 11,87	0,046 1,03	0,044 1,00
24	1,048 18,25	0,280 4,87	0,745 12,98	0,023 0,40	- -
25	0,950 16,85	0,367 6,51	0,495 8,77	0,089 1,57	- -
26	0,893 18,71	0,180 3,76	0,646 13,54	0,035 0,73	0,033 0,68
27	0,938 24,11	0,307 7,89	0,431 11,09	0,121 3,11	0,079 2,02
28	0,339 11,35	0,105 3,52	0,234 7,83	- -	- -

2 bezogen auf Leukozyten

Tabelle A-6: Hämoglobin-Konzentrationen, Hämatokritwerte sowie hämatologische Kennwerte der Bachforellen in der **Kreislaufhaltung**.

	Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /μl] %	Hämoglobin [g/100 ml]	Hämatokrit [%]	MCH [pg]	MCHC [g/100 ml]	MCV [fl]
1	0,96 93,6	9,18	51	95,63	17,90	534,2
2	1,16 95,42	8,81	50	74,66	17,73	421,1
3	1,17 94,91	11,11	47	94,96	23,31	399,0
4	1,20 93,80	10,91	57	90,92	19,18	474,0
5	1,44 94,28	9,67	54	67,15	18,04	372,0
6	1,26 95,76	9,07	49	71,98	18,63	386,4
7	0,98 93,28	8,46	61	86,33	13,99	617,0
8	1,15 93,42	8,64	61	75,13	14,19	529,3
9	1,52 93,91	12,44	55	81,84	22,59	362,4
10	1,00 94,60	9,18	40	92,26	23,11	399,3
11	1,12 93,68	9,05	42	80,80	21,54	375,2
12	0,77 92,77	7,87	37	102,90	21,35	482,0
13	1,47 95,68	8,24	57	56,05	14,42	388,7
14	1,46 97,06	8,57	57	58,70	15,00	391,4
15	1,15 95,83	10,01	43	87,04	23,05	378,0
16	1,20 95,29	13,07	54	108,9	24,20	450,0

Tabelle A-6: Hämoglobin-Konzentrationen, Hämatokritwerte sowie hämatologische Kennwerte der Bachforellen in der **Kreislaufhaltung**.

	Erythrozyten [x10 <sup>6</sup> /μl] %	Hämoglobin [g/100 ml]	Hämatokrit [%]	MCH [pg]	MCHC [g/100 ml]	MCV [fl]
17	1,92 96,08	16,24	54	84,58	30,07	281,3
18	1,33 95,21	8,98	56	67,42	16,07	419,6
19	1,25 94,47	10,58	40	84,64	26,27	322,2
20	1,15 93,88	13,02	60	113,22	21,76	520,4
21	1,18 94,51	10,87	45	92,12	24,04	383,1
22	1,22 94,81	11,57	51	94,84	22,59	419,8
23	1,45 95,38	9,45	64	65,17	14,80	440,3
24	1,55 95,13	8,87	50	57,23	17,77	322,0
25	1,23 94,07	11,87	51	96,50	23,44	411,7
26	1,19 94,56	12,00	50	100,84	24,03	419,1
27	1,25 95,33	11,08	55	88,64	20,02	442,8
28	1,34 96,29	10,56	42	78,73	25,04	314,4

Tabelle A-7: pH-Werte, Serumosmolalität und Plasmaprotein-Konzentrationen der im Kreislauf- und Durchlaufsystem gehaltenen Bachforellen.

	Durchlaufhaltung			Kreislaufhaltung		
	pH	Osmolalität [mosm/kg]	Plasmaprotein- Konzentration [g/100 ml]	pH	Osmolalität [mosm/kg]	Plasmaprotein- Konzentration [g/100 ml]
1	7,40	320	3,87	7,05	325	4,83
2	7,34	310	5,68	7,18	320	5,53
3	7,38	325	3,82	7,23	320	5,02
4	7,46	325	4,39	7,04	320	5,79
5	7,47	330	4,85	7,04	300	4,55
6	7,38	325	5,66	7,22	330	4,48
7	7,42	330	3,52	7,16	315	5,37
8	7,28	330	4,53	7,15	335	4,97
9	7,30	330	5,01	7,24	320	4,44
10	7,39	325	4,33	7,13	320	5,36
11	7,39	325	4,94	7,18	320	4,26
12	7,33	320	3,92	7,04	325	5,53
13	7,38	326	4,02	7,22	315	4,97
14	7,34	300	4,94	7,15	320	5,02
15	7,36	326	4,94	7,16	304	5,47
16	7,39	328	3,65	7,28	328	3,54
17	7,41	330	5,29	7,05	318	4,87
18	7,38	330	3,30	7,11	330	4,31
19	7,38	330	3,12	7,2	330	3,92
20	7,40	335	4,23	7,22	328	3,67
21	7,35	330	4,09	7,15	329	4,19
22	7,35	325	3,66	7,15	305	3,48
23	7,38	326	5,28	7,04	324	4,40
24	7,43	325	5,06	7,13	330	5,42
25	7,36	326	4,49	7,24	325	4,31
26	7,40	322	3,33	7,28	321	5,85
27	7,41	324	5,22	7,02	326	4,00
28	7,37	325	4,58	7,15	325	4,72
29	7,38	329	5,09			
30	7,39	325	5,55			

Tabelle A-8: Osmotische Resistenz der Erythrozyten von Bachforellen.

mmol/l	Konzentration		Hämolyse	
	% NaCl	Extinktion 546 nm	optische Beurteilung	
171	1,00	0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
162	0,95	0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
154	0,90	0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
145	0,85	0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
137	0,80	0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
128	0,75	0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
120	0,70	0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	
		0,000	-	

Tabelle A-8 (Fortsetzung): Osmotische Resistenz der Erythrozyten von Bachforellen.

mmol/l	Konzentration		Hämolyse	
		% NaCl	Extinktion 546 nm	optische Beurteilung
111		0,65	0,000	-
			0,000	-
			0,000	-
			0,000	-
			0,000	-
			0,000	-
			0,000	-
			0,000	-
103		0,60	0,000	-
			0,000	-
			0,005	-
			0,005	-
			0,006	-
			0,005	-
			0,000	-
			0,000	-
94		0,55	0,000	-
			0,000	-
			0,008	-
			0,006	-
			0,006	-
			0,000	-
			0,000	-
			0,005	-
86		0,50	0,000	-
			0,000	-
			0,218	+++
			0,060	+
			0,265	+++
			0,216	+
			0,006	-
			0,000	-
78		0,45	0,000	-
			0,000	-
			0,256	+++
			0,230	+++
			0,320	+++
			0,330	+++
			0,118	+
			0,004	-
68		0,40	0,000	-
			0,000	-
			0,610	+++
			0,435	++
			0,460	++
			0,450	+++
			0,406	+++
			0,254	++

Tabelle A-8 (Fortsetzung): Osmotische Resistenz der Erythrozyten von Bachforellen.

	Konzentration	Hämolyse	
mmol/l	% NaCl	Extinktion 546 nm	optische Beurteilung
60	0,35	0,000	-
		0,000	-
		0,680	+++
		0,530	+++
		0,520	+++
		0,630	+++
		0,620	+++
		0,480	+++
51	0,30	0,070	+
		0,086	+
		0,680	+++
		0,560	+++
		0,550	+++
		0,630	+++
		0,620	+++
		0,700	+++
43	0,25	0,110	++
		0,450	+++
		0,675	+++
		0,710	+++
		0,640	+++
		0,630	+++
		0,620	+++
		0,700	+++
34	0,20	0,520	+++
		0,520	+++
		0,680	+++
		0,710	+++
		0,640	+++
		0,630	+++
		0,620	+++
		0,700	+++
26	0,15	0,520	+++
		0,520	+++
		0,675	+++
		0,700	+++
		0,640	+++
		0,630	+++
		0,620	+++
		0,700	+++

Tabelle A-8 (Fortsetzung): Osmotische Resistenz der Erythrozyten von Bachforellen.

	Konzentration	Hämolyse	
mmol/l	% NaCl	Extinktion 546 nm	optische Beurteilung
17	0,10	0,520 0,520 0,680 0,710 0,640 0,630 0,620 0,700	+++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++
8,6	0,05	0,520 0,520 0,678 0,710 0,640 0,630 0,620 0,700	+++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++
0	0,00	0,520 0,520 0,680 0,710 0,640 0,630 0,620 0,698	+++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++

Tabelle A-9: Mittelwerte der Erythrozytenanzahl (1. Wert) sowie die prozentuale Verteilung (2. Wert) bei

Verwendung von drei unterschiedlichen Verdünnungslösungen.

Fisch-Nr.	Natt-Herrick	Dacies (Original)	Dacies (modifiziert)
	[x10 <sup>6</sup> /μl] %	[x10 <sup>6</sup> /μl] %	[x10 <sup>6</sup> /μl] %
1	1,245 32,72	1,295 34,03	1,265 33,25
2	1,080 36,99	0,890 30,48	0,950 32,53
3	1,330 31,15	1,540 26,07	1,400 32,79
4	0,855 26,76	1,120 35,05	1,220 38,18
5	1,345 34,80	1,335 34,54	1,185 30,66
6	1,195 35,15	1,030 30,29	1,175 34,56
7	1,550 38,11	1,142 28,08	1,375 33,81
8	0,942 31,32	1,108 36,84	0,958 31,85
9	1,075 32,82	1,067 32,58	1,133 34,60
10	1,250 33,42	1,375 36,76	1,115 29,81
11	1,355 35,52	1,095 28,70	1,365 35,78
12	1,075 29,97	1,175 32,76	1,337 37,27
13	1,055	0,975	1,145
14	1,225 34,01	1,145 31,79	1,232 34,20
15	1,465 35,09	1,335 31,98	1,375 32,93

Tabelle A-9: Mittelwerte der Leukozytenanzahl (1. Wert) sowie die prozentuale Verteilung (2. Wert) bei Verwendung von drei unterschiedlichen Verdünnungslösungen.

Fisch-Nr.	Natt-Herrick	Dacies (Original)	Dacies (modifiziert)
	[x10 <sup>4</sup> /μl] %	[x10 <sup>4</sup> /μl] %	[x10 <sup>4</sup> /μl] %
1	2,220 31,40	2,175 30,76	2,675 37,84
2	2,225 32,72	2,325 34,19	2,250 33,09
3	2,250 31,47	2,400 33,57	2,500 34,97
4	3,250 38,63	2,625 31,20	2,500 29,72
5	1,875 43,35	1,375 31,79	1,075 24,86
6	2,550 33,33	2,125 27,78	2,975 38,89
7	4,450 34,63	4,700 36,58	3,700 28,79
8	2,500 32,26	3,250 41,94	2,000 25,81
9	2,550 35,17	2,350 32,41	2,350 32,41
10	2,665 35,80	2,325 31,33	2,455 32,98
11	1,895 32,99	1,995 34,73	1,855 32,29
12	2,330 34,49	2,225 32,94	2,200 32,57
13	3,015 35,20	2,895 33,80	2,655 31,00
14	1,750 32,71	1,550 28,97	2,050 38,32
15	2,325 32,65	2,550 35,91	2,245 31,53

Tabelle A-9: Mittelwerte der Thrombozytenanzahl (1. Wert) sowie die prozentuale Verteilung (2. Wert) bei Verwendung von drei unterschiedlichen Verdünnungslösungen.

Fisch-Nr.	Natt-Herrick	Dacies (Original)	Dacies (modifiziert)
	[x10 <sup>4</sup> /μl] %	[x10 <sup>4</sup> /μl] %	[x10 <sup>4</sup> /μl] %
1	1,285 33,51	1,275 33,25	1,275 33,25
2	2,075 32,30	2,225 34,63	2,125 33,07
3	2,725 34,38	2,650 33,44	2,550 32,18
4	1,850 35,41	1,875 35,89	1,500 28,71
5	2,025 29,89	2,050 30,26	2,700 39,85
6	1,575 28,64	2,350 42,73	1,575 28,64
7	2,250 33,83	2,300 34,59	2,100 31,58
8	1,550 33,33	1,500 32,26	1,600 34,41
9	1,550 36,47	1,400 32,94	1,300 30,59
10	2,045 33,39	2,125 34,39	1,955 31,92
11	1,825 37,09	1,545 31,40	1,550 31,50
12	1,855 34,45	1,785 33,15	1,745 32,40
13	2,055 31,33	2,145 32,70	2,365 36,05
14	1,880 32,25	1,925 33,02	2,025 34,73
15	1,300 31,78	1,475 36,06	1,315 32,15

Tabelle A-10: Veränderung der Hämatokritwerte in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulans und Mikrohämatokrit-Kapillaren. Angegeben sind die Absolutwerte sowie die prozentuale Variation gegenüber des ohne ein Antikoagulans ermittelten Hämatokritwertes (letzte Spalte). Eingesetzt wurde genau 1 ml Vollblut.

Nr.	EDTA nicht heparinisierte Kapillaren	Variation [%]	Li-Heparin, nicht heparinisierte Kapillaren	Variation [%]	ohne Koagulans, heparinisierte Kapillaren	Variation [%]	ohne Koagulans, nicht heparinisierte Kapillaren
1	37	14,94	39	10,34	40	8,05	43,5
2	35	12,50	36,5	8,75	38,5	12,50	40
3	36	18,18	38	13,64	40	9,09	44
4	30	8,54	31,8	3,05	35	-6,71	32,8
5	40	11,11	42	6,67	43	4,44	45
6	35	15,66	37	10,84	39,5	4,82	41,5
7	36,5	13,10	38	9,52	40	4,76	42
8	33,5	11,84	36	5,26	39	-2,63	38
9	37	7,50	39	2,50	38,5	3,75	40
10	35	22,22	40	11,11	41	8,89	45

Tabelle A-11: Veränderung der Osmolalität in Abhängigkeit vom verwendeten Antikoagulans. Angegeben sind die Absolutwerte und die prozentuale Variation gegenüber der Serumosmolalität (Spalte 1). Eingesetzt wurde genau 1 ml Vollblut.

Fisch-Nr.	Serumosmolalität [mosm/kg]	Plasmaosmolalität (41 USP-u Heparin/ml Blut) [mosm/kg]	Variation [%]	Plasmaosmolalität (1,96 mg EDTA/ml Blut) [mosm/kg]	Variation [%]
1	325	318	2,15	362	10,22
2	324	330	1,82	373	13,14
3	327	320	2,14	367	10,90
4	326	324	0,61	359	9,19
5	323	322	0,31	360	10,28
6	336	325	3,27	376	10,64
7	327	324	0,92	371	11,86
8	326	320	1,84	367	11,17
9	333	315	5,41	377	11,67
10	334	325	2,69	375	10,93
11	327	326	0,31	359	8,91
12	331	323	2,42	378	12,43
13	326	325	0,31	376	13,30
14	327	322	1,53	365	10,41
15	324	324	0	359	9,75

Tabelle A-12: Veränderungen der Blut-pH-Werte, Hämoglobinkonzentrationen, Osmolalität und Hämatokritwerte in Abhängigkeit vom eingesetzten Heparinvolumen.

Fisch-Nr.	Heparinvolumen [µl]	pH	Hämatokrit [%]	Hämoglobin [g/100 ml Blut]	Osmolalität [mosm/kg]
1	0	7,51	48	11,07	317
	5	7,46	47	11,02	318
	10	7,40	45	11,07	320
	20	7,41	45	10,75	318
	30	7,40	44	10,57	317
	40	7,40	43	10,75	317
	50	7,39	43	10,30	317
	60	7,39	42	9,36	317
	70	7,39	42	9,27	319
	80	7,38	41	9,85	317
	90	7,39	41	9,36	319
	100	7,39	39	9,81	320
2	0	7,50	55	12,55	323
	5	7,48	53	12,10	323
	10	7,45	51	12,28	322
	20	7,43	50,5	11,38	321
	30	7,42	50,5	11,84	322
	40	7,42	50	11,88	320
	50	7,41	50	11,75	321
	60	7,41	49	11,61	323
	70	7,42	48,5	10,17	322
	80	7,41	47	10,79	321
	90	7,41	46,5	10,11	321
	100	7,41	46,5	10,56	322
3	0	7,21	53	9,40	325
	5	7,19	52	9,22	325
	10	7,16	50	9,31	326
	20	7,14	49	9,45	325
	30	7,09	49	8,73	322
	40	7,09	48	8,71	324
	50	7,09	47	8,74	325
	60	7,08	46	8,07	327
	70	7,09	45	8,00	324
	80	7,08	44	7,75	325
	90	7,08	44	7,77	325
	100	7,08	43	7,43	321
4	0	7,25	50	10,26	320
	5	7,23	48	10,06	320
	10	7,20	46	10,12	321
	20	7,16	45	10,00	320
	30	7,16	45	9,78	319
	40	7,15	45	10,01	322
	50	7,15	44	9,88	321
	60	7,14	43	9,41	320
	70	7,14	43	9,22	317
	80	7,14	42	8,95	320
	90	7,15	41	8,91	318
	100	7,14	41	8,76	320

Tabelle A-12: Veränderungen der Blut-pH-Werte, Hämoglobinkonzentrationen, Osmolalität und Hämatokritwerte in Abhängigkeit vom eingesetzten Heparinvolumen.

Fisch-Nr.	Heparinvolumen [µl]	pH	Hämatokrit [%]	Hämoglobin [g/100 ml Blut]	Osmolalität [mosm/kg]
5	0	7,45	41	8,82	320
	5	7,40	39	8,45	320
	10	7,41	38	8,10	321
	20	7,37	38	8,27	320
	30	7,38	37	8,34	319
	40	7,37	36	8,51	318
	50	7,36	36	8,12	320
	60	7,35	35	7,16	321
	70	7,35	33	7,24	320
	80	7,34	33	7,31	318
	90	7,34	32	7,09	317
	100	7,33	30	7,26	322
	6	0	7,50	49	9,85
5		7,48	45	9,40	330
10		7,44	44	9,22	329
20		7,43	44	9,18	330
30		7,42	43	9,15	330
40		7,42	43	9,12	328
50		7,41	43	9,05	327
60		7,42	42	8,96	330
70		7,41	42	8,61	328
80		7,40	41	8,35	329
90		7,40	40	8,10	328
100		7,40	40	8,19	326

## BERECHNUNG DER AMMONIAK-KONZENTRATIONEN

Der prozentuale Anteil des Ammoniaks in einer ammoniumhaltigen Lösung lässt sich nach EMERSON et al (1975) und HART und O'SULLIVAN (1993) nach folgender Gleichung berechnen:

$$\% \text{NH}_3 = \frac{100}{1 + 10(\text{pKa} - \text{pH})} \quad (1)$$

pKa = negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante

EMERSON et al (1975) geben bei Temperaturen von 5 bis 20 °C folgende pKa-Werte an (Tabelle 1):

Tabelle 1: pKa-Werte für Ammoniak in Abhängigkeit von der Temperatur (nach EMERSON et al. 1975).

Temperatur [°C]	pKa-Werte
5	9,9030
6	9,8678
7	9,8329
8	9,7983
9	9,7639
10	9,7297
11	9,6958
12	9,6621
13	9,6287
14	9,5955
15	9,5625
16	9,5297
17	9,4972
18	9,4649
19	9,4328

Tabelle 1 (Fortsetzung): pKa-Werte für Ammoniak in Abhängigkeit von der Temperatur (nach EMERSON et al. 1975).

Temperatur [°C]	pKa-Werte
20	9,4010
21	9,3693
22	9,3379
23	9,3067
24	9,2757
25	9,2448
26	9,2143
27	9,1839
28	9,1537
29	9,1237
30	9,0939

Aus der in Tabelle 1 angegebenen pKa-Werte (abhängige Variable) und den Temperaturen wurde die lineare Regression berechnet nach:

$$\text{pKa} = - 0.03234 T \text{ [}^\circ\text{C]} + 10.0532 \quad (2)$$

MESSER et al. (1984) untersuchten den Einfluß der Alkalität auf den prozentualen Anteil des Ammoniaks gemessen an der Gesamtammoniak-Ammonium-Konzentration. Sie geben einen Korrekturfaktor  $s$  bei der Berechnung des prozentualen Ammoniakanteils an der Gesamtammonium-Ammoniakkonzentration an; die Gleichung (1) lautet nach MESSER et al. (1984):

$$\% \text{ NH}_3 = \frac{100}{1 + 10(\text{pKa} - \text{pH} - s)} \quad (3)$$

Tabelle 2 (aus MESSER et al. 1984) zeigt die Alkalität, angegeben in mg CaCO<sub>3</sub> pro Liter Wasser, die gemessene Gesamtammonium-Ammoniak-Konzentration, den berechneten NH<sub>3</sub>-N-Wert aus pH und Temperatur (THURSTON et al. 1979, zit. in MESSER et al. 1984), die nach MESSER et al. (1984) korrigierte NH<sub>3</sub>-N-Konzentration und das Verhältnis zwischen korrigierter und unkorrigierter Ammoniak-N-Konzentration.

Tabelle 2: Alkalität, gemessene Gesamtammonium-Ammoniak-N- Konzentration ( $T_{\text{amm}}$ ), berechneter unkorrigierter  $\text{NH}_3\text{-N}$ -Wert ( $N_{\text{unkorr}}$ ) nach THURSTON et al. (1979, zit. in MESSER et al. 1984), korrigierter Ammoniakwert ( $\text{NH}_3\text{-N}_{\text{korr}}$ ) und Verhältnis R zwischen korrigierten und unkorrigierten Ammoniakwert (MESSER et al. 1984).

Alkalität [mg $\text{CaCO}_3\text{/l}$ ]	$T_{\text{amm}}$	$\text{NH}_3\text{-N}_{\text{unkorr}}$ [mg/l]	$\text{NH}_3\text{-N}_{\text{korr}}$ [mg/l]	R	T [°C]	pH
180	0,05	0,002	0,002	1,000	21,0	8,0
240	1,20	0,023	0,019	0,826	19,5	7,7
150	0,70	0,003	0,003	1,000	12,5	7,3
270	3,40	0,041	0,035	0,854	7,50	7,9
260	1,60	0,016	0,014	0,875	17,0	7,5
260	2,00	0,022	0,019	0,864	12,5	7,7
230	1,20	0,015	0,013	0,867	17,0	7,6
170	0,43	0,011	0,010	0,909	14,0	8,0
230	1,40	0,028	0,024	0,857	14,0	7,9
240	2,70	0,029	0,025	0,862	9,00	7,8
220	1,10	0,024	0,021	0,875	6,50	8,20
230	1,20	0,020	0,017	0,850	8,50	8,0
180	0,05	0,002	0,002	1,000	20,0	8,0

Aus der Beziehung zwischen Alkalität und dem Verhältnis zwischen korrigiertem und unkorrigiertem Ammoniak-N-Wert (Faktor A) wurde die lineare Beziehung (mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.83223) berechnet:

$$A = - 0,00137 \times \text{Alkalität [mg/l CaCO}_3\text{]} + 1.196 \quad (4)$$

Die in deutsche Härtegrade gemessene Alkalität (Karbonathärte) wird durch Multiplikation mit 17.80 in mg/l Kalziumcarbonat umgerechnet (SCHWOERBEL 1993), durch Umformen der Gleichung erhält man

$$A = - 0.02439 \times \text{°dH} + 1.196 \quad (4a)$$

°dH = Wasserhärte (Karbonathärte) in Grad deutscher Härte

Für jede Temperatur wurde aus Formel (2) der pKa-Wert, und nach Formel (1) der prozentuale Anteil des Ammoniaks an der Gesamtammoniak-Ammoniumkonzentration berechnet. Aus diesem Prozentwert wurde die Ammoniakkonzentration nach Gleichung 6 (s.u.) ermittelt. Der Korrekturfaktor A wurde durch Einsetzen der Alkalität in Gleichung (4) errechnet und die berechnete Ammoniak-Konzentration dann durch Multiplikation mit diesem Faktor korrigiert.

$$\text{KH [°dH]} \times 0.36 \times 50 = \text{CaCO}_3 \text{ [mg/l]}$$

$$\text{KH [°dH]} \times 17.80 = \text{CaCO}_3 \text{ [mg/l]}$$

Durch Ersetzen des pKa-Wertes in Formel (1) durch den Term in Formel (2) lässt sich Gleichung (1) vereinfachen nach

$$\% \text{NH}_3 = \frac{100}{1 + 10^{((-0.03234 \cdot T + 10.0532) - \text{pH})}} \quad (5)$$

Die Ammoniak-Konzentration wird nach SCHÄPERCLAUS et al. (1990) nach folgender Beziehung ermittelt:

$$\text{NH}_3 = \frac{\% \text{NH}_3 \cdot \text{Meßwert}}{100} \quad (6)$$

Somit lässt sich Gleichung (3) vereinfachen:

$$\text{NH}_3 = \frac{\text{Meßwert der Wasserprobe} \cdot ((-0.02439 \cdot \text{°dH}) + 1.196)}{(1 + 10^{((-0.03234 \cdot T + 10.0532) - \text{pH})})} \quad (7)$$

Hierbei ist

Messwert	Summe aus $\text{NH}_3$ und $\text{NH}_4^+$
$\text{NH}_3$	Ammoniak-Konzentration in mg/l Wasser
T	Wassertemperatur in °C
pH	pH-Wert der Wasserprobe
°dH	Wasserhärte (Karbonathärte) in Grad deutscher Härte

oder

$$\text{NH}_3 = \frac{(\text{Ex}_{630} \cdot F - 0.02439 \cdot \text{°dH}) + 1.196}{(1 + 10^{((-0.03234 \cdot T + 10.0532) - \text{pH})})} \quad (8)$$

Hierbei ist

$\text{Ex}_{630}$	Extinktionswert der Wasserprobe, gemessen bei 630 nm
F	berechneter Faktor F an Hand der Meßwerte der Eichreihe
$\text{NH}_3$	Ammoniak-Konzentration in mg/l Wasser
T	Wassertemperatur in °C
pH	pH-Wert der Wasserprobe
°dH	Karbonathärte in Grad deutscher Härte

## Lebenslauf

Name	Ralf Peter Pund
Geburtsdatum	20.4.57
Geburtsort	Mannheim
Familienstand	ledig

### Schulbildung

1964-1967 Pestalozzi-Grundschule in Mannheim

1967-1976 Lessing-Gymnasium in Mannheim

2. Juli 1976 Abitur

### Studium und Hochschultätigkeiten

Oktober 1976 Beginn des Biologiestudiums an der Universität Heidelberg

Januar 1979 Vordiplom

April 1979 Wechsel an die Christian-Albrechts-Universität in Kiel; Studium der Biologie mit Spezialisierung auf dem Gebiet der Fischereibiologie am Institut für Meereskunde

September 1983 Abschluß des Biologiestudiums

Oktober 1984 Beginn des veterinärmedizinischen Studiums an der Freien Universität Berlin

1985-1987 Mitarbeit in der Arbeitsgruppe Prof. Löscher/Prof. Frey am Fachbereich Veterinärpharmakologie- und Toxikologie

1986-1990 Mitarbeit in der Arbeitsgruppe Prof. Nau am Institut für Embryonalpharmakologie- und Toxikologie

1991 3. Staatsexamen im Fach Veterinärmedizin

1990-1992 Hospitanz am Robert-von-Ostertag-Institut des Bundesgesundheitsamtes (BGA), Berlin

Seit 1992 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (ehemaliges BGA), Abteilung Fischhaltung und Fischkrankheiten

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rudolph für die Überlassung des Themas, seine stets gute Betreuung und seine überaus große Geduld bedanken.

Meinen Kollegen und Kolleginnen aus dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Abt. Fischhaltung und Fischkrankheiten, bin ich für ihre freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Dissertation zu großen Dank verpflichtet. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Elke Henrion für ihre motivierende Art, ihre großen Hilfs- und kritischen Diskussionsbereitschaft sowie konstruktiven Kritik bedanken. Ebenso bin ich Herrn Dipl.-Ing. Eckart Gloe zu großem Dank verpflichtet, der mir mit seinen konstruktiven und kritischen Ratschlägen immer eine sehr wertvolle Hilfe gewesen ist.

Mein Dank gilt auch Frau Katrin Rupprecht und Frau Dr. Bärbel Burger, die mir stets eine wertvolle Hilfe waren. Frau Annemarie Schultze danke ich für ihre bereitwillige Hilfe bei der Betreuung der Fische. Frau Dr. Stephanie Banneke und Herrn Peyman Najand möchte ich meinen herzlichen Dank für ihre freundliche Unterstützung aussprechen.

Frau Ochsmann möchte ich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung danken.

Für die ständige Diskussionsbereitschaft danke ich ganz besonders meinem Bruder, Dipl.-Psych. Bernd Pund.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Freunden Swen Baltzer, Olaf Gasper und Gina Lind bedanken, die mir immer mit fachlichen Rat und Tat zur Seite standen.