

**Effekte von Polystyrol-Mikroplastik und  
Umweltchemikalien (Antidepressivum Amitriptylin  
und Pestizid Methiocarb) auf den  
Gesundheitszustand und das Verhalten der  
Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*)**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Hannah Friederike Schmieg  
aus München

Tübingen  
2024

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

15.05.2025

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatterin:

Prof. Dr. Rita Triebkorn

2. Berichterstatterin:

Prof. Dr. Miriam Langer

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. Helmut Segner

So Long, and Thanks for All the Fish

DOUGLAS ADAMS

# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	II
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Teil 1: Zusammenfassung .....	1
Grafische Zusammenfassung .....	1
Deutsche Zusammenfassung.....	2
English Abstract .....	4
1  Einleitung.....	6
2  Untersuchte Fragestellungen und übergeordnete Hypothesen .....	15
3  Material und Methoden.....	17
4  Ergebnisse und Diskussion.....	42
5  Synthese .....	59
6  Referenzen.....	74
Teil 2: Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zu Dissertation eingereichten Publikationen und Manuskripten .....	92
Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten .....	95
Kapitel I: Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review..	95
Kapitel II: Polystyrene microplastics do not affect juvenile brown trout ( <i>Salmo trutta</i> f. <i>fario</i> ) or modulate effects of the pesticide methiocarb .....	140
Kapitel III: Interacting Effects of Polystyrene Microplastics and the Antidepressant Amitriptyline on Early Life Stages of Brown Trout ( <i>Salmo trutta</i> f. <i>fario</i> ).....	167
Kapitel IV: Effects of the Antidepressant Amitriptyline on Juvenile Brown Trout and their Modulation by Microplastics .....	201
Anhang .....	232
Publikationsliste und Konferenzbeiträge .....	239
Danksagung .....	244

## Abkürzungsverzeichnis

ABS570	Absorption bei 570 nm
acc	Nach (according)
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ACTH	Adrenocorticotropin
AcSCh	Acetylthiocholiniodid
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest	Einfach destilliertes Wasser
BkF	Benzo( <i>k</i> )fluoranthene (benzo( <i>k</i> )fluoranthene)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CAS	Chemical Abstracts Service
CAT	Katalase (Catalase)
CbE	Carboxylesterase
Chg	Choriogenin
CHP	Cumolhydroperoxid
CHPequiv	Cumolhydroperoxid-Äquivalente
cm	Zentimeter
COX	Cytochrom-c-Oxidase (cytochrome c oxidase)
CRH	Corticotropin-releasing hormone
CS	Citrat-Synthase (citrate synthase)
CYP	Cytochrom P450
CYP1A	Cytochrom P450 1A
d	Tag
DDD	Definierte Tagesdosis (defined daily dose)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpf	Tage nach der Befruchtung (days post fertilization)
EE2	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPA	Environmental Protection Agency
Er $\alpha$	Östrogenrezeptor $\alpha$ (estrogen receptor $\alpha$ )
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase

## Abkürzungsverzeichnis

ESI	Elektrospray-Ionisation
ETS	Electron transport system
EU	Europäische Union
FMO	Flavinhaltige Monoxygenasen
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathion Reduktase (glutathione reductase)
GSH	Glutathion
GST	Glutathione-S-transferase
h	Stunden (hours)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPI	Hypothalamus-Hypophyse-Interrenal
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high-performance liquid chromatography)
Hsp	Hitzeschock Proteine
kDa	Kilodalton
LC <sub>50</sub>	Letale Konzentration 50 % (lethal concentration 50%)
LDH	Lactate Dehydrogenase
LoD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LoQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
LOEC	Niedrigste Konzentration bei der ein Effekt beobachtet wurde (lowest observed effect concentration)
LPO	Lipidperoxidation
MEC	Gemessene Umweltkonzentration eines Schadstoffs (measured environmental concentration)
min	Minuten
MiWa	Mikroplastik im Wasserkreislauf (microplastics in the water cycle)
MIX <sub>ht</sub>	Gegenüber nominal 100 µg/L Amitriptylin + 10 <sup>5</sup> Partikel/L PS-MP exponierte Versuchsgruppe (Experiment 5)
MIX <sub>tt</sub>	Gegenüber nominal 100 µg/L Amitriptylin + 10 <sup>4</sup> Partikel/L PS-MP exponierte Versuchsgruppe (Experiment 5)
MP	Mikroplastik
MP <sub>tt</sub>	Gegenüber nominal 10 <sup>4</sup> Partikel/L PS-MP exponierte Versuchsgruppe (Experiment 5)

## Abkürzungsverzeichnis

MP <sub>ht</sub>	Gegenüber nominal 10 <sup>5</sup> Partikel/L PS-MP exponierte Versuchsgruppe (Experiment 5)
n. d.	Nicht bestimmt (not determined)
NOEC	Niedrigste Konzentration, bei welcher kein Effekt auftrat (no observed effect concentration)
NP	Nanoplastik (nanoplastics)
NR	Nummer
NSMRI	Nichtselektive Monoamin-Rückaufnahme-Inhibitoren
PA	Polyamid (polyamide)
PAS	Periodsäure-Schiff (periodic acid Schiff)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PE	Polyethylen (polyethylene)
PET	Polyethylenterephthalat (polyethylene terephthalate)
PMMA	Polymethylmethacrylat (polymethacrylate)
PNEC	Vorausgesagte Konzentration eines Stoffes bei der von keinen Auswirkungen auf die Umwelt ausgegangen wird (predicted no effect concentration)
PP	Polypropylen (polypropylene)
PS	Polystyrol (polystyrene)
PTFE	Polytetrafluorethylen (polytetrafluoroethylene)
PVC	Polyvinylchlorid (polyvinyl chloride)
QqLIT-MS	Quadropol-linearer Ionenfallen Massenspektrometrie (quadrupole-linear ion trap mass spectrometry)
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung (relative centrifugal force)
REACH	Verordnung der EU zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals)
RM	Raman
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RQ	Risikoquotient
SAPEA	Science Advice for Policy by European Academies
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SNRI	Serotonin-Noradrenalin-Rückaufnahme Inhibitoren
SOD	Superoxiddismutase
SSRI	Selektive Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren

## Abkürzungsverzeichnis

TBS	Tris gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (unit)
V	Volt
Vtg	Vitellogenin
WHO	World Health Organization
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µ-RM	Mikro-Ramanspektroskopie (micro-Raman spectroscopy)

# Abbildungsverzeichnis

## Teil 1:

**Abbildung 1:** Strukturformel Polystyrol abgewandelt nach CHATTERJEE & PRASAD (2011).....17

**Abbildung 2:** Strukturformel Methiocarb (mit Genehmigung von S. HUPPERTSBERG). ..... 18

**Abbildung 3:** Strukturformel Amitriptylin (mit Genehmigung von S. HUPPERTSBERG).....20

## Teil 3 – Kapitel I:

**Figure 1:** Human keratinocytes, which have taken up red fluorescent polystyrene particles of  $0.25 \pm 0.06 \mu\text{m}$ . Nuclei of the cells are stained in blue by Hoechst 33342. By courtesy of Tamara Grummt and Claudia Strobel, UBA Bad Elster..... 99

**Figure 2:** Overview of the data available on tissue translocation of nano- and microplastics in aquatic invertebrates and fish according to species, sizes and polymer types. The figure exclusively shows data from the studies discussed in chapter 3 of this publication. ....105

## Teil 3 – Kapitel II:

**Figure 1:** Electron micrograph of the cryo-milled gold sputtered PS particles (Scanning electron microscope (SEM) Zeiss DSM 982 GEMINI; secondary electron detector). ..... 143

**Figure 2:** Specific activity of acetylcholinesterase and carboxylesterases with substrate pnpa and pnpv in muscular tissue of brown trout. The box plots display the median, the 25th and 75th percentiles as well as minimum and maximum values (whiskers); the dots indicate outliers. Different letters indicate significant differences. Methiocarb and mixture significantly reduced the AChE activity as well as CbE-pnpa and CbE-pnpv activity ( $p < 0.0001$ ). ..... 152

**Figure 3:** A: Control status of liver of juvenile trout with homogenous tissue with large hepatocytes. B: The hepatocytes contain a huge amount of glycogen. C: Occurring reactions in the liver were inter alia inflammations (IN), vascular dilation (VD) and focal necrosis (FN). D: Furthermore, reduced glycogen amount and increased intercellular (IC) spaces in liver samples were found. E: Control status of gills of juvenile trout with regularly shaped secondary lamellae. F: Reaction status of gills showing hypertrophy (HT) and hyperplasia (HP) of cells, lamellar fusion (LF) reactions as well as edema (OE). A, C, E and F: hematoxylin-eosin staining; B and D: alcian blue-PAS staining. G and H: Semi-quantitative analyses of liver (G) and gills (H). Category 1 represents an excellent health status, 3 a reaction status and 5 a destruction status. 2 and 4 are intermediary classes. No section was assigned to category 5. Statistical comparison showed significantly more reactions in liver and gill samples of methiocarb or methiocarb plus PS-MP exposed fish. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.0001$ ). ..... 154

## Teil 3 – Kapitel III:

**Figure 1:** Size distribution of the used polystyrene microplastic particles (PS-MP). ..... 172

**Figure 2:** SEM images of the chorion of a recently hatched brown trout. (a): Overview with distinguishable layers at the opening. (b): Detailed view of the chorion's surface. No pores in  $\mu\text{m}$  range are present. .... 178

**Figure 3:** Modelled amitriptyline concentration over the duration of the experiment. Measured concentrations of the three exposure groups (AMI2, MIX2<sub>ht</sub>, and MIX2<sub>mio</sub>) are depicted as points. .... 180

**Figure 4:** Percent of brown trout hatched in the different treatment groups at the different days after exposure. All fish exposed to amitriptyline (AMI2, MIX2<sub>ht</sub>, MIX2<sub>mio</sub>) hatched significantly earlier than the control group and the groups containing solely MP (MP2<sub>ht</sub> and MP2<sub>mio</sub>). ..... 181

**Figure 5:** Resting behavior of brown trout fry after 42 days after exposure. Compared to the control significantly less fish exposed to MP2<sub>mio</sub> are resting on their side while significantly more fish exposed to amitriptyline (AMI2) or the mixture of amitriptyline and MP (MIX2<sub>ht</sub> and MIX2<sub>mio</sub>) are resting on their side ( $\chi^2 = 604.0806$ ,  $d.f. = 5$ ,  $p < 0.0001$ , C2/MP2<sub>ht</sub>:  $p = 0.4048$ , C2/MP2<sub>mio</sub>:  $p = 0.01816$ , MP2<sub>ht</sub>/MP2<sub>mio</sub>:  $p = 0.2108$ , C2/AMI2, C2/MIX2<sub>ht</sub>, C2/MIX2<sub>mio</sub>, MP2<sub>ht</sub>/MIX2<sub>ht</sub> and MP2<sub>mio</sub>/MIX2<sub>mio</sub>  $p < 0.001$ , AMI2/ MIX2<sub>ht</sub> and MIX2<sub>ht</sub>/MIX2<sub>mio</sub>:  $p = 1$ , AMI2/ MIX2<sub>mio</sub>:  $p = 0.4972$ ). Different letters indicate significant differences. .... 183

**Figure 6:** Behavior of brown trout during video tracking (n = 15 in each group). (a): Total distance moved in 18 min. (b): Mean velocity. (c): Total time individuals had body contact. (d): Time of no movement over recording time. (a) and (c): The box plots display the median, the 25th and 75th percentiles as well as minimum and maximum values (whiskers); the dots indicate outliers. Different letters indicate significant differences. .... 184

**Figure 7:** Enzyme activity in brown trout fry exposed to microplastic particles (MP), amitriptyline, or the mixture of both. (a): Specific activity of acetylcholinesterase (AChE). (b): Specific activity of carboxylesterases (CbE) with the substrate pnpa. (c): Specific activity of CbE with the substrate pnpv. The box plots display the median, the 25th and 75th percentiles as well as minimum and maximum values (whiskers); the dots indicate outliers. Different letters indicate significant differences. .... 185

### Teil 3 – Kapitel IV

**Figure 1:** Overview of the experimental designs of the first (A) and second (B) experiment. Grey boxes indicate one block (SOD: superoxide dismutase; AChE: acetylcholinesterase; CbE: carboxylesterases; LPO: lipid peroxidase). .... 206

**Figure 2:** Percentage of fish present in the upper half of the aquaria during the exposure to different amitriptyline concentrations in the first experiment (A) and the second experiment (B) to amitriptyline or 10<sup>4</sup> particles/L PS-MP (MP<sub>tt</sub>), 10<sup>5</sup> particles/L PS-MP (MP<sub>ht</sub>) or the mixtures amitriptyline + 10<sup>4</sup> particles/L (MIX<sub>tt</sub>), and amitriptyline + 10<sup>5</sup> particles/L (MIX<sub>ht</sub>). Fig. 2 A: Significant differences towards the control group are indicated with an asterisk. Fig. 2 B: Significant differences between the treatment groups are displayed with different letters. Further statistical information is provided in the supplement Table S7. .... 215

**Figure 3:** Results of the video tracking analysis. In plots A-C the results of the first experiment are depicted, in plots D-F the results of the second experiment (MP<sub>tt</sub>: 10<sup>4</sup> particles/L PS-MP; MP<sub>ht</sub>: 10<sup>5</sup> particles/L PS-MP; MIX<sub>tt</sub>: amitriptyline + 10<sup>4</sup> particles/L; MIX<sub>ht</sub>: amitriptyline + 10<sup>5</sup> particles/L). The boxplots display the median, the 25th and 75th percentiles as well as minimum and maximum values (whiskers) whereas dots indicate outliers. Significant differences towards the control group (complete recording time) are indicated by asterisks. Significant differences between the treatment groups are indicated by different letters. Plot 3 B and 3 C: significant differences between the control group and 10 as well as 100 µg/L occurred at the end of recording time. Further statistical information is provided in the supplement Table S7. .... 216

**Figure 4:** Specific activity of AChE. (A) first experiment: control n = 25, 1 µg/L and 100 µg/L amitriptyline n = 24, 10 µg/L n = 26; (B) second experiment: all treatment groups n = 30 (MP<sub>tt</sub>: 10<sup>4</sup> particles/L PS-MP; MP<sub>ht</sub>: 10<sup>5</sup> particles/L PS-MP; MIX<sub>tt</sub>: amitriptyline + 10<sup>4</sup> particles/L; MIX<sub>ht</sub>: amitriptyline + 10<sup>5</sup> particles/L). In the boxplots the median, the 25th and 75th percentiles as well as minimum and maximum values (whiskers) are displayed; the dots indicate outliers. Significant difference compared to the control group is indicated with an asterisk. .... 218

# Tabellenverzeichnis

## Teil 1:

**Tabelle 1:** Übersicht über die Versuche mit Bachforelleneiern und -larven (Versuche 1 und 3). .....24

**Tabelle 2:** Übersicht über Versuche mit juvenilen Bachforellen (Versuche 2, 4 und 5). .....26

**Tabelle 3:** Definition der verwendeten Kategorien zur semi-quantitativen Bewertung der Gewebeintegrität. ....33

**Tabelle 4:** Parameter des FOX-Assays bei den verschiedenen Versuchen. ....38

**Tabelle 5:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Expositionen gegenüber Einzelsubstanzen. Grüne Felder mit einem „=“ zeigen an, dass kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe auftrat. Gelbe Felder verdeutlichen einen Trend zu einem Effekt beziehungsweise, dass alle oder einzelne Tiere aus Tierwohlgründen euthanisiert wurden. Rote Felder heben eine signifikante Veränderung des Endpunkts im Vergleich zur Kontrollgruppe hervor. Pfeile geben die Richtung des Effekts an (↑ Erhöhung; ↓ Verringerung). Grau hinterlegte Felder verdeutlichen, dass der Endpunkt nicht untersucht wurde. ....59

**Tabelle 6:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Co-Exposition von Amitriptylin und Methiocarb mit PS-MP. Grüne Felder mit einem „=“ zeigen an, dass kein Unterschied bei diesem Endpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe auftrat. Gelbe Felder verdeutlichen einen Trend zu einem Effekt beziehungsweise, dass alle oder einzelne Tiere aus Tierwohlgründen euthanisiert wurden. Rote Felder heben eine signifikante Veränderung des Endpunkts im Vergleich zur Kontrollgruppe hervor. Pfeile geben die Richtung des Effekts an (↑ Erhöhung; ↓ Verringerung). Grau hinterlegte Felder verdeutlichen, dass der Endpunkt nicht untersucht wurde. ....60

**Tabelle 7:** Übersicht über die Annahme oder Ablehnung der übergeordneten Hypothesen: ✓ = angenommen; ✗ = abgelehnt; ? = uneindeutig (Nr. = Nummer). ....61

## Teil 3 – Kapitel I:

**Table 1.** Selected literature data for MP types, and particle concentrations in freshwater ecosystems. Detailed citations are provided in supplementary material (T1/1-16). .... 100

**Table 2.** Overview of the available studies on the tissue translocation of NP and MP; translocation reported by the authors. Detailed citations are provided in supplementary material (T2/1-31). ..... 102

**Table 3.** Vertebrate studies on MP/NP effects without additional stressor. In those cases in which information on particle concentrations was provided, the environmental relevance of the effects was assessed in column 6. (acc.: according to; n.d.: Study could not be assessed due to tested particle sizes < 5 µm). References in bold: environmentally relevant concentration tested. Detailed citations are provided in supplementary material (T3/1-34). ..... 114

**Table 4:** Prokaryote, plant and invertebrate studies on MP/NP effects without additional stressor. In those cases in which information on particle concentrations was provided, the environmental relevance of the effects was assessed in column 6. (acc.: according to; n.d.: Study could not be assessed due to tested particle sizes < 5 µm). References in bold: environmentally relevant concentration tested. Detailed citations are provided in supplementary material (T4/1-33). ..... 120

## Tabellenverzeichnis

### Teil 3 – Kapitel II:

<b>Table 1:</b> Size ranges (in $\mu\text{m}$ ) and counted particle numbers (per mL) of polystyrene particles in the stock suspension. ....	144
<b>Table 2:</b> Nominal and measured concentrations of methiocarb in the water phase of the different treatment groups. Displayed are the arithmetic means $\pm$ standard deviation of the three aquaria. The applied limit of quantification was 0.25 $\mu\text{g/L}$ methiocarb. ....	150
<b>Table 3:</b> Summary of data for the investigated endpoints. All data are given as arithmetic means $\pm$ standard deviation. ....	151

### Teil 3 – Kapitel III:

<b>Table 1:</b> Summary of data for the investigated endpoints in experiment 1a. All data are given as arithmetic means $\pm$ standard deviation. ....	179
<b>Table 2:</b> Summary of data for the investigated endpoints in experiment 1b. All data are given as arithmetic means $\pm$ standard deviation. ....	179
<b>Table 3:</b> Nominal and measured amitriptyline concentrations at the start of the experiment as well as prior and after a water exchange. ....	180
<b>Table 4:</b> Summary of data for the investigated endpoints in experiment 2. All data are given as arithmetic means $\pm$ standard deviation. <i>p</i> -values in comparison to the control group are given if significant differences occurred. ....	182

### Teil 3 – Kapitel IV:

<b>Table 1:</b> Nominal and measured amitriptyline concentrations of the first experiment (limit of quantification (LoQ) 0.1 $\mu\text{g/L}$ ; n.a.: not analyzed; for calculation of mean exposure concentrations values below the limit of quantification were substituted with $\text{LoQ}/\sqrt{2}$ ). ....	211
<b>Table 2:</b> Measured amitriptyline concentrations of the second experiment (limit of quantification (LoQ) 0.1 $\mu\text{g/L}$ ; for calculation of mean exposure concentrations values below the limit of quantification were substituted with $\text{LoQ}/\sqrt{2}$ ; $\text{MP}_{\text{tt}}$ : $10^4$ particles/L PS-MP; $\text{MP}_{\text{ht}}$ : $10^5$ particles/L PS-MP; $\text{MIX}_{\text{tt}}$ : amitriptyline + $10^4$ particles/L; $\text{MIX}_{\text{ht}}$ : amitriptyline + $10^5$ particles/L). ....	212
<b>Table 3:</b> Results of the first experiment. If significant differences occurred, <i>p</i> values compared to the control group are mentioned. Significant differences to the control group are indicated with an asterisk and highlighted in bold. ....	213
<b>Table 4:</b> Summary of the results of the second experiment ( $\text{MP}_{\text{tt}}$ : $10^4$ particles/L PS-MP; $\text{MP}_{\text{ht}}$ : $10^5$ particles/L PS-MP; $\text{MIX}_{\text{tt}}$ : amitriptyline + $10^4$ particles/L; $\text{MIX}_{\text{ht}}$ : amitriptyline + $10^5$ particles/L; n.a.: not analyzed). If significant differences occurred <i>p</i> values compared to the control group are mentioned. Significant differences to the control group are indicated with an asterisk and highlighted in bold. For significant differences between the treatment groups see Table S7. ....	214

### Anhang:

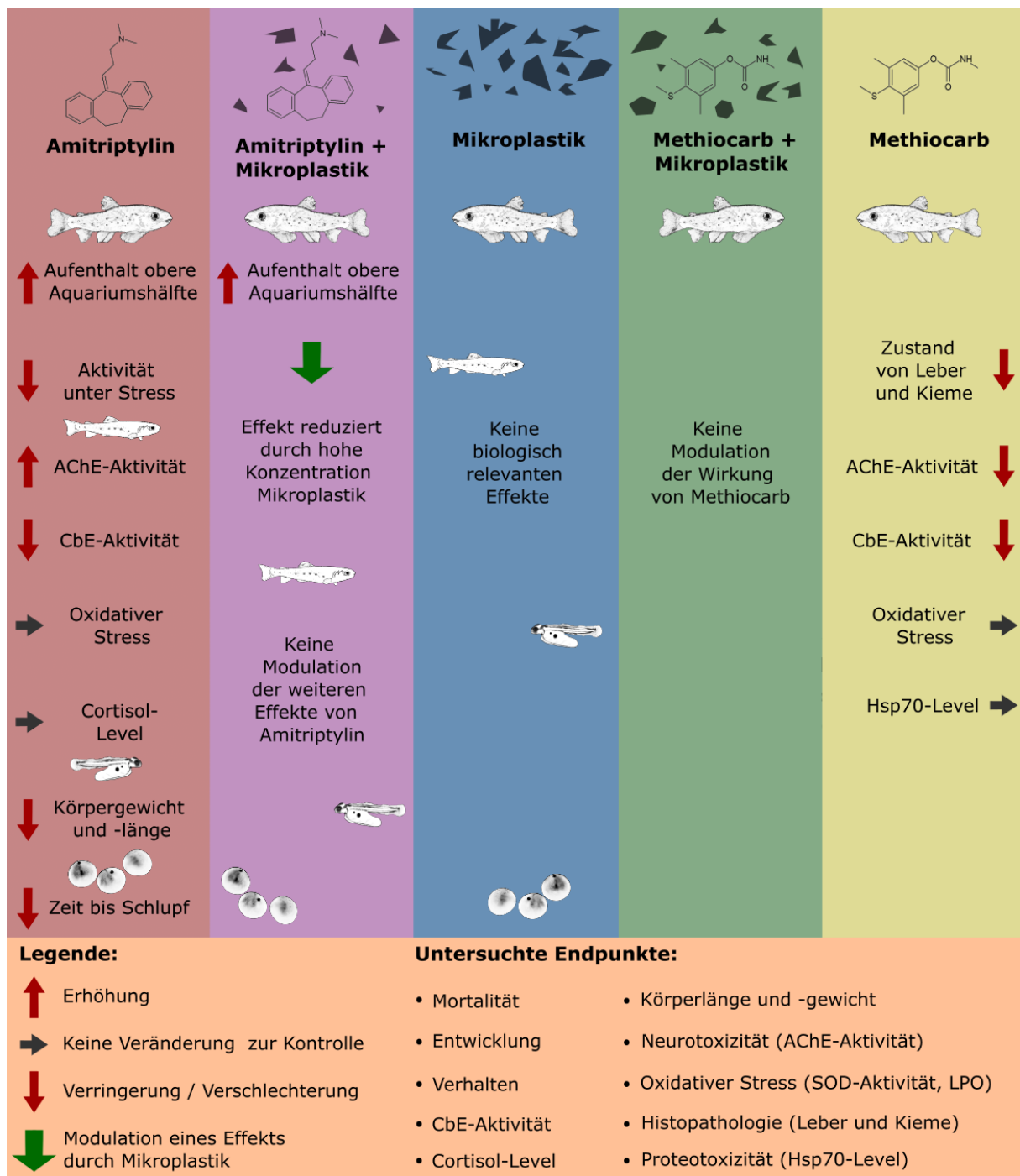
<b>Tabelle A1:</b> Schritte zur Dehydrierung und Infiltration der histologischen Gewebeproben. ....	232
<b>Tabelle A2:</b> Hämatoxylin-Eosin Färbung. ....	233
<b>Tabelle A3:</b> PAS-Alcianblau Färbung. ....	234

# Teil 1: Zusammenfassung

## Promotionsthema

Effekte von Polystyrol-Mikroplastik und Umweltchemikalien (Antidepressivum Amitriptylin und Pestizid Methiocarb) auf den Gesundheitszustand und das Verhalten der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*).

## Grafische Zusammenfassung



## Deutsche Zusammenfassung

Kunststoffpartikel mit einer Größe von  $< 5$  mm werden als Mikroplastik bezeichnet und können ubiquitär in der Umwelt nachgewiesen werden. Trotz zahlreichen wissenschaftlichen Studien ist immer noch nicht abschließend geklärt, welche Folgen für Organismen aus der Belastung der Umwelt mit Mikroplastik entstehen. In der Umwelt trifft Mikroplastik zudem auf eine komplexe Mischung weiterer Schadstoffe, mit welchen zusätzliche Wechselwirkungen auftreten können. So werden Pestizide zum Beispiel gezielt in die Umwelt eingebracht, um dort eine Wirkung zu entfalten. Im Gegensatz dazu gelangen andere Chemikalien ungewollt in die Umwelt. Humanarzneimittel werden beispielsweise teilweise von Menschen unverändert ausgeschieden oder gelangen durch unsachgemäße Entsorgung in die Kanalisation. Sowohl Pestizide als auch Humanarzneimittel wirken meist auf stark konservierte molekulare Ziele und verursachen so auch bei Nicht-Zielorganismen Effekte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit und eingebettet in das Projekt „MiWa – Mikroplastik im Wasserkreislauf“ wurde eine kritische Literaturstudie zum Vorkommen von Mikroplastik in der Umwelt, der Möglichkeit einer Gewebetranslokation von Mikroplastik sowie Auswirkungen von Mikroplastik sowohl als alleiniger Stressor als auch in Kombination mit anderen Schadstoffen auf Vertebraten und Invertebraten angefertigt. Die Literaturstudie zeigt, dass in wissenschaftlichen Studien mit größeren Mikroplastikpartikeln meistens Konzentrationen untersucht werden, welche deutlich über umweltrelevanten Partikelkonzentrationen liegen. Für sehr kleine Mikroplastik- ( $< 5 \mu\text{m}$ ) beziehungsweise Nanoplastikpartikel ( $< 1 \mu\text{m}$ ) liegen hingegen nur sehr wenige belastbaren Werte zu Umweltkonzentrationen vor. Das Risiko für negative Effekte in aquatischen Organismen durch größere Mikroplastikpartikel erscheint auf Basis der Datenlage eher gering. Potenziell kritischer sind hingegen kleine Mikroplastikpartikel oder Nanoplastik, da für diese Partikel eine Gewebetranslokation und eine Interaktion mit anderen Schadstoffen wahrscheinlicher ist und es Indizien für höhere Umweltkonzentrationen gibt.

Neben der Literaturstudie bilden fünf Laborversuche zu den Auswirkungen von Polystyrol-Mikroplastik ( $< 50 \mu\text{m}$ ) und dem Antidepressivum Amitriptylin auf verschiedene Lebensstadien der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) die Grundlage der vorliegenden Arbeit. Zusätzlich wurde eine mögliche Modulation der Effekte des Antidepressivums Amitriptylin und des Pestizids Methiocarb auf Bachforellen durch Polystyrol-Mikroplastik untersucht. In den Versuchen wurden Effekte auf die Entwicklung der Tiere, die Körpergröße und das Gewicht, sowie das Verhalten während der Versuche und unter stressauslösenden Bedingungen analysiert. Zudem wurde der Cortisolgehalt, das Stressproteinlevel (Hsp70), die Aktivität der Acetylcholinesterase sowie zweier Carboxylesterasen bestimmt und der histopathologische Zustand der Leber und Kieme sowie das

## Deutsche Zusammenfassung

oxidative Stresslevel anhand der Aktivität der Superoxiddismutase und des Grads der Lipidperoxidation untersucht.

In den Versuchen wurden weder bei einer umweltrelevanten Konzentration noch bei deutlich höheren Partikelkonzentrationen von bis zu einer Millionen Mikroplastikpartikel pro Liter biologisch relevante Effekte bei Bachforellen beobachtet. Vor dem Schlupf sind frühe Entwicklungsstadien von Fischen zudem effektiv durch das Chorion vor direkten Effekten durch Mikroplastik geschützt. Die nominale Konzentration von 1 mg/L Methiocarb verursachte eine Hemmung der Acetylcholinesterase sowie der untersuchten Carboxylesterasen und einen signifikant schlechteren histopathologischen Zustand der Leber und Kieme. Die niedrigen Konzentrationen des Pestizids in der Umwelt sowie das seit kurzem in Kraft getretene Verbot von Methiocarb in der EU führen zu einem vernachlässigbaren Risiko von Methiocarb für Fische in Deutschland. Konzentrationen von nominal  $\leq 10 \mu\text{g/L}$  Amitriptylin verursachten teilweise starke Effekte auf die Entwicklung von Bachforellen, ihr Verhalten und die Aktivität der Acetylcholinesterase und der zwei Carboxylesterasen. Bei Konzentrationen von nominal  $\geq 300 \mu\text{g/L}$  Amitriptylin traten Bewegungsstörungen und Effekte auf die Atmung der Fische auf, so dass die Versuche mit juvenilen Bachforellen aus Tierwohlgründen in diesen Versuchsgruppen abgebrochen wurden. In der Umwelt werden zumeist sehr niedrige Amitriptylinkonzentrationen von wenigen Nanogramm nachgewiesen. Werden höhere Konzentrationen in einer Umweltprobe gemessen, sollten Risikominderungsmaßnahmen in Betracht gezogen werden. Die Co-Exposition von Methiocarb und Amitriptylin mit hohen Konzentrationen Polystyrol-Mikroplastik modulierte die Einzelwirkung der Schadstoffe auf Bachforellen nicht. Eine Ausnahme bildete eine Reduktion des Effekts von Amitriptylin auf das Schwimmverhalten juveniler Bachforellen während des Versuchs bei einer Co-Exposition von Amitriptylin und  $10^5$  Polystyrol-Mikroplastikpartikel pro Liter. Es ist daher fraglich, wie relevant in der Umwelt die Modulation der Wirkung von Schadstoffen durch Mikroplastik im Vergleich zu deutlich häufigeren natürlichen Partikeln ist.

Nach dem bisherigen Wissensstand und den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen besteht kein großflächiges Gesundheitsrisiko durch Mikroplastik für Fische. Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich in bestimmten Fällen die ubiquitäre Umweltverschmutzung mit Mikroplastik negativ auf Fische auswirken kann.

## English Abstract

Plastic particles with a size  $< 5$  mm are defined as microplastics and are ubiquitously detected in the environment. The scientific literature on microplastics increased remarkably in the last years but a comprehensive evaluation of the risk of microplastics for fish is still difficult. Furthermore, in the aquatic environment microplastics encounter and interact with a complex mixture of other chemicals. For example, surface waters are contaminated by pesticides after the application of the substances on fields by spray drift, runoff and leaching of the pesticides. Residues of pharmaceuticals, in contrast, reach surface waters via sewage waters when pharmaceuticals are improperly disposed, or active ingredients of pharmaceuticals are excreted unmetabolized. Since pesticides and pharmaceuticals typically interact with highly conserved molecular targets, they often exhibit effects on non-target organisms as for example on fish in surface waters.

The present thesis contains a literature review which was conducted in the context of the project "MiWa – microplastics in the water cycle". The aim of the literature review was to assess the occurrence of microplastics in surface waters and sediments as well as the mechanisms of tissue translocation of the particles and effects of microplastics as sole stressor and in combination with other chemicals. The review demonstrated that studies investigating larger microplastics mostly use very high and environmentally not relevant particle concentrations. In contrast, reliable data on environmental concentrations of small microplastic particles ( $< 5 \mu\text{m}$ ) or nanoplastics ( $< 1 \mu\text{m}$ ) are still rare. Based on the current state of knowledge, the risk posed by large microplastic particles to aquatic organisms appears to be rather low. Due to possibly much higher environmental concentrations, a higher putative risk is associated with small microplastics. These particles are also more likely to undergo tissue translocation and interact with other pollutants.

In addition to the literature review this thesis presents five laboratory experiments on the effects of polystyrene microplastics ( $< 50 \mu\text{m}$ ) and the antidepressant amitriptyline in different life stages of brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*). Furthermore, a potential modulation of the effects of the antidepressant amitriptyline and the pesticide methiocarb on brown trout by polystyrene microplastics was investigated. In the experiments developmental parameters, body weight and size, as well as the behavior of the trout during the experiments and under stress-inducing conditions were assessed. Moreover, as biochemical endpoints the stress protein (Hsp70) level, the cortisol content, the activity of acetylcholinesterase and two other carboxylesterases as well as the level of oxidative stress by means of the activity of superoxide dismutase and the degree

## English Abstract

of lipid peroxidation were examined. In addition, as an indicator for overall health, histopathological effects in liver and gills of juvenile trout were assessed.

The conducted studies could demonstrate that polystyrene microplastics exerted no biological relevant effects on brown trout, neither at an environmentally relevant concentration nor at a several magnitudes higher concentration of one million particles per liter. Furthermore, electron-microscopic images of the chorion, the acellular coat surrounding the fish egg, demonstrated that fish are effectively protected against direct effects of microplastics until the hatch. In contrast, the pesticide methiocarb caused severe effects in juvenile trout: a nominal concentration of 1 mg/L methiocarb inhibited the activity of the acetylcholinesterase and the two investigated carboxylesterases and caused significant adverse effects in liver and gills. However, in Europe the concentrations of methiocarb in the aquatic environment are currently low and the European Union does not longer approve the use of methiocarb in pesticides. Together this results in a low risk posed by methiocarb for fish in Germany. Amitriptyline, the third investigated substance, caused at a concentrations of nominal  $\leq 10 \mu\text{g/L}$  significant effects on the development of brown trout, their behavior, and the activity of acetylcholinesterase and two carboxylesterases. Nominal concentrations of  $\geq 300 \mu\text{g/L}$  amitriptyline provoked severe ataxic movements and effects on respiration of juvenile trout, therefore the fish had to be euthanized for animal welfare. The environmental concentrations of amitriptyline are usually very low, in the range of only a few nanograms per liter. However, if environmental samples with higher amitriptyline concentrations are detected, risk mitigation measures for fish should be considered. The co-exposure of either methiocarb or amitriptyline with high concentrations of microplastics did not modulate the individual effects of the substances on brown trout. One exception was the reduction of the effect of amitriptyline on the swimming behavior in juvenile trout co-exposed to amitriptyline and  $10^5$  particles/L. Considering the substantially higher number of natural particles in the environment it is, however, questionable how relevant the modulation of effects of organic pollutants by microplastics in the environment is.

Based on the current state of knowledge and the experiments conducted at the University of Tübingen, the risk posed by microplastic particles to fish may be rather low. However, it cannot be excluded that in certain cases, the ubiquitous environmental contamination with microplastics may cause adverse effects in fish.

# 1 Einleitung

Das Modell der neun planetaren Belastungsgrenzen beschreibt, wie anthropogenes Handeln und daraus resultierende Wechselwirkungen die Stabilität und Resilienz der Erde seit der letzten Eiszeit mit möglicherweise katastrophalen Folgen gefährden (ROCKSTRÖM *et al.* 2009, RICHARDSON *et al.* 2023, CAESAR *et al.* 2024). Neben den Grenzen zur Klimaveränderung, dem Rückgang der biologischen Vielfalt sowie einer problematischen Veränderung der Landnutzung zählt die Verschmutzung der Umwelt zu den sechs als überschritten geltenden planetaren Belastungsgrenzen (RICHARDSON *et al.* 2023, CAESAR *et al.* 2024). Die jährliche Produktion und Freisetzung von Chemikalien oder allgemeiner neuer Substanzen („novel entities“) übertrifft die Möglichkeiten für deren Bewertung und ihres Monitorings (PERSSON *et al.* 2022). Dies führt dazu, dass die Effekte der Stoffe und insbesondere ihrer Interaktion unzureichend bekannt sind und teilweise ihre Nutzung nicht ausreichend reguliert werden kann (ROCKSTRÖM *et al.* 2009, PERSSON *et al.* 2022).

## 1.1 Nutzung von Kunststoffen

Als besonders besorgniserregend wird die Verschmutzung der Umwelt mit Kunststoffen wahrgenommen, die nahezu jedes Meer- und Süßwasserökosystem betrifft (BORRELLE *et al.* 2020, PERSSON *et al.* 2022, THOMPSON *et al.* 2024). Als Kunststoffe oder umgangssprachlich Plastik werden hochmolekulare organische Verbindungen (Polymere) bezeichnet, die aus niedermolekularen Grundbausteinen (Monomere) oder durch die Abwandlung hochmolekularer Naturstoffe hergestellt werden (DOMININGHAUS 2012). Die Eigenschaften der Polymere werden dabei durch die Zugabe von Additiven wie Weichmacher, Flammschutzmitteln oder Antioxidanzien modifiziert (GEYER *et al.* 2017). Auf Grund der Vielseitigkeit und der vergleichbar geringen Kosten werden Kunststoffe in sehr vielen Bereichen, wie beispielsweise für Verpackungen, im Medizinbedarf und im Bauwesen verwendet (DOMININGHAUS 2012, GEYER 2020). Kunststoffe bieten viele Vorteile, wie die Kraftstoffeinsparung in der Automobilindustrie durch ihr geringes Gewicht, die Senkung des Energiebedarfs durch effektive Isolation oder die Reduzierung von Lebensmittelverschwendung durch sinnvolle Verpackungen (EUROPÄISCHE KOMMISSION 2018). Die Nutzungsdauer der Kunststoffprodukte ist dabei sehr unterschiedlich, von sehr kurz genutzten Einwegprodukten bis hin zu Gebäudeteilen, welche jahrzehntelang verwendet werden können (GEYER 2020). Die Zunahme der Produktion von Kunststoffen zwischen 1950 und 2015 war größer als die jedes anderen Materials (GEYER *et al.* 2017). Allein im Jahr 2021 wurden weltweit 390,7 Millionen Tonnen Kunststoffe produziert, wobei über 90 % der Kunststoffe aus fossilen Rohstoffen hergestellt wurden (PLASTICS EUROPE 2022). Setzt sich der Trend in der Kunststoffproduktion fort, würden 2050 weltweit jährlich 1100 Millionen Tonnen

Kunststoffe produziert werden (GEYER 2020). Durch die ansteigende Produktion und Nutzung nimmt auch die Umweltverschmutzung durch Kunststoffe zu und könnte sich bis 2050 nahezu verdoppeln (POTTINGER *et al.* 2024). Zu einem Eintrag von Kunststoffen in die Umwelt kann es dabei während der Produktion selbst, durch die intendierte Nutzung eines Produkts sowie durch unsachgemäße Entsorgung oder unzureichende Abfallwirtschaft kommen (RYBERG *et al.* 2019). Kunststoffmüll kann entweder recycelt, verbrannt oder entsorgt werden. Circa 60 % aller jemals produzierter Kunststoffe wurden entweder auf Mülldeponien entsorgt oder gelangten direkt in die Umwelt (GEYER *et al.* 2017). Prinzipiell können Kunststoffe durch ultraviolettes Licht und Sauerstoff oxidiert und mikrobiell abgebaut werden. Allerdings sind Kunststoffe sehr persistent und ihr Abbau kann in der Umwelt Jahrzehnte bis Jahrhunderte dauern (WORM *et al.* 2017, ANDRADY 2022). Daher findet in der Umwelt meist nur eine mechanische Zerkleinerung photooxidierter größerer Kunststoffteile in immer kleinere Fragmente statt (ANDRADY 2022).

## 1.2 Mikroplastik

Kunststoffe unterhalb einer bestimmten Größe werden als Mikroplastik (MP) bezeichnet (WAGNER *et al.* 2014, THOMPSON *et al.* 2024). Die Definition des Begriffs ist jedoch nicht einheitlich. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff nach der Definition von HARTMANN *et al.* (2019) für Kunststoffe von einer Größe von 1-999  $\mu\text{m}$  verwendet, während Kunststoffe zwischen 1-999 nm als „Nanoplastik“ (NP) bezeichnet werden und für Kunststoffpartikel in einer Größe von 1-5 mm der Begriff „großes MP“ gebraucht wird. Unterschieden wird in der Literatur zwischen primärem MP, welches bereits in dieser Größe produziert wird, und sekundärem MP, welches durch Fragmentierung aus größeren Kunststoffen entsteht (HARTMANN *et al.* 2019, THOMPSON *et al.* 2024). Auch Reifenabrieb wird unter dem Begriff MP subsummiert (RYBERG *et al.* 2019, THOMPSON *et al.* 2024). MP kann unterschiedliche Formen haben und zum Beispiel als Fasern, Filme und Kugeln auftreten oder irregulär geformt sein (HARTMANN *et al.* 2019). In der Umwelt kann sich ein Biofilm auf dem MP ausbilden und sich die Form und Oberflächenstruktur der Kunststoffpartikel ändern, beispielsweise hervorgerufen durch den Einfluss von UV-Strahlung (LIU *et al.* 2020, ANDRADY 2022). Diese sogenannten Alterungsprozesse können die Interaktion der Partikel mit Umweltchemikalien und die Bioverfügbarkeit von gebundenen Stoffen beeinflussen (LIU *et al.* 2020). Während der Haupteintragspfad für Makroplastik in die Umwelt fehlerhafte Abfallwirtschaft ist, stellt Reifenabrieb die größte Quelle für MP dar (RYBERG *et al.* 2019).

## 1.3 Regulierung von Kunststoffen und Mikroplastik in der Europäischen Union

Die Europäische Kommission hat eine Strategie für Kunststoffe in der Kreislaufwirtschaft entwickelt (EUROPÄISCHE KOMMISSION 2018). In dieser werden Maßnahmen formuliert, die den verursachten Umweltproblemen durch Kunststoffe entgegensteuern und durch welche ein kreislaufforientierter Lebenszyklus für Kunststoffe erreicht werden soll. Der Strategie folgend wurde, primär zur Reduktion der Vermüllung der Meere durch Kunststoffabfälle, in der EU-Richtlinie 2019/904 unter anderem das Verbot des Inverkehrbringens von Einwegkunststoffartikeln wie Einmalbesteck, Trinkhalmen und bestimmter Lebensmittelverpackungen erlassen. Zudem wurde 2023 die Verordnung zur Registrierung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) geändert, um den Eintrag synthetischer Polymermikropartikel durch Produkte zu verhindern, welche eine Freisetzung in die Umwelt bewirken. So dürfen zukünftig beispielsweise Düngemittel, Kosmetika und Kunstrasengranulat kein MP mehr enthalten (EUROPÄISCHE UNION 2023).

## 1.4 Belastung der Umwelt mit Mikroplastik

Durch die vergleichbar geringe Dichte und die hohe Persistenz kann MP über große Strecken durch Flüsse, Meeresströmungen und die Luft transportiert werden (BERGMANN *et al.* 2022, THOMPSON *et al.* 2024). Bedingt durch den hohen Eintrag und den Transport über weite Strecken ist die Belastung der Umwelt mit MP ubiquitär (z.B. BIGINAGWA *et al.* 2016, LESLIE *et al.* 2017, WANG *et al.* 2017, GRBIĆ *et al.* 2020, E SILVA & DE SOUSA 2021). MP wurde bereits selbst in scheinbar von Menschen unbeeinflussten Ökosystemen wie der Arktis nachgewiesen (ALLEN *et al.* 2019, BERGMANN *et al.* 2022, THOMPSON *et al.* 2024). Die Anzahl der in der Umwelt nachgewiesenen Partikel variiert dabei beträchtlich zwischen  $10^{-3}$  und über  $10^5$  Partikel pro Kubikmeter im Süßwasser (LU *et al.* 2021). Im Oberflächenwasser werden dabei häufig Konzentrationen zwischen 0-30 Partikel pro Kubikmeter nachgewiesen (GAO *et al.* 2024). Bei der Interpretation der Partikelanzahl müssen auch die sehr unterschiedlichen Methoden im Nachweis von MP berücksichtigt werden, welche die Vergleichbarkeit verschiedener Studien stark erschweren (LI *et al.* 2020a, LU *et al.* 2021, GAO *et al.* 2024).

## 1.5 Durch Mikroplastik verursachte Effekte auf Fische

MP kann ungewollt zusammen mit Nahrung oder Wasser in den Magen-Darm-Trakt von Fischen gelangen oder gezielt gefressen werden (ORY *et al.* 2018, BATEL *et al.* 2020, DE SALES-RIBEIRO *et al.* 2020, ROCH *et al.* 2020, PARKER *et al.* 2021). Zudem wurde ein Transport von MP über verschiedene Trophiestufen gezeigt (BATEL *et al.* 2016, ATHEY *et al.* 2020, ELIZALDE-VELÁZQUEZ *et al.* 2020, HANSLIK *et al.* 2020). MP wird mit dem Nahrungsbrei durch den Organismus transportiert und wieder ausgeschieden (BATEL *et al.* 2016, ORY *et al.* 2018, ATHEY *et al.* 2020, BATEL *et al.* 2020, DE SALES-RIBEIRO *et al.* 2020, PARKER *et al.* 2021). Bei einer Exposition mit sehr kleinem MP oder NP besteht die Möglichkeit, dass Partikel in Zellen aufgenommen werden (BATEL *et al.* 2016, MATSSON *et al.* 2017, DE SALES-RIBEIRO *et al.* 2020, TORRES-RUIZ *et al.* 2023). Die Auswirkungen von MP werden durch viele Faktoren beeinflusst wie die Art des Polymers, die verwendeten Additive, die Form, Größe und Dichte der Partikel, aber auch durch die untersuchte Fischart sowie das experimentelle Design (ORY *et al.* 2018, ROCH *et al.* 2020, PARKER *et al.* 2021). MP kann Organismen mechanisch schädigen, indem Partikel die Nahrungsaufnahme beeinträchtigen oder zu physischen Schäden führen (DE RUIJTER *et al.* 2020). Für Fische wurde beispielsweise beschrieben, dass MP Inappetenz (DE SALES-RIBEIRO *et al.* 2020), Entzündungen und oxidativen Stress (QIAO *et al.* 2019, SOLOMANDO *et al.* 2021) verursachen sowie den Energiestoffwechsel beeinflussen kann (WEN *et al.* 2018). Neben den Partikeln selbst können auch aus MP austretende Chemikalien und noch vorhandene Monomere zu vielfältigen Effekten auf Organismen führen (LITHNER *et al.* 2009, SCHIAVO *et al.* 2018). So konnten TIAN *et al.* (2021) zeigen, dass aus Reifenabrieb stammendes 6PPD-Chinon in den USA Fischsterben bei Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*) verursacht.

Neben Effekten, welche MP als alleiniger Stressor hervorruft, müssen auch Interaktionen mit anderen Schadstoffen berücksichtigt werden. In Süßwasserökosystemen bilden tausende Chemikalien wie beispielsweise Pestizide, Arzneimittel oder Industriechemikalien eine komplexe Mischung (SCHWARZENBACH *et al.* 2006). Die meisten Schadstoffe treten dabei als Spurenstoffe in sehr geringen Konzentrationen im Bereich von Pikogramm bis wenigen Mikrogramm pro Liter auf (SCHWARZENBACH *et al.* 2006, KIM & ZOH 2016). Hydrophobe Schadstoffe können von MP ad- oder absorbiert werden, wodurch die Bioverfügbarkeit der Stoffe beeinflusst werden kann (PRAJAPATI *et al.* 2022). Ad- oder absorbierte Schadstoffe können über lange Strecken und verschiedene Trophiestufen transportiert werden (ZARFL & MATTHIES 2010, BATEL *et al.* 2016, HANSLIK *et al.* 2020). Die Relevanz des Einflusses von MP auf die Auswirkungen anderer Schadstoffe im Vergleich zu weiteren Expositionspfaden wird hierbei jedoch kritisch diskutiert (ZARFL & MATTHIES 2010, KOELMANS *et al.* 2013, BAKIR *et al.* 2016, BECKINGHAM & GHOSH 2017, HANSLIK

*et al.* 2020). Verschiedene Studien beschreiben, dass MP die Effekte anderer Schadstoffe auf Organismen verstärken kann (z.B. OLIVEIRA *et al.* 2013, NEMATDOOST HAGHI & BANAEI 2017, ZHAO *et al.* 2020). Durch die Bindung von Schadstoffen an Partikel kann allerdings auch der gegenteilige Effekt eintreten und die Bioverfügbarkeit und daraus resultierende Auswirkungen auf Organismen reduziert werden (z.B. CHEN *et al.* 2017, REHSE *et al.* 2018, LI *et al.* 2020b).

## 1.6 Pestizide als Umweltchemikalien

Nach Düngemitteln sind Pestizide die zweitgrößte Gruppe an Chemikalien, welche gezielt in die Umwelt ausgebracht werden (FENNER *et al.* 2013, STOKSTAD & GRULLÓN 2013). Pestizide können Ernteerträge erheblich steigern, Verluste durch Schädlinge reduzieren und die Qualität von landwirtschaftlichen Produkten erhöhen (COOPER & DOBSON 2007). Bei circa 40 % der angewendeten Pestizide handelt es sich um Herbizide, während am zweithäufigsten Insektizide, gefolgt von Fungiziden, eingesetzt werden (STOKSTAD & GRULLÓN 2013). Neben der Untergliederung nach ihrem Einsatzgebiet werden Pestizide auch nach ihrer chemischen Struktur, wie beispielsweise als Organophosphate oder Carbamate klassifiziert (FENNER *et al.* 2013). Pflanzenschutzmittel müssen hinreichend wirksam gegen Zielorganismen sein und bergen so auch ein Risiko für Nicht-Zielorganismen (EU 2009). Durch Drift, Abschwemmung und Auswaschung werden Pflanzenschutzmittel in Gewässer eingetragen und können oft in niedrigen Konzentrationen in der Umwelt nachgewiesen werden (LEU *et al.* 2004, FENNER *et al.* 2013, MCKNIGHT *et al.* 2015). Der Eintrag von Pestiziden kann direkt zu Fischsterben führen oder auch subletale Auswirkungen auf die Tiere haben, indem sie beispielsweise histopathologische Veränderungen, Effekte auf das Immunsystem oder Verhaltensveränderungen verursachen (ULLAH & ZORRIEZHARA 2015, ROHANI 2023). Die Zulassung von Pestiziden ist in der EU durch die Verordnung 1107/2009 und in Deutschland durch das Pflanzenschutzgesetz reguliert (EU 2009, PFLSCHG 2012). Das Vorkommen von als besonders bedenklich eingeschätzten Pestizidrückständen in Oberflächengewässern wird im Rahmen des in der Wasserrahmenrichtlinie festgelegten Monitorings prioritärer Stoffe und flussgebietspezifischer Stoffe sowie der Richtlinie über Umweltqualitätsnormen überprüft (EU 2000, EU 2008). Weitere potenziell problematische Stoffe, für die eine unzureichende Datenbasis besteht, werden zudem im Rahmen einer Beobachtungsliste („watch list“) bis zu vier Jahren überwacht (EU 2013).

### 1.6.1 Methiocarb

Das Carbamat-Pestizid Methiocarb wird als Stoff eingestuft, welcher möglicherweise ein erhebliches Risiko für die aquatische Umwelt darstellt. Aus diesem Grund wurde Methiocarb von 2015 bis 2019 auf die erste und zweite Beobachtungsliste aufgenommen, bis die mögliche

Höchstdauer einer kontinuierlichen Überwachung erreicht war (EU 2015, EU 2018, EU 2020). Methiocarb kann als Insektizid, Akarizid, Molluskizid sowie als Repellent gegen Vögel eingesetzt werden (WORTHING *et al.* 1991). Die Konzentration, bei der angenommen wird, dass keine Auswirkungen auf die Umwelt zu erwarten ist (PNEC „Predicted No Effect Concentration“), wird auf 2 ng/L bis 100 ng/L Methiocarb geschätzt (LOOS *et al.* 2018). In Umweltproben liegt die Konzentration des Pestizids häufig unterhalb der Detektionsgrenze oder es werden niedrige Rückstandsgehalte von Methiocarb gemessen, welche allerdings teilweise die PNEC überschreiten (MASIÁ *et al.* 2013, LOOS *et al.* 2018, PARIS *et al.* 2018, JURADO *et al.* 2022). So war die durchschnittliche detektierte Konzentration in Oberflächengewässern während eines EU-weiten Monitorings zwischen 6-40 ng/L (LOOS *et al.* 2018). MASIÁ *et al.* (2013) wiesen hingegen 391 ng/L Methiocarb in einem Fluss in Spanien nach und fanden Rückstände des Carbamats vereinzelt in Sedimentproben. In Mexiko wurden mit 5400 ng/L Methiocarb deutlich höhere Rückstände in einer Grundwasserprobe gemessen als in Europa (GARCÍA DE LLASERA & BERNAL-GONZÁLEZ 2001).

Relativ wenige Studien haben die Auswirkungen von Methiocarb auf Fische untersucht. Nach einer Exposition mit 3,75 und 7,5 mg/L (96 h) wurden in Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) Veränderungen an der Kieme wie beispielsweise Ödeme, Teleangiektasien, Hyperplasien und Fusionen bei Sekundärlamellen beobachtet. Zudem wurde die Bildung von Nekrosen in Leber, Niere, Milz und im Gehirn beschrieben. (ALTINOK *et al.* 2006). In einer nachfolgenden Studie verursachte eine 21-tägige Exposition gegenüber 3,75 mg/L Methiocarb jedoch keine histopathologischen Effekte in Leber, Niere, Milz und Gehirn von Regenbogenforellen. In der Kieme der Regenbogenforellen konnte hingegen eine reversible Ablösung des Epithels vom Sekundärfilament beobachtet werden (ALTINOK & CAPKIN 2007). Die letale Konzentration, bei der 50 % der untersuchten Tiere nach 96 h versterben (LC<sub>50</sub>), liegt bei Fischen zwischen 0,21-10 mg/L Methiocarb (JOHNSON & FINLEY 1980, WORTHING *et al.* 1991, ALTINOK *et al.* 2006). Methiocarb ist zudem sehr toxisch für Invertebraten. So verursachen 0,008 mg/L Methiocarb bei 50 % der untersuchten großen Wasserflöhe (*Daphnia magna*) eine Schwimmunfähigkeit (JURADO *et al.* 2022).

## 1.7 Humanarzneimittel als Umweltchemikalien

Neben Chemikalien, welche gezielt in die Umwelt eingebracht werden, findet auch eine Belastung durch Stoffe statt, die im Rahmen ihrer normalen Anwendung unbeabsichtigt in die Umwelt gelangen. Mitbedingt durch die zunehmende Alterung der Gesellschaft hat der Verkauf und der Verbrauch von Humanarzneimitteln zwischen 2001 und 2017 stetig zugenommen (GONZÁLEZ PEÑA *et al.* 2021). Arzneimittel werden teilweise unverändert und als aktive Metabolite von Menschen ausgeschieden oder gelangen durch unsachgemäße Entsorgung in das Abwassersystem (KHETAN

& COLLINS 2007). Können Pharmazeutika nur unvollständig durch die Kläranlagen aus dem Abwasser entfernt werden, gelangen Arzneimittelrückstände sowie ihre Metabolite mit dem gereinigten Abwasser in Oberflächengewässer (SANDERSON *et al.* 2003, FENT *et al.* 2006, VYSTAVNA *et al.* 2012). Rückstände von Humanarzneimitteln wurden weltweit in Oberflächengewässern nachgewiesen und werden teilweise auch im Grundwasser und im Trinkwasser detektiert (FENT *et al.* 2006, CORCORAN *et al.* 2010, SUMPTER & MARGIOTTA-CASALUCI 2022). Die Konzentrationen der Rückstände liegen dabei normalerweise in einem Bereich von Nano- bis Mikrogramm pro Liter (CORCORAN *et al.* 2010). Durch ihren beständigen Eintrag in die Umwelt kann allerdings auch bei vergleichsweise gut abbaubaren Arzneimitteln eine sogenannte „Pseudopersistenz“ bestehen (HERNANDO *et al.* 2006). Dies bedeutet, dass die Stoffe per se zwar nicht persistent sind, aber aufgrund der hohen Einsatzmenge kontinuierlich im Oberflächenwasser vorliegen. Betroffene aquatische Organismen sind daher chronisch oder sogar während ihres gesamten Lebens gegenüber in der Regel relativ niedrigen Konzentrationen von Arzneimitteln exponiert (FENT *et al.* 2006, CORCORAN *et al.* 2010). Die meisten Arzneimittel wirken auf spezifische molekulare Ziele im Menschen. Orthologe Strukturen dieser molekularen Ziele finden sich allerdings auch häufig in Nicht-Zielorganismen (GUNNARSSON *et al.* 2008, VERBRUGGEN *et al.* 2017). Hierdurch kann es in Nicht-Zielorganismen zu Effekten durch Arzneimittelrückstände kommen, welche sich auf ihren eigentlichen Wirkmechanismus zurückführen lassen (GUNNARSSON *et al.* 2008, CORCORAN *et al.* 2010, VERBRUGGEN *et al.* 2017). Zudem können Effekte, welche beim Menschen als „Nebenwirkungen“ gelten, auftreten.

Für Humanarzneimittel muss nach Richtlinie 2001/83/EG und dem Arzneimittelgesetz eine gestufte Umweltrisikobewertung durchgeführt werden (EU 2001, AMG 2005). Gesonderte Regelungen gelten hierbei für Präparate mit gentechnisch veränderten Organismen sowie radioaktive Präparate. Die Umweltbewertung kann jedoch nicht zu einer Versagung der Zulassung führen, sondern dient dazu, gegebenenfalls notwendige Sicherheitsmaßnahmen zu beschreiben. Keine Umweltrisikobewertung muss für Humanarzneimittel durchgeführt werden, welche vor 2006 in Verkehr gebracht wurden. Daher liegen für diese Altarzneimittel häufig nur eingeschränkte Informationen zu möglichen Auswirkungen auf die Umwelt vor.

### 1.7.1 Amitriptylin

Arzneimittel, deren Verschreibungsvolumen in den vergangenen Jahren kontinuierlich zugenommen haben, sind Antidepressiva (LALJI *et al.* 2021, SEIFERT *et al.* 2022). Antidepressiva sollen Verhaltensveränderungen im Menschen bewirken und bergen so auch das Risiko, das Verhalten von Nicht-Zielorganismen zu beeinflussen. Verhaltensveränderungen können dabei zu populationsrelevanten Auswirkungen führen, da beispielsweise das Flucht- oder Paarungs-

## Einleitung

verhalten verändert werden kann (SCOTT & SLOMAN 2004). In zwei Meta-Analysen zu insgesamt 87 beziehungsweise 210 neuroaktiven Wirkstoffen wurde das Antidepressivum Amitriptylin jeweils als einer von neun Wirkstoffen mit einem möglicherweise hohen Risiko für Wildfische hervorgehoben (DUARTE *et al.* 2022, SUMPTER & MARGIOTTA-CASALUCI 2022). Amitriptylin gehört zur Gruppe der trizyklischen Antidepressiva und wirkt über eine nichtselektive Inhibierung der Wiederaufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt (SEIFERT *et al.* 2022). Mit 82,7 Millionen verordneter definierter Tagesdosen (DDD) im Jahr 2021 ist Amitriptylin der meistverordnete Wirkstoff der Untergruppe der trizyklischen Antidepressiva in Deutschland (SEIFERT *et al.* 2022). Mit einer Tagesdosis von 75 mg Amitriptylin entspricht das einer Gesamtmenge von über 6 Tonnen Amitriptylin innerhalb eines Jahres in Deutschland (WHO COLLABORATING CENTRE FOR DRUG STATISTICS METHODOLOGY 2023).

Rückstände von Amitriptylin wurden weltweit in Abflüssen von Kläranlagen gemessen, wobei Konzentrationen bis zu  $374 \pm 44$  ng/L nachgewiesen wurden (z.B. BAKER & KASPRZYK-HORDERN 2013, DAVID *et al.* 2018, MA *et al.* 2018, PIVETTA *et al.* 2020). AMINOT *et al.* (2015) zeigten, dass Amitriptylin eine starke Sorption an Schwebstoffe aufweist. Auch in 23 % von 296 untersuchten Oberflächengewässern weltweit konnten Amitriptylinkonzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze gemessen werden (SUMPTER & MARGIOTTA-CASALUCI 2022). Die Konzentrationen befanden sich hierbei in der Regel im Bereich von wenigen Nanogramm pro Liter (LAJEUNESSE *et al.* 2008, KASPRZYK-HORDERN *et al.* 2009, VYSTAVNA *et al.* 2012, BAKER & KASPRZYK-HORDERN 2013, THOMAS *et al.* 2014, AMINOT *et al.* 2015, FERREY *et al.* 2015, WU *et al.* 2017b, MA *et al.* 2018, XIANG *et al.* 2018). Vereinzelt wurden allerdings auch höhere Konzentrationen gemessen: So haben BAKER & KASPRZYK-HORDERN (2013) 71 ng/L Amitriptylin in einem englischen Fluss und PIVETTA *et al.* (2020) 196 ng/L Amitriptylin in dem brasilianischen Fluss Atibaia nachgewiesen. In einem, bekannterweise durch die Arzneimittelindustrie verschmutzten Grundwasserbrunnen, wurde in Tschechien 7,46 µg/L Amitriptylin detektiert (LHOTSKÝ *et al.* 2017). Spuren des Antidepressivums wurden auch im Grundwasser in China (XIANG *et al.* 2018) und selbst in einer Trinkwasserprobe in Frankreich gefunden (TOGOLA & BUDZINSKI 2008). Der Abbau von Amitriptylin durch Hydrolyse und Biodegradation in der Umwelt bei pH 7 ist gering, während bei geringem oder hohem pH das Antidepressivum durch Photolyse degradiert werden kann (BAENA-NOGUERAS *et al.* 2017).

Eine Exposition mit Amitriptylin kann bei Zebraabärblingen (*Danio rerio*) Neurotransmitter wie Serotonin, Noradrenalin, Dopamin und Acetylcholin (ACh) beeinflussen (DEMINE *et al.* 2017, MESHALKINA *et al.* 2018, DEMINE *et al.* 2020, LI *et al.* 2022, QIU *et al.* 2022). Zudem kann sich eine Exposition gegenüber Amitriptylin auf die Aktivität der Acetylcholinesterase (AChE) bei Zebraabärblingen auswirken (KARASAKAL *et al.* 2020, SANTOS *et al.* 2024). Das Antidepressivum kann zu Verhaltensveränderungen bei Fischen, wie beispielsweise einer verminderten Aktivität, aber

auch einer verstärkten Erkundung einer ungewohnten Umgebung („novel tank test“) oder einer verminderten Schockstarre führen (MESHALKINA *et al.* 2018, HUANG *et al.* 2019, SEHONOVA *et al.* 2019a, DEMIN *et al.* 2020, LI *et al.* 2022, QIU *et al.* 2022, ZHANG *et al.* 2023). Bei Fischen wurden neben Effekten auf das Verhalten Auswirkungen von Amitriptylin auf das Immunsystem (YANG *et al.* 2014, QIU *et al.* 2017) sowie genotoxische Effekte beschrieben (SANTOS *et al.* 2024). Zudem kann Amitriptylin oxidativen Stress bei Fischen verursachen und die lysosomale Membranstabilität negativ beeinflussen (YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2017, SEHONOVA *et al.* 2019b, KARASAKAL *et al.* 2020, BLANCO-RAYÓN *et al.* 2021, ZHANG *et al.* 2023). Auch die Embryonalentwicklung von Fischen kann durch Amitriptylin gestört werden (YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2017, SEHONOVA *et al.* 2019a, SANTOS *et al.* 2024) und selbst transgenerationale Effekte sind für das Antidepressivum beschrieben (LIU *et al.* 2024).

### 1.8 Das Projekt MiWa und die vorliegende Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist Teil des durch das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Verbundprojektes „MiWa – Mikroplastik im Wasserkreislauf“ (Förderkennzeichen 02WRS1378, Laufzeit: 03.2016-08.2019). In dem interdisziplinären Forschungsprojekt wurden durch elf Projektpartner (Technische Universität Berlin, Bundesanstalt für Materialforschung, Berliner Wasserbetriebe, Goethe Universität Frankfurt, Helmholtz Zentrum für Umweltforschung, Hochschule Fresenius, Technische Universität München, Technologiezentrum Wasser, Umweltbundesamt, Universität Heidelberg und Eberhard Karls Universität Tübingen) grundlegende Fragestellungen zur Analytik und Wirkungen von MP sowie die Interaktionen von MP mit anderen Umweltschadstoffen untersucht. Zum einen wurden Methoden zur Probenahme, Probenaufbereitung und verschiedenen Detektionsverfahren zur Charakterisierung und Quantifizierung weiterentwickelt und verglichen. Zum anderen wurden toxikologische und ökotoxikologische Auswirkungen von MP in verschiedenen Testsystemen mit Organismen unterschiedlicher Trophiestufen sowie in menschlichen Modellzellen untersucht. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen von Polystyrol (PS)-MP (< 50 µm) als isolierter Stressor sowie bei Co-Exposition mit dem Antidepressivum Amitriptylin und dem Pestizid Methiocarb auf verschiedene Lebensstadien der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*). Effekte von Amitriptylin und Methiocarb wurden jeweils auch isoliert betrachtet. Untersuchte Endpunkte umfassten dabei Entwicklungsparameter, Biomarker zu proteotoxischem und oxidativem Stress, Auswirkungen auf den Gewebezustand sowie Neurotoxizität und Verhalten.

## 2 Untersuchte Fragestellungen und übergeordnete Hypothesen

In der vorliegenden Arbeit sollen mit Untersuchungsmethoden auf verschiedenen biologischen Ebenen folgende Fragestellungen und übergeordnete Hypothesen beantwortet werden:

I. Hat Polystyrol-Mikroplastik negative Effekte auf Bachforellen unterschiedlicher Lebensstadien? In welchem Konzentrationsbereich treten diese Effekte auf?

Hypothese 1: PS-MP beeinträchtigt die Entwicklung von Bachforellen.

Hypothese 2: PS-MP verändert das Verhalten von Bachforellen.

Hypothese 3: Molekulare Biomarker sowie der Gewebezustand der Leber und Kieme von Bachforellen werden negativ durch PS-MP beeinflusst.

Hypothese 4: Höhere Konzentrationen PS-MP haben stärkere Effekte auf Bachforellen als niedrigere Konzentrationen.

II. Beeinflusst die als Wirkkonzentration bei anderen Fischarten bekannte Konzentration von 1 mg/L Methiocarb die Gesundheit juveniler Bachforellen?

Hypothese 5: Methiocarb hat negative Effekte auf molekulare Biomarker sowie den Gewebezustand der Leber und Kieme von Bachforellen.

III. Beeinflusst das Antidepressivum Amitriptylin die Gesundheit von Bachforellen unterschiedlicher Lebensstadien? In welchem Konzentrationsbereich treten Wirkungen auf?

Hypothese 6: Amitriptylin beeinträchtigt die Entwicklung von Bachforellen.

Hypothese 7: Amitriptylin beeinflusst das Verhalten von Bachforellen.

Hypothese 8: Amitriptylin hat negative Effekte auf molekulare Biomarker der Bachforelle.

Hypothese 9: Höhere Konzentrationen Amitriptylin haben stärkere Effekte auf Bachforellen als niedrigere Konzentrationen.

## Untersuchte Fragestellungen und übergeordnete Hypothesen

- IV. Moduliert die Co-Exposition von Methiocarb beziehungsweise Amitriptylin mit Polystyrol-Mikroplastik die Wirkung des Pestizids beziehungsweise des Arzneimittels auf Bachforellen?

Hypothese 10: Die durch Methiocarb und Amitriptylin verursachten Effekte werden durch PS-MP verstärkt oder reduziert.

- V. Sind verschiedene Lebensstadien der Bachforelle unterschiedlich empfindlich gegenüber der Belastung mit Mikroplastik und Amitriptylin?

Hypothese 11: Das Chorion schützt Embryonen zu einem gewissen Grad vor Effekten durch PS-MP.

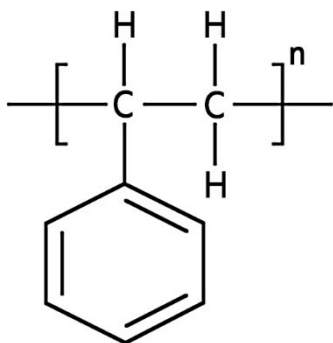
Hypothese 12: Nach dem Schlupf reagieren jüngere Lebensstadien der Bachforelle sensibler auf die Exposition gegenüber PS-MP und Amitriptylin als ältere Lebensstadien.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Testsubstanzen

#### 3.1.1 Polystyrol Mikroplastik

1839 beschrieb Eduard Simon in Berlin erstmalig die Polymerisation von Styrol zu PS (Abbildung 1), während die technische Herstellung durch die I. G. Farben erst im Jahr 1930 gelang (SCHEIRS 2003). PS gehört zu den amorphen Thermoplasten und zeichnet sich durch seine geringe spezifische Dichte und gute Transparenz aus (NIESSNER & GAUSEPOHL 2003, DOMININGHAUS 2012, KOLTZENBURG *et al.* 2014). Als amorphe Thermoplasten werden Kunststoffe bezeichnet, welche bis zur Zersetzungstemperatur nicht vernetzt sind und sich durch Aufschmelzen beliebig oft neu formen lassen (DOMININGHAUS 2012). Vorteile des PS sind, dass es beständig gegen Fette, Öle, Alkohole sowie Säuren und Basen ist. Das Polymer ist hingegen nicht witterungsbeständig und wird von Kohlenwasserstoffen, Halogenkohlenwasserstoffen, Estern und Ketonen angelöst (DOMININGHAUS 2012, KOLTZENBURG *et al.* 2014). Styrol wird aus den Primärchemikalien Benzol und Ethylen hergestellt, die aus Erdöl gewonnen werden (DOMININGHAUS 2012). Die Polymerisation von Styrol kann entweder thermisch oder initiiert durch freie Radikale erfolgen (NIESSNER & GAUSEPOHL 2003, KOLTZENBURG *et al.* 2014). Die Glasstemperatur von PS liegt bei 100 °C (NIESSNER & GAUSEPOHL 2003).



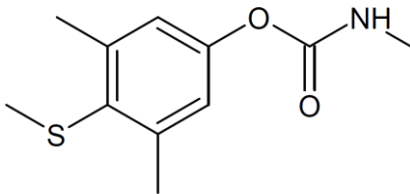
**Abbildung 1:** Strukturformel Polystyrol abgewandelt nach CHATTERJEE & PRASAD (2011).

Heutzutage ist PS ein vielfältig eingesetzter Kunststoff und wird unter anderem in der Elektroindustrie, im Haushalt, für Verpackungen und geschäumt als Wärme- und Schallschutz angewendet (KOLTZENBURG *et al.* 2014). Mit einer Produktion von circa 20,7 Millionen Tonnen im Jahr 2021 ist PS der siebthäufigste hergestellte Kunststoff weltweit (PLASTICS EUROPE 2022). Entsprechend wird PS auch als MP häufig in der Umwelt detektiert: Nach LI *et al.* (2020a) ist PS mit 13 % das dritthäufigste Polymer, welches in Süßwasserproben nachgewiesen wird.

In den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen wurde irregulär geformtes, fragmentiertes PS-MP verwendet, das nach der Methode von EITZEN *et al.* (2019) hergestellt wurde. Hierfür wurden an der TU Berlin transparente PS-Pellets (Polystyrol 158K, Dichte 1,05 g/mL; BASF, Ludwigshafen, Deutschland) kryogemahlen (CryoMill, Retsch, Haan, Deutschland) und in Reinstwasser suspendiert. Die Partikelsuspensionen wurden über Polyamidmikrosiebe gefiltert, um Partikelsuspensionen mit einer Partikelgröße < 50 µm zu erhalten. Die Partikelanzahl der Suspensionen wurde mit einem Partikelzähler (SVSS, PAMAS, Rutesheim, Deutschland) mittels Lichtextinktion in einem Laser-Dioden Sensor (Typ HCB-LD-50/50) bestimmt. Für die Versuche wurden von der TU Berlin Aliquote der Stammsuspension (56.240 Partikel/mL) mit definiertem Volumen für die Verwendung in den Versuchen bereitgestellt.

### 3.1.2 Methiocarb

Methiocarb (Mercaptodimethur;  $C_{11}H_{15}NO_2S$ ; 3,5-Dimethyl-4-(methylsulfanyl)phenyl-N-methylcarbamate; Abbildung 2) ist ein in den 1960er Jahren entwickeltes Carbamat-Pestizid (WORTHING *et al.* 1991).



**Abbildung 2:** Strukturformel Methiocarb (mit Genehmigung von S. HUPPERTSBERG).

Die Wirkung von Carbamat-Pestiziden wird hauptsächlich durch die reversible Inhibierung der AChE erzeugt (FUKUTO 1990, GUPTA 2014). AChE reguliert die Konzentration des Neurotransmitters ACh durch dessen Spaltung in Cholin und Essigsäure und wurde sowohl in Invertebraten als auch Vertebraten nachgewiesen (FUKUTO 1990). Durch die Carbamylierung der AChE kann ACh nicht mehr hydrolysiert werden und akkumuliert in den cholinergen Synapsen im zentralen und vegetativen Nervensystem wie auch an motorischen Endplatten. In Folge kommt es zu einer Überstimulierung der muskarinischen und nikotinischen ACh-Rezeptoren, was unter anderem zu Bradykardie, Krämpfen, Lähmung und schließlich zum Tod führen kann (FUKUTO 1990, GUPTA 2014). Bei Ratten wurde zudem gezeigt, dass Methiocarb oxidativen Stress in Form einer Reduktion der Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) und Katalase (CAT) sowie Lipidperoxidation (LPO) verursacht (OZDEN *et al.* 2009, OZDEN & ALPERTUNGA 2010). Neben diesen

Effekten gibt es Hinweise, dass Methiocarb endokrine Wirkungen hervorrufen kann (RAUN ANDERSEN *et al.* 2002, GEA *et al.* 2022).

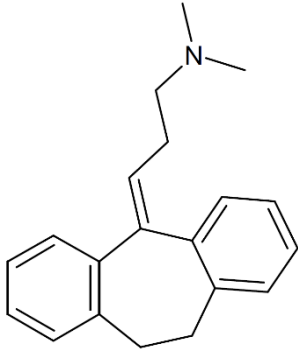
Methiocarb wird durch Oxidation oder Ester-Abspaltung metabolisiert. Cytochrom P450 (CYP) und flavinhaltige Monooxygenasen (FMO) verstoffwechseln das Pestizid zu Methiocarb-Sulfoxid (BURONFOSSE *et al.* 1995, USMANI *et al.* 2004, FURNES & SCHLENK 2005). Darüber hinaus können Methiocarb-Phenol, Methiocarb-Sulfon-Phenol, Methiocarb-Sulfoxid-Phenol sowie N-hydroxymethyl-Methiocarb Sulfoxid in Tieren und Pflanzen entstehen. In Wasser und Sediment wird Methiocarb innerhalb weniger Tage hauptsächlich zu Methiocarb-Sulfoxid oder Methiocarb-Phenol degradiert (FAO 1999).

In der Europäischen Union (EU) wurde 2019 die Zulassung von Methiocarb als Wirkstoff nicht erneuert, nachdem ein unannehmbares Risiko für Arbeitnehmer sowie ein hohes Risiko für Vögel, Säuger und Regenwürmer festgestellt wurde (EU 2019). Die Nutzung als Molluskizid wurde bereits 2014 verboten (EU 2014). In den Vereinigten Staaten hingegen ist die Nutzung des Wirkstoffs unter Einschränkungen erlaubt (EPA 1994).

Methiocarb ist eine neutrale Verbindung mit einem Molekulargewicht von 225,3 g/mol und einem Oktanol-Wasser Koeffizienten ( $\log K_{ow}$ ) von 3,13 (JURADO *et al.* 2022). In dem in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuch wurde Methiocarb der Firma Sigma-Aldrich (CAS: 2032-65-7; Produktlinie; PESTANAL®; Reinheitsgrad: 99,8 %) mit 0,01 % Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel verwendet.

### 3.1.3 Amitriptylin

Das Antidepressivum Amitriptylin (Abbildung 3) wurde 1960 auf den Markt gebracht und wirkt als Noradrenalin/Serotonin-Verstärker (BREYER-PFAFF 2004, SEIFERT *et al.* 2022). Noradrenalin/Serotonin-Verstärker inhibieren die Wiederaufnahme von Monoaminen aus dem synaptischen Spalt. Nach ihrer Selektivität unterscheidet man selektive Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren (SSRI), Serotonin-Noradrenalin-Rückaufnahme Inhibitoren (SNRI) sowie nichtselektiven Monoamin-Rückaufnahme-Inhibitoren (NSMRI; SEIFERT *et al.* 2022). Alternativ werden NSMRI, zu welchen auch Amitriptylin zählt, nach ihrer Struktur als trizyklische Antidepressiva bezeichnet (SEIFERT *et al.* 2022).



**Abbildung 3:** Strukturformel Amitriptylin (mit Genehmigung von S. HUPPERTSBERG).

Amitriptylin hemmt sowohl die Wiederaufnahme von Serotonin als auch Noradrenalin und zu einem geringen Ausmaß Dopamin an der präsynaptischen Membran (TATSUMI *et al.* 1997). Neben der Wirkung auf Serotonin und Noradrenalin bindet Amitriptylin auch an muskarinische ACh-Rezeptoren und kann anticholinerge Wirkungen hervorrufen (SNYDER & YAMAMURA 1977). Darüber hinaus interagiert Amitriptylin mit Histaminrezeptoren (NGUYEN *et al.* 2001). JANG *et al.* (2009) zeigten zudem, dass Amitriptylin als Rezeptoragonist der Tyrosinkinasen A und B fungiert und eine ausgeprägte neurotrophische Aktivität aufweist. Die Wirkung von Noradrenalin/Serotonin-Verstärkern gegen Depressionen ist noch nicht vollständig geklärt (SEIFERT *et al.* 2022). Während der Effekt auf die Monoamine Noradrenalin und Serotonin innerhalb weniger Stunden beobachtet werden kann, tritt die therapeutische Wirkung zeitversetzt oftmals erst nach Tagen oder Wochen auf (HARMER *et al.* 2017). Es wird davon ausgegangen, dass die antidepressive Wirkung auf komplexen Mechanismen beruht und womöglich durch eine Änderung der Neurochemie oder einer Beeinflussung der Neuroplastizität hervorgerufen wird (HARMER *et al.* 2017, SEIFERT *et al.* 2022).

Amitriptylin ist einer der effizientesten Wirkstoffe gegen Depressionen, wobei jedoch im Vergleich zu den selektiveren Wirkstoffen vermehrt Nebenwirkungen auftreten (BARBUI & HOTOPF 2001, HARMER *et al.* 2017). So kann Amitriptylin beispielsweise anticholinerge Nebenwirkungen hervorrufen wie Schluckstörungen, Tachyarrhythmie und Verwirrtheit bis hin zum Delir (MINTZER & BURNS 2000). Neben der Anwendung als Antidepressivum wird Amitriptylin auch zur Migräneprophylaxe (COUCH & GROUP 2011), zur Behandlung von neuropathischen Schmerzen (MOORE *et al.* 2015) sowie in niedriger Dosierung gegen Schlafstörungen eingesetzt (BAKKER *et al.* 2023).

Amitriptylin wird in der Phase 1 der Biotransformation durch CYP metabolisiert, wobei insbesondere CYP2D6 eine wichtige Rolle spielt (BREYER-PFAFF 2004). ZIARRUSTA *et al.* (2017) konnten in Goldbrassen (*Sparus aurata*) 33 Transformationsprodukte von Amitriptylin vor allem in der Leber, Galle und im Plasma identifizieren. Sowohl im Menschen als auch in Fischen entsteht durch N-Demethylierung von Amitriptylin das selbst als Antidepressivum wirksame Nortriptylin

(BREYER-PFAFF 2004, ZIARRUSTA *et al.* 2017, DAVID *et al.* 2018). Amitriptylin kann in verschiedenen Organen von Fischen mit Biokonzentrationsfaktoren zwischen 4 bis 198 bioakkumulieren, wobei die höchsten Konzentrationen in Gehirn, Kieme, Leber und Blutplasma festgestellt wurden (LAJEUNESSE *et al.* 2011, MUIR *et al.* 2017, ZIARRUSTA *et al.* 2017).

Das Molekulargewicht von Amitriptylin ist 227,4 g/mol, der Log<sub>KOW</sub> des Arzneistoffes beträgt 4,91 und der pK<sub>s</sub> Wert 9,49 (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION 2023). Für die nachfolgenden Experimente wurde Amitriptylin Hydrochlorid von Sigma Aldrich bezogen (CAS: 549-18-8; C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N · HCl; Reinheitsgrad > 98 %; Lot: BCBV1175). Alle angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Reinsubstanz Amitriptylin.

### 3.2 Testorganismus Bachforelle

Die zu den Salmoniden gehörende europäische Forelle (*Salmo trutta*, L. 1758) war ursprünglich in Europa, Nordafrika und im westlichen Asien heimisch, wurde aber in zahlreiche Länder außerhalb ihres natürlichen Verbreitungsgebiets eingebracht (MACCRIMMON *et al.* 1970). Durch ihre Bedeutung als Speise- und Angelfisch ist ihr Vorkommen stark von Besitzmaßnahmen geprägt (DUBLING & BERG 2001, KLEMETSEN *et al.* 2003). Es wird zwischen der anadromen Meerforelle (*Salmo trutta* f. *trutta*), der vorwiegend in Stillgewässern lebenden Seeforelle (*Salmo trutta* f. *lacustris*) und der in Fließgewässern lebenden Bachforelle (*Salmo trutta* f. *fario*) unterschieden (PAKKASMAA 2001). Die in den durchgeführten Experimenten untersuchte Bachforelle zeichnet sich durch einen langgestreckten Körper, eine graugrüne bis bräunliche Färbung an den Flanken und eine weißliche Bauchseite sowie schwarze und charakteristische rote, hell umrandete Punkte aus (DUBLING & BERG 2001, PAKKASMAA & PIIRONEN 2001, HAUER 2007). Die Durchschnittslänge der Bachforelle beträgt 25-35 cm, wobei die Fische auch eine Größe von deutlich über 50 cm erreichen können (DUBLING & BERG 2001, HAUER 2007). Bachforellen bevorzugen strukturreiche, sauerstoffreiche und sommerkühle Fließgewässer (DUBLING & BERG 2001, HAUER 2007).

Die iteroparen Bachforellen werden im Alter von 1 bis 10 Jahren geschlechtsreif (KLEMETSEN *et al.* 2003, BERG & FLEMING 2018). Die Eier werden im Herbst oder Winter in Laichgruben in kiesigem Substrat abgelegt und nach der Befruchtung mit Kies bedeckt (KLEMETSEN *et al.* 2003, HAUER 2007). Die Entwicklung ist stark temperaturabhängig und dauert zwischen einem bis mehreren Monaten (KILLEEN *et al.* 1999, KLEMETSEN *et al.* 2003). Die Arbeit von KILLEEN *et al.* (1999) beschreibt ausführlich die Entwicklung von *Salmo trutta* von der Befruchtung des Eis bis zur Aufzehrung des Dottersacks. Wenn der Dottersack zum Großteil aufgebraucht ist, schwimmen die Jungfische aus dem Kieslückensystem auf und beginnen exogene Nahrung aufzunehmen (KLEMETSEN *et al.* 2003, HAUER 2007, BERG & FLEMING 2018). Als opportunistische Karnivore haben Bachforellen eine

wichtige ökologische Rolle als Raubfisch: Während die Nahrung von kleineren Individuen vorwiegend aus Wirbellosen insbesondere Insektenlarven besteht, ernähren sich größere Bachforellen räuberisch von Klein- und Jungfischen (DUBLING & BERG 2001, KLEMETSEN *et al.* 2003, BERG & FLEMING 2018).

Die für die Experimente verwendeten Tiere stammen aus der Forellenzucht Lohmühle in Alpirsbach (Am Lohmühlebach 85, 72275 Alpirsbach-Ehlenbogen, Deutschland). Für den Embryotest mit PS-MP wurden Eier direkt am Tag der Befruchtung in die Versuche eingesetzt, für das Experiment mit Amitriptylin und MP wurden Eier im Augenpunktstadium (47 Tage nach der Befruchtung) verwendet. Die juvenilen Bachforellen wurden mindestens eine Woche an die Laborbedingungen adaptiert und waren circa 7 Monate (Experiment mit Amitriptylin), 9 Monate (Experiment mit Amitriptylin und MP) oder 11 Monate (Experiment mit MP und Methiocarb) alt. Die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Tübingen hat die durchgeführten Tierversuche genehmigt (ZO 2/16).

### 3.3 Durchgeführte Versuche

Folgende Versuche mit verschiedenen Lebensstadien von Bachforellen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt:

Versuch 1 – 1. Teil: Start 07.12.2016 – Ende: 05.05.2017 (Dauer 150 Tage); Bachforelleneier wurden vom Tag der Fertilisation bis zur Aufzehrung des Dottersacks gegenüber PS-MP exponiert.

Versuch 1 – 2. Teil: Start: 05.05.2017 – Ende: 06.06.2017 (Dauer 33 Tage); Bachforellenlarven wurden nach Aufzehrung des Dottersacks für einen weiteren Monat gegenüber PS-MP exponiert.

Versuch 2: Start: 18.10.2017 – Ende: 23.10.2017 (Dauer 96 h); juvenile Bachforellen (11 Monate) wurden für 96 h gegenüber PS-MP und Methiocarb exponiert.

Versuch 3: Start: 29.12.2017 – Ende: 26/27.02.2018 (Dauer 59/60 Tage); Bachforelleneier wurden ab dem Augenpunktstadium bis zu einer Woche nach Aufzehrung des Dottersacks gegenüber PS-MP und Amitriptylin exponiert.

Versuch 4: Start: 31.07.2018 – Ende: 21.8.2018/22.8.2018 (Dauer 21/22 Tage); Juvenile Bachforellen (7 Monate) wurden gegenüber Amitriptylin exponiert.

Versuch 5: Start: 27.09.2018 – Ende: 18/19.10.2018 (Dauer 21/22 Tage) Juvenile Bachforellen (9 Monate) wurden gegenüber Amitriptylin und PS-MP exponiert.

In allen Versuchen wurden die Versuchsgruppen in einem randomisierten semi-statischen Blockdesign in Triplikaten getestet. Eine Ausnahme bildet Versuch 2, der in einem randomisierten statischen Blockdesign durchgeführt wurde. Alle Experimente fanden in einer thermokonstanten Klimakammer bei 7 °C (Auf der Morgenstelle 28, 72076 Tübingen) mit einem Licht/Dunkel Rhythmus von 10/14 h statt. Zur Reduktion des Stresses für die Tiere wurden die Petrischalen beziehungsweise Aquarien abgedeckt, um direkte Lichteinstrahlung von oben zu verhindern. Um Partikelkontaminationen zu vermeiden, wurden die Aquarien über mit Silikonschläuchen an Druckluft angeschlossene Glaspipetten belüftet. Bei den Probenahmen wurden die Forellen mit einer Überdosis von 1 g/L MS222 (pH 7, gepuffert durch NaHCO<sub>3</sub>) betäubt und getötet. Der Tod der Tiere wurde durch Durchtrennen der Wirbelsäule (Genickschnitt) finalisiert. Länge und Gewicht der Fische sowie sonstige Auffälligkeiten wurden bei der Probenahme notiert.

### 3.3.1 Exposition von Bachforelleneiern und -larven (Versuche 1 und 3)

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die durchgeführten Versuche mit Bachforelleneiern und -larven. Die Durchführung des ersten Teils des Versuchs 1 orientierte sich an OECD 212 (OECD 1998). Je 30 Bachforelleneier wurden ab dem Tag ihrer Fertilisation in 200 mL Testmedium in Glaspetrischalen gegenüber 10<sup>0</sup>, 10<sup>4</sup> und 10<sup>5</sup> Partikel/L PS-MP exponiert. Die Partikelsuspensionen wurden aus Stammsuspensionen mit einer definierten Partikelanzahl (56.240 Partikel/mL) mit belüftetem, vortemperiertem Kunstwasser (siehe Anhang) hergestellt. Ab Tag 138 nach der Befruchtung (dpf) wurden zur Herstellung der Suspensionen belüftetes, vortemperiertes und gefiltertes Leitungswasser (Eisenfilter, Aktivkohlefilter, Partikelfilter, Filwatec, Bad Liebenzell, Deutschland) verwendet. Um den Verlust von MP zu vermeiden, wurde jedes Gefäß viermal gespült. Auf eine Belüftung der Petrischalen wurde verzichtet, da Bachforelleneier zwischen der Fertilisation und dem Erreichen des Augenpunktstadiums sehr empfindlich auf mechanische Störungen reagieren (CRISP 1996). Zur Sicherstellung einer guten Wasserqualität wurden jeden zweiten Tag 50-100 mL der Testmedien ausgetauscht und Eihüllen sowie verstorbene Tiere täglich entfernt. Auf Grund der Lichtempfindlichkeit früher Entwicklungsstadien von Forellen wurden bis zum Erreichen des Augenpunktstadiums die Petrischalen komplett abgedunkelt (HAMDORF 1960). Im ersten Teil des Versuchs 1 wurde die Zeit bis zum Erreichen des Augenpunktstadiums, die Zeit bis zum Schlupf der Tiere, die Herzschlagrate sowie auftretende Mortalität (ohne Berücksichtigung nicht befruchteter Eier) untersucht. Die Herzschlagrate wurde 93 dpf in der Entwicklungsphase der Flossenbildung und Dottersackresorption (Schritt 38/39 nach KILLEEN *et al.* (1999)) bestimmt. Hierzu wurden je fünf Tiere pro Replikat in eine Petrischale mit dem entsprechenden Testmedium überführt und der Herzschlag der Tiere für 20 s gezählt. Um einen Temperatureffekt ausschließen zu können, wurde die

## Material und Methoden

Temperatur in den Petrischalen bestimmt. Anschließend wurden die Tiere wieder in den Versuch zurückgesetzt. Nach 150 Tagen hatten die Bachforellen den Dottersack aufgezehrt und es wurden 10 Tiere pro Versuchsgruppe beprobt. Zur Messung der LPO wurden die Köpfe der Larven unmittelbar bei der Probenahme in flüssigem Stickstoff fixiert und anschließend bei -80 °C gelagert. Die übrigen Tiere wurden für Teil 2 des Versuchs 1 in belüftete Glasaquarien mit 5 L des entsprechenden Testmediums umgesetzt. Die Tiere wurden täglich mit Forellenfutter (0,5 mm, Biomar, Brande, Dänemark) gefüttert. Die Futtermenge betrug circa 3 % des Körpergewichts und wurde dem Wachstum der Tiere entsprechend angepasst. Zweimal wöchentlich wurde ein 50 % Wasserwechsel durchgeführt und Futterreste sowie Faeces entfernt. 177 dpf und am Ende des zweiten Teils von Versuch 1 wurden die Wasserparameter (Temperatur, Sauerstoffgehalt, Leitfähigkeit und pH) gemessen. 182 dpf wurden die restlichen Forellen beprobt und Proben zur Bestimmung des LPO-Levels (Köpfe) sowie der SOD-Aktivität (Muskulatur/Niere) in flüssigem Stickstoff fixiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

**Tabelle 1:** Übersicht über die Versuche mit Bachforelleneiern und -larven (Versuche 1 und 3).

	<b>Versuch 1 – Teil 1</b>	<b>Versuch 1 – Teil 2</b>	<b>Versuch 3</b>
<b>Beginn</b>	Innerhalb 24 h nach Fertilisation	Aufzehrung des Dottersacks (150 dpf)	Augenpunktstadium (47 dpf)
<b>Ende</b>	Aufzehrung des Dottersacks (150 dpf)	182 dpf	Eine Woche nach Aufzehrung des Dottersacks (107 dpf)
<b>Durchführung in</b>	Glaspetrischalen	Glasaquarien	Glasaquarien
<b>Versuchsgruppen</b>	Kontrolle, 100 Partikel/L PS-MP, 10 <sup>4</sup> Partikel/L PS-MP, 10 <sup>5</sup> Partikel/L PS-MP	Kontrolle, 100 Partikel/L PS-MP, 10 <sup>4</sup> Partikel/L PS-MP, 10 <sup>5</sup> Partikel/L PS-MP	Kontrolle, 10 <sup>5</sup> Partikel/L PS-MP, 10 <sup>6</sup> Partikel/L PS-MP, Amitriptylin, 10 <sup>5</sup> Partikel/L PS-MP + Amitriptylin, 10 <sup>6</sup> Partikel/L PS-MP + Amitriptylin
<b>LPO</b>	Kopf	Kopf	Kopf
<b>SOD</b>	Nicht analysiert	Muskulatur/Niere	Muskulatur/Niere
<b>AChE, CbE</b>	Nicht analysiert	Nicht analysiert	Muskulatur
<b>Verhalten</b>	Nicht analysiert	Nicht analysiert	Verhalten in Ruheposition (87 dpf) sowie Verhalten unter Stressbedingungen (107 dpf)

In Versuch 3 wurden je 30 Bachforelleneier im Augenpunktstadium (47 dpf) in belüfteten Glasaquarien mit 5 L Testmedium gegenüber einer Kontrolle, PS-MP (10<sup>5</sup> und 10<sup>6</sup> Partikel/L PS-MP), pulsweise Amitriptylin (nominal 300 µg/L) sowie den binären Mischungen (10<sup>5</sup> Partikel/L PS-MP + nominal 300 µg/L Amitriptylin und 10<sup>6</sup> Partikel/L PS-MP + nominal 300 µg/L Amitriptylin) exponiert. Für die Exposition wurde eine Amitriptylin Stammlösung mit 8,5 mg/L Amitriptylin Hydrochlorid in bidestilliertem Wasser angesetzt. Wie im zweiten Teil des Versuchs 1 wurden die Testmedien mit gefiltertem Leitungswasser hergestellt und die Bachforellen nach Aufzehrung des Dottersacks gefüttert. Wasserwechsel von 2,5 L des Testmediums wurden je nach Verfügbarkeit

der PS-MP Stammsuspensionen durchschnittlich einmal pro Woche durchgeführt. Temperatur, Sauerstoffgehalt, Leitfähigkeit und pH wurden bei Versuchsbeginn, 101 dpf und bei Versuchsende in allen Aquarien gemessen. Zusätzlich wurde außer bei Versuchsbeginn der Nitritgehalt in den Aquarien ermittelt. Neben der Mortalitätsrate wurde die Zeit bis zum Schlupf der Tiere und die Herzschlagrate, wie bei Versuch 1 beschrieben, 67 dpf bestimmt. Das Ruheverhalten der Bachforellen wurde 87 dpf notiert. Der Versuch wurde nach 60 Tagen, eine Woche nach Dottersackaufzehrung der Forellen, beendet. Bei Versuchsende wurde das Verhalten der Tiere unter Stressbedingungen aufgezeichnet. Proben zur Bestimmung des LPO-Gehalts (Köpfe), der SOD-Aktivität (Muskulatur/Niere) sowie zur Bestimmung der AChE- und Carboxylesterasen (CbE)-Aktivität (Muskulatur) wurden sofort in flüssigem Stickstoff fixiert und anschließend bei -80 °C gelagert. Um Verunreinigungen zu entfernen, wurden die Proben für die Analyse der SOD-Aktivität vor dem Einfrieren in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,4) gespült.

### 3.3.2 Exposition juveniler Bachforellen (Versuche 2, 4 und 5)

Vor Beginn der Experimente wurden die juvenilen Forellen für mindestens eine Woche an die Bedingungen in der Klimakammer in einem 250 L Aquarium akklimatisiert. Die Versuche wurden in Glasaquarien mit je 15 L Testmedium durchgeführt. Pro Aquarium wurden in allen drei Versuchen je 10 Tiere exponiert (30 Forellen pro Versuchsgruppe). Die jeweiligen Stammlösungen beziehungsweise Stammsuspensionen wurden mit belüftetem, vortemperiertem und gefiltertem Leitungswasser (Eisenfilter, Aktivkohlefilter, Partikelfilter, Filwatec, Bad Liebenzell, Deutschland) zu den in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen verdünnt. PS-MP Suspensionen wurden aus PS-MP Stammsuspensionen (56.240 Partikel/mL) hergestellt. Verwendete Gefäße wurden jeweils viermal gespült, um einen unvollständigen Transfer der Partikel zu vermeiden. Die Fische wurden täglich mit einer festgelegten Menge (4 % des Körpergewichts in Versuch 2, 3 % des Körpergewichts in Versuch 4 und 5) kommerziellen Forellenfutter (0,8 mm, Biomar, Brande, Dänemark) gefüttert. Zu Beginn und Ende der Versuche wurden Temperatur, pH, Sauerstoffgehalt, Leitfähigkeit und die Nitritkonzentration in den Becken gemessen. In Versuch 5 wurde zusätzlich die Gesamthärte bestimmt. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Versuche mit juvenilen Bachforellen.

In Versuch 2 wurden 11 Monate alte Bachforellen für 96 h gegenüber Methiocarb (1 mg/L) und PS-MP ( $10^4$  Partikel/L) sowie deren Mischung (1 mg/L Methiocarb +  $10^4$  Partikel/L PS-MP) für 96 h exponiert. Als Lösungsvermittler wurde 0,01 % Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Neben der Kontrollgruppe sowie der Lösungsmittelkontrolle wurden bei Versuchsende 30 Forellen aus einem 250 L Aquarium beprobt (Laborkontrolle), um mögliche Effekte durch das Versuchsdesign selbst ausschließen zu können. Zur Herstellung der Methiocarb Stammlösung wurden 15 mg Methiocarb

## Material und Methoden

in 1,5 mL DMSO gelöst, anschließend 1 L bidestilliertes Wasser hinzugegeben und die Lösung für 2 d gerührt. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsgruppen zu gewährleisten, wurde auch in der Versuchsgruppe mit ausschließlich PS-MP 0,01 % DMSO zugegeben. Nach 48 h sowie 72 h wurden jeweils 2,5 L aus den Aquarien entnommen, um Faeces und Futterreste zu entfernen. Nach 24 h wurden vier moribunde Forellen mit 1 g/L MS222 euthanasiert und die Wirbelsäule durchtrennt. Bei Versuchsende wurden Proben der Leber und Kieme der Forellen in 2 % Glutardialdehyd (gepuffert mit 0,1 M Dimethylarsinsäure-Natriumsalz, pH 7,6) fixiert und bei 4 °C gelagert. Proben zur Ermittlung des LPO-Gehalts (Gehirn), der Stressprotein-konzentration (Kieme), der SOD-Aktivität (Muskulatur/Niere) sowie der AChE- und CbE-Aktivität (Muskulatur) wurden sofort in flüssigem Stickstoff fixiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

**Tabelle 2:** Übersicht über Versuche mit juvenilen Bachforellen (Versuche 2, 4 und 5).

	<b>Versuch 2</b>	<b>Versuch 4</b>	<b>Versuch 5</b>
<b>Alter</b>	11 Monate	7 Monate	9 Monate
<b>Dauer</b>	96 h	21/22 Tage	21/22 Tage
<b>Versuchsgruppen</b>	Laborkontrolle, Kontrolle, Lösungsmittelkontrolle (0,01 % DMSO), 1 mg/L Methiocarb + 0,01 % DMSO, 10 <sup>4</sup> Partikel/L PS-MP + 0,01 % DMSO, 10 <sup>4</sup> Partikel/L PS-MP + 1 mg/L Methiocarb + 0,01 % DMSO	Kontrolle, 1 µg/L Amitriptylin, 10 µg/L Amitriptylin, 100 µg/L Amitriptylin, 300 µg/L Amitriptylin, 1000 µg/L Amitriptylin	Kontrolle, 100 µg/L Amitriptylin, 10 <sup>4</sup> Partikel/L PS-MP, 10 <sup>5</sup> Partikel/L PS-MP, 10 <sup>4</sup> Partikel/L PS-MP + 100 µg/L Amitriptylin, 10 <sup>5</sup> Partikel/L PS-MP + 100 µg/L Amitriptylin
<b>Histologie</b>	Leber und Kieme	Nicht analysiert	Nicht analysiert
<b>Stressproteine</b>	Kieme	Nicht analysiert	Nicht analysiert
<b>LPO</b>	Gehirn	Muskulatur	Muskulatur
<b>SOD</b>	Muskulatur/Niere	Muskulatur/Niere	Muskulatur/Niere
<b>Cortisol</b>	Nicht analysiert	Muskulatur/Niere	Muskulatur/Niere
<b>AChE, CbE</b>	Muskulatur	Muskulatur	Muskulatur
<b>Verhalten</b>	Nicht analysiert	Schwimmverhalten während des Versuchs, Verhalten unter Stressbedingungen	Schwimmverhalten während des Versuchs, Verhalten unter Stressbedingungen

In Versuch 4 und 5 wurden sieben beziehungsweise neun Monate alte Bachforellen für drei Wochen gegenüber Amitriptylin, PS-MP oder der Mischung von Amitriptylin und PS-MP exponiert. Neben einer Kontrollgruppe wurden in den Versuchen fünf Versuchsgruppen getestet (Versuchsgruppen Versuch 4: nominal 1, 10, 100, 300 und 1000 µg/L Amitriptylin). Die Amitriptylin Stammlösungen wurden direkt vor den Wasserwechseln vorbereitet. Für Versuch 4 wurden zwei Stammlösungen mit Amitriptylin hergestellt (Stammlösung 1: 100 mg/L Amitriptylin in 1 L bidestilliertem Wasser, Stammlösung 2: 10 mL Stammlösung 1 in 990 mL bidestilliertem Wasser). In den Versuchsgruppen mit nominal 300 µg/L und 1000 µg/L Amitriptylin traten schwerwiegende Effekte auf und die Fische mussten nach einer Woche beziehungsweise 24 h

euthanasiert werden. Auf Basis der in Versuch 4 gewonnenen Ergebnisse wurde für Versuch 5 eine nominale Konzentration von 100 µg/L Amitriptylin gewählt (Versuchsgruppen Versuch 5: nominal 100 µg/L Amitriptylin, 10<sup>4</sup> Partikel/L PS-MP, 10<sup>5</sup> Partikel/L PS-MP, 100 µg/L Amitriptylin + 10<sup>4</sup> Partikel/L PS-MP, 100 µg/L Amitriptylin + 10<sup>5</sup> Partikel/L PS-MP). Für Versuch 5 wurde eine Stammlösung mit 25 mg Amitriptylin in 1 L bidestilliertem Wasser hergestellt. Zur Sicherstellung der Wasserqualität wurde 50 % der Testmedien zweimal pro Woche ausgetauscht. Mortalität und auffälliges Verhalten wurden täglich notiert und tote Fische sofort aus den Aquarien entnommen. Zusätzlich wurden in Versuch 4 und 5 Fotos zur Analyse des Schwimmverhaltens während des Versuchs angefertigt. Bei der Probenahme wurden Proben zur Bestimmung des LPO-Gehalts (Muskulatur), des Cortisollevels (Muskulatur/Niere), der Aktivität der SOD (Muskulatur/Niere) sowie der AChE- und CbE-Aktivität (Muskulatur) unmittelbar in flüssigem Stickstoff fixiert und anschließend bei -80 °C gelagert. Vor dem Einfrieren wurden die Proben zur Analyse der SOD-Aktivität in PBS-Puffer (pH 7,4) gespült. Sowohl in Versuch 4 als auch in Versuch 5 wurden jeweils drei Forellen pro Becken einen weiteren Tag exponiert und nach der Videoaufzeichnung des Verhaltens beprobt.

### 3.4 Chemische Analysen

Die Bestimmung der Konzentration des Methiocarbs im Wasser wurde durch einen Projektpartner (Dr. Sven Huppertsberg, Hochschule Fresenius, Idstein) durchgeführt. 12 mL der Testmedien der einzelnen Aquarien wurden zu Beginn und Ende des Experiments entnommen und bei -20 °C bis zur Analyse eingefroren. Die Proben wurden einzeln mittels Hochleistungsflüssigchromatographie („High-performance liquid chromatography“ – HPLC; PerkinElmer Series 200 LC system, PerkinElmer, Waltham, USA) mit Umkehrphase und einem Gradienten aus Methanol und Wasser als Eluenten aufgetrennt. Die Analyten wurden durch eine Elektrospray-Ionisation (ESI) im Positiv-Modus ionisiert und mittels Quadrupol-linearer Ionenfallen Massenspektroskopie (QqLIT-MS; SCIEX QTRAP 3200, AB SCIEX, Darmstadt, Germany) analysiert. Die Proben wurden mit Spritzenfiltern (Carl Roth, SPARTAN®, regenerierte Cellulose, 0,2 µm) filtriert und 1:25 beziehungsweise 1:100 verdünnt. Die Bestimmungsgrenze („limit of quantification“ – LoQ) lag bei 0,250 µg/L Methiocarb.

Zur Bestimmung der Amitriptylinkonzentration im Wasser wurde in den Versuchen 3 bis 5 jeweils zu Beginn und Ende der Versuche sowie vor und nach einem Wasserwechsel Poolproben (4 mL je Aquarium; 12 mL Gesamtvolumen/Versuchsgruppe) der jeweiligen Versuchsgruppen genommen und bei -20 °C gelagert. Die Analyse der Amitriptylinkonzentration im Wasser wurde durch die Arbeitsgruppe Umweltanalytik der Universität Tübingen (Leitung Prof. Dr. Christian Zwiener) durchgeführt. Die Proben wurden unverdünnt oder in 50-facher Verdünnung gemessen.

Mittels HPLC (1260 Infinity HPLC, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit Umkehrphase und einem Gradienten aus Wasser und Acetonitril als Eluenten wurden die Analyten aufgetrennt und durch eine ESI im Positiv-Modus ionisiert. Die Amitriptylinkonzentration wurde in einem Triple-Quadropol-Massenspektrometer (QqQ-MS 6490, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) analysiert. Die Bestimmungsgrenze in Versuch 3 war 0,01 µg/L Amitriptylin und 0,1 µg/L Amitriptylin in Versuch 4 und 5.

## 3.5 Untersuchte Organe

### 3.5.1 Kopf/Gehirn

Im Kopf von echten Knochenfischen, den Teleostiern, sind mit den Nasengruben, den Augen, den Otolithen und dem Gleichgewichtssinn wichtige Sinnesorgane lokalisiert (ROBERTS *et al.* 1985). Durch das Maul wird Nahrung aufgenommen, selektiert und über den Ösophagus in den Magen transportiert. Zudem leitet das Fischmaul Wasser zur Atmung über die seitlich am Pharynx liegenden Kiemen (ROBERTS *et al.* 1985, EVANS *et al.* 2005). Das im Schädel gelegene Gehirn von Teleostiern besteht wie bei anderen Vertebraten aus dem Vorderhirn, dem Mittelhirn (Mesencephalon) und dem Rhombencephalon, wobei Größe und Form der Gehirnregionen speziesabhängig sind (SPEARE & FRASCA 2006, YAMAMOTO 2009). Das Vorderhirn lässt sich dabei in Telencephalon und Diencephalon unterteilen, während das Rhombencephalon aus Metencephalon und Myelencephalon besteht (TAKASHIMA & HIBIYA 1995, YAMAMOTO 2009). Neben dem Cerebrum besteht das Telencephalon aus dem Lobus olfactorius, welcher der Geruchswahrnehmung dient und über den Tractus olfactorius mit dem Bulbus olfactorius verbunden ist (SPEARE & FRASCA 2006). Im Diencephalon sind mit der Epiphyse und der durch den Hypothalamus gesteuerten Hypophyse wichtige Hormondrüsen lokalisiert (TAKASHIMA & HIBIYA 1995, SPEARE & FRASCA 2006). Die auffälligste Struktur des Mesencephalons ist das für visuelle Wahrnehmung zuständige Tectum opticum, während das Tegmentum den Boden des dritten Ventrikels bildet (SPEARE & FRASCA 2006). Die Hauptkomponente des Metencephalon ist das Cerebellum. Das Metencephalon dient der Bewegungskoordination. Zudem verarbeitet es akustische Reize sowie Informationen des Seitenlinienorgans (TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Den Übergang zum Rückenmark bildet das Myelencephalon mit der Medulla oblongata (SPEARE & FRASCA 2006).

### 3.5.2 Kieme

Die Fischkieme ist neben der Atmung auch für die Osmo-, Ionen- und pH-Regulation sowie für die Exkretion von Stickstoffabbauprodukten zuständig (ROBERTS *et al.* 1985, EVANS *et al.* 2005). Die paarige Kieme liegt am Pharynx und wird durch das Operculum geschützt (EVANS *et al.* 2005). Sie besteht aus fünf Kiemenbögen, wobei der fünfte Kiemenbogen keine respiratorische Funktion innehat (TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Von den vorderen vier Kiemenbögen gehen jeweils zwei Reihen durch Knorpelgewebe gestützte Primärfilamente (Hemibranchen) ab, welche zusammen eine Holobranche bilden (ROBERTS *et al.* 1985). Das Epithel der Primärlamellen enthält viele Schleim- und Chloridzellen (TAKASHIMA & HIBIYA 1995), die an der Basis der Sekundärlamellen liegen. Diese von den Primärfilamenten abgehenden Sekundärlamellen bestehen aus Pflaster- und Pfeilerzellen und vergrößern die Oberfläche der Kieme maßgeblich (ROBERTS *et al.* 1985). Zur Atmung wird bei Knochenfischen Wasser durch das Maul eingesaugt und durch die Kiemenbögen wieder nach außen gepresst (WEHNER & GEHRING 2007). Der Blutfluss in den Kiemen ist dabei dem Wasserfluss entgegengesetzt. Durch das Gegenstromprinzip wird die Effizienz des Gasaustauschs bedeutend erhöht (TAKASHIMA & HIBIYA 1995, WEHNER & GEHRING 2007).

### 3.5.3 Leber

Die retikulo-tubulär aufgebaute Leber der Bachforellen besteht hauptsächlich aus pyramidal oder polygonal geformten Hepatozyten, deren Basen eng mit Blutsinosen in Kontakt treten und deren apikale Bereiche die Gallenkanaliculi begrenzen (HAMPTON *et al.* 1985, ROCHA *et al.* 1994, TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Zudem finden sich teilweise melaninhaltige, interhepatozytische Makrophagen sowie auf Lipidspeicherung spezialisierte Ito-Zellen in der Leber (ROBERTS *et al.* 1985, ROCHA *et al.* 1994, TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Hepatozyten sind bedeutend für den Protein-, Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel und zuständig für die Metabolisierung von Schadstoffen (TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Der bedeutendste Speicherstoff in der Leber ist Glykogen. Zu einem geringeren Grad dienen auch Lipide als Speicher (HAMPTON *et al.* 1985, TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Durch die Produktion von Galle hat die Leber eine wichtige Rolle bei der Verdauung inne (TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Die Galle wird durch Hepatozyten in Gallenkanaliculi sekretiert. Die Galle kann dabei entweder in der Gallenblase gespeichert oder über Gallenkanäle in das Duodenum abgegeben werden (ROBERTS *et al.* 1985, TAKASHIMA & HIBIYA 1995).

### 3.5.4 Niere

Die Niere von Salmoniden liegt retroperitoneal, ventral der Wirbelsäule und unterteilt sich in die ineinander übergehende Kopf- und Rumpfniere (REIMSCHUESSEL & FERGUSON 2006). Die Kopfniere

hat dabei vorwiegend blutbildende Funktion und besteht daher vor allem aus hämatopoetischem Gewebe (ROBERTS *et al.* 1985, TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Im Gegensatz dazu dient die Rumpfniere hauptsächlich der Exkretion über Nephronen, welche in interstitielles hämatopoetisches Gewebe eingebettet sind (ROBERTS *et al.* 1985). Die Filtrierung des Primärharns findet an den Malpighi-Körperchen statt, welche jeweils aus einem von einer Bowmanschen Kapsel umschlossenen Glomerulus bestehen (TAKASHIMA & HIBIYA 1995). In den proximalen und distalen Abschnitten der Nierentubuli werden Elektrolyte und Proteine resorbiert und der Urin schließlich über Sammelkanäle und Ureter ausgeschieden (REIMSCHUESSEL & FERGUSON 2006, ROBERTS *et al.* 1985, TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Bei Süßwasserfischen hat die Exkretion von Wasser über die Niere eine herausragende Rolle, um das Elektrolytgleichgewicht aufrecht zu erhalten und das insbesondere über die Kiemen aufgenommene Wasser zu kompensieren (ROBERTS *et al.* 1985, TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Neben Blutbildung und Exkretion hat die Niere auch endokrine Funktionen (ROBERTS *et al.* 1985, BARTON 2002, REIMSCHUESSEL & FERGUSON 2006). Auffällig sind zudem die dunkel gefärbten Melanomakrophagenzentren, welche in der gesamten Niere auftreten, deren Funktion allerdings bislang noch nicht geklärt ist.

### 3.5.5 Muskulatur

Bei Teleostern wird morphologisch wie auch funktionell zwischen glatter Muskulatur, welche beispielsweise Blutgefäße umgibt und im Verdauungstrakt vorkommt, der quergestreiften Skelettmuskulatur und der Herzmuskulatur unterschieden (TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Im Gegensatz zur glatten Muskulatur, welche aus spindelförmigen Einzelzellen besteht, wird die Skelettmuskulatur durch vielkernige Syncytien gebildet (TAKASHIMA & HIBIYA 1995, WEHNER & GEHRING 2007). Aktin- und Myosinfilamente bilden Sarkomere, die als Streifen erkennbare funktionelle Grundeinheit der Myofibrillen. Eine Muskelfaser besteht wiederum aus von Sarkoplasma umgebenen Myofibrillen (WEHNER & GEHRING 2007). Typisch für Fische sind die S-förmigen ineinandergreifenden Muskelsegmente (Myomere), die eine geschmeidige, aufeinanderfolgende Kontraktion entlang des Körpers ermöglichen (ROBERTS *et al.* 1985, TAKASHIMA & HIBIYA 1995). Unterschieden wird dabei zudem in rote Muskulatur (*Muscularis lateralis superficialis*) und weiße Muskulatur (*Muscularis lateralis profundus*). Rote Muskulatur arbeitet im aeroben Bereich, kontrahiert sich langsam und ist bei langsameren Schwimgeschwindigkeiten aktiv. Weiße Muskulatur ist hingegen im anaeroben Bereich aktiv, schnell kontrahierend und bei Aktivitätshöhepunkten im Einsatz (ROBERTS *et al.* 1985, WEHNER & GEHRING 2007). Bei Salmoniden gibt es zudem Fasern, die funktionell zwischen roter und weißer Muskulatur liegen (ROBERTS *et al.* 1985).

## 3.6 Verhaltens- und Biomarkeruntersuchungen

### 3.6.1 Verhaltensuntersuchungen

Durch Schadstoffe verändertes Verhalten kann die Fitness und das Überleben von Fischen beeinflussen und somit populationsrelevante Auswirkungen haben (SCOTT & SLOMAN 2004, FORD *et al.* 2021). Dabei stellt das Verhalten eine Zwischenstufe zu Endpunkten, welche molekulare Prozesse abbilden, und der Mortalität der Tiere dar (SCOTT & SLOMAN 2004). Verhaltensparameter wurden in den drei Versuchen mit Amitriptylin untersucht.

#### 3.6.1.1 Verhalten während des Versuchs

42 Tage nach Beginn des 3. Versuchs wurde die Ruheposition der Bachforellenlarven (lateral liegend oder in ventraler Position) notiert. Zudem wurde in Versuch 4 und Versuch 5 untersucht, ob sich juvenilen Forellen in der oberen oder unteren Beckenhälfte aufhielten. Hierfür wurden täglich ab Tag 2 (Versuch 4) beziehungsweise ab Tag 6 (Versuch 5) Fotos von jedem Becken aufgenommen. Vor den Aufnahmen wurde die zur Abdunklung dienende Folie von den Becken entfernt und ein weißes Papier hinter die Becken gestellt, um den Kontrast zu erhöhen. Nachdem sich die Tiere für fünf Minuten an die Lichtbedingungen gewöhnen konnten, wurden die Becken dreimal im Abstand von jeweils 5 Minuten fotografiert. Die Aufnahmen fanden hierbei immer zu einer ähnlichen Tageszeit (zwischen 13-16 Uhr) statt. Für jedes Bild wurde die Anzahl der Tiere in der oberen und unteren Aquariumshälfte bestimmt und anschließend für jedes Becken Tagesmittelwerte gebildet.

#### 3.6.1.2 Videoaufzeichnungen bei Versuchsende

Am Ende der Versuche wurde das Verhalten der Tiere unter Stressbedingungen (helle Beleuchtung und geringer Wasserstand, keine Belüftung der Becken) analysiert. Hierzu wurden jeweils drei juvenile Bachforellen oder fünf Larven in Aquarien (17,0 cm × 17,0 cm × 8,5 cm) mit einem Liter beziehungsweise 500 mL des entsprechenden Testmediums gesetzt. Es wurden jeweils vier Aquarien auf einer weißen Plexiglasplatte positioniert und zusammen mit weißen PS-Platten umschlossen. Durch vier Lampen (2700 K, je 1521 lm), welche auf die Deckenplatte ausgerichtet waren, wurde eine helle indirekte Beleuchtung der Becken gewährleistet. Jedes Aquarium wurde einzeln mit einer 32 cm über der Wasseroberfläche fixierten Kamera (Basler acA 1300-60 gm, 1,3-megapixel, Basler AG, Ahrensburg, Germany, Linse: 4,5-12,5 mm; 1:1,2; IR 1/2") gefilmt. Dabei fand die Aufnahme der jeweils vier Becken gleichzeitig statt. In jedem Durchlauf wurde eine Kontrollgruppe mitgefilmt, um eine Vergleichbarkeit der Durchläufe zu gewährleisten. Für die Auswertung wurde nur der erste Durchlauf jedes Kontrollbeckens

berücksichtigt. Die Tiere wurden insgesamt für 20 min gefilmt, wobei die ersten 2 min der Akklimatisation dienten und nicht ausgewertet wurden. Die Bachforellen wurden direkt nach den Videoaufnahmen wie unter Kapitel 3.3 beschrieben getötet und beprobt. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm EthoVision 12XT (Noldus Information Technology bv, Wageningen, Niederlande) analysiert. In dem Programm wird das Schwimmverhalten jeden Tieres individuell verfolgt. Die Ergebnisse des Programms wurden manuell überprüft und Fehler wie beispielsweise das Verwechseln von Individuen korrigiert. Untersuchte Endpunkte waren die gesamte zurückgelegte Distanz, die mittlere Schwimgeschwindigkeit sowie die Zeit, in welcher die Tiere inaktiv waren. Für die Bachforellenlarven wurde zudem als Parameter für das Schwarmverhalten die Zeit bestimmt, in welcher sie Körperkontakt zu einem anderen Fisch hatten.

### 3.6.2 Nachweis histopathologischer Veränderungen

Als struktureller Biomarker wurden histopathologische Veränderungen in der Leber und Kieme juveniler Bachforellen untersucht. Gewebsveränderungen erlauben eine Analyse der Auswirkungen von Chemikalien oder Partikeln auf der Zell- und Organebene (SCHWAIGER *et al.* 1997). Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung folgt dabei einer Sättigungskinetik: Ausgehend von einem intakten Gewebezustand nehmen die Zellschäden immer weiter zu bis hin zur Destruktion (KÖHLER & TRIEBSKORN 2004).

Kiemen- und Leberproben für die histopathologische Untersuchung wurden bei der Probenahme so schnell wie möglich in 2 % Glutardialdehyd (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gepuffert mit einem Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Puffer (0,1 M, pH 7,6; AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland) überführt und für mindestens vier Wochen bei 4 °C fixiert. Alle Proben wurden dreimal je 10 min mit Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Puffer und dreimal für je 15 min in 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (siehe Anhang). Die Kiemenproben wurden vor der Entwässerung zunächst für 30 min und anschließend über Nacht in einer Mischung von 1:2 Ameisensäure und 70 % Ethanol dekalzifiziert. Nach der Entwässerung wurden die Leber- und Kiemenproben in einem Gewebeeinfiltrationsautomaten (TP 1020, Leica, Wetzlar, Deutschland) mit Paraffin (Parablast, Leica, Wetzlar, Deutschland) infiltriert (Protokoll siehe Anhang) und anschließend in Paraffinblöcke gegossen. An einem Schlittenmikrotom (Leica SM 2000 R, Wetzlar, Deutschland) wurden 3 µm dicke Schnitte hergestellt, wobei je Probe zwei Objektträger für die verschiedenen Färbungen sowie ein Objektträger als Reserve angefertigt wurden. Anschließend wurden die Schnitte in einem Färbeautomaten (Varistain 24-4, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) oder Alcianblau, Periodsäure und Schiffsreagenz (PAS-Alcianblau Färbung) gefärbt (Protokolle siehe Anhang). Durch die HE-Färbung wird eine präzise

## Material und Methoden

Differenzierung der Zellgrenzen sowie der Nuclei möglich. Das basische Hämatoxylin färbt den Nucleus und basophile Gewebekomponenten blau. Das saure Eosin färbt hingegen acidophile Komponenten rosa bis rot. So erscheinen das Zytoplasma, Muskelzellen und Bindegewebe rosa bis pink. Durch die PAS-Alcianblau Färbung kann man den Glykogengehalt in der Leber beurteilen sowie unterschiedliche Arten von Schleimzellen unterscheiden. Durch die Färbung erscheinen saure Mucopolysaccharide blau, neutrale Mucopolysaccharide sowie Glykogen rot bis violett (RIEDELSCHEIMER & BÜCHL-ZIMMERMANN 2015). Nach erster qualitativer Durchsicht der Schnitte fand die Auswertung verblindet und randomisiert mittels Lichtmikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) statt. Der histopathologische Zustand der Proben wurde dabei zunächst qualitativ beschrieben und nachfolgend semi-quantitativ bewertet. Zur semi-quantitativen Auswertung wurde der Zustand der Organe nach TRIEBSKORN *et al.* (2008) in fünf Klassen unterteilt (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Definition der verwendeten Kategorien zur semi-quantitativen Bewertung der Gewebeintegrität.

<b>Kategorie</b>	<b>Kieme</b>	<b>Leber</b>
<b>Kategorie 1 Kontrollzustand</b>	Klar strukturierte Primärfilamente und Sekundärlamellen Flache Epithel- und Pfeilerzellen umgeben die Blutkanäle Chloridzellen treten an der Basis der Sekundärlamellen auf Geringgradige Anzahl von Schleimzellen	Helles und eosinpositives Zytoplasma Gleichmäßig geformte Hepatozyten Runde Nuclei
<b>Kategorie 2 Geringgradige Reaktion</b>	< 20 % Ablösung des Epithels Geringgradige Hypertrophie der Chlorid- und/oder Schleimzellen Geringgradige Hyperplasie der Pflasterzellen	Erhöhte Anzahl an Makrophagen
<b>Kategorie 3 Reaktion</b>	20-50 % Ablösung des Epithels Geringgradige Hyperplasie der Epithelzellen Geringgradige Entzündungen Geringgradige Verschmelzung der Sekundärlamellen	Geringgradige Entzündungen Reduzierter Glykogengehalt Vakuolisierung des Zytoplasmas
<b>Kategorie 4 Hochgradige Reaktion</b>	< 20 % Nekrose Hochgradige Verschmelzung der Sekundärlamellen (verursacht durch Hyperplasie der Epithelzellen) > 50 % Ablösung des Epithels Hochgradige Hypertrophie der Chlorid- und/oder Schleimzellen	< 5% Nekrose Hochgradige Entzündungen Stark dilatierte Gallenkanaliculi Stark dilatierte Blutgefäße
<b>Kategorie 5 Destruktion</b>	> 20 % Nekrose	> 5 % Nekrose Karyopyknose oder Karyolyse

### 3.6.3 Untersuchungen des Stressproteinlevels (Hsp70)

Stressproteine, nach ihrer Entdeckung auch Hitzeschockproteine (Hsp) genannt, sind molekulare Chaperone, die an zentralen Zellprozessen beteiligt sind (SØRENSEN *et al.* 2003, KÖHLER 2009). Stressproteine sind phylogenetisch sehr konserviert und in zahlreichen Taxa nachgewiesen (SANDERS 1993). Nach ihrem molekularen Gewicht werden Stressproteine in verschiedene Proteinfamilien unterteilt. So werden beispielsweise die 70 kDa schwere Hsp in der strukturell sehr konservierten Hsp70 Familie zusammengefasst (SANDERS 1993, KÖHLER 2009). Hsp70 sind am Transport und der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt. Zudem können Hsp70 die Funktion beschädigter Proteine wiederherstellen oder zum Abbau degenerierter Proteine beitragen (SANDERS 1993, SØRENSEN *et al.* 2003). An Hsp70 sind Hitzeschockfaktoren (Hsf) gebunden. Un- oder fehlgefaltete Proteine konkurrieren mit Hsf um diese Bindungsstelle der Stressproteine. Je höher die Konzentration der un- oder fehlgefalteten Proteine ist, desto mehr Hsf werden freigesetzt. Freigesetzte Hsf trimerisieren und phosphorylieren und können in dieser Form an die *hse* (heat shock element) -Sequenz der DNS binden. Durch diese Bindung wird die Transkription der *hsp70* Strukturgene induziert. Nach deren Translation steigt das intrazelluläre Hsp70-Level. Diese Induktionskaskade wird beendet, wenn Hsf wieder durch Hsp70 gebunden wird (KÖHLER 2009). Durch ihre zentrale Rolle bei der Proteinhomöostase ist immer ein Grundlevel an Hsp70 vorhanden (SANDERS 1993). Endogene Faktoren beeinflussen dieses Grundlevel, da beispielsweise in frühen Juvenilstadien die Neusynthese von Proteinen erhöht ist (KÖHLER 2009). Stressproteine können als Antwort auf exogene Faktoren wie beispielsweise Pathogene oder abiotische Stressoren wie Temperatur, Strahlung oder Chemikalien induziert werden (SØRENSEN *et al.* 2003). Die Induktion ist somit nicht stressorspezifisch, sondern bildet eine proteotoxische Wirkung verschiedener Stressoren ab (KÖHLER & TRIEBSKORN 2004, KÖHLER 2009). Die Konzentration an Hsp steigt jedoch auch bei proteotoxischem Stress nicht beliebig an, da die Induktion einer Optimumkurve folgt. Beispielsweise kann durch eine Überlastung des Systems, energetische Defizite, Störungen im Proteinsyntheseapparat oder strukturelle Zellschäden die Hsp Konzentration bei einer hohen Stressintensität absinken (KÖHLER & TRIEBSKORN 2004).

Die Stressproteinanalyse wurde in Kiemenproben durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen finden sich im Anhang. Proben wurden 1:3 mit Extraktionspuffer und 2 % Proteaseinhibitor verdünnt. Die Proben wurden anschließend auf Eis homogenisiert und bei 20.000 rcf bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde aufgeteilt: Zur Quantifizierung des Proteingehalts nach Bradford (BRADFORD 1976) wurden 5 µL Probeüberstand mit 245 µL des 1:10 verdünnten Extraktionspuffers vermischt. Zur Bestimmung des Hsp70

## Material und Methoden

Gehalts der Proben wurden 60 µL des Überstands zu 30 µL SDS-Puffer gegeben und für 5 min auf 97 °C erhitzt. Beide Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Um die gleiche Menge Gesamtprotein (40 µg) jeder Probe auf die Gele auftragen zu können, wurde eine Proteinquantifizierung in 96-Well Platten durchgeführt. Zur Herstellung einer Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) in 1:10 Extraktionspuffer (0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0 mg/L BSA) erstellt. Je 25 µL der BSA-Standards wurde in jeweils vier Wells pipettiert. Danach wurden 25 µL der Proben in Triplikate auf die Platte gegeben und sowohl die Standards als auch die Proben mit 250 µL Bradfordreagenz vermischt. Die Adsorption wurde bei 595 nm mit einem Photometer (Microplate Fluorescence Reader FLX 8000, Bio-Tek Instruments, Winooski VT, USA) gemessen und der Proteingehalt der Proben anhand der Standardkurve bestimmt.

Mittels Gelelektrophorese mit Polyacrylamid-Gelen (siehe Anhang) wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Jeweils zehn Proben (Volumen äquivalent zu 40 µg Gesamtprotein) sowie, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Gelen zu gewährleisten, ein Standard im Duplikat (Ganzkörperhomogenat Bachforelle) wurden auf die Gele aufgetragen. In 1 x E Puffer + SDS wurde die Gelelektrophorese bei 80 V für 30 min und anschließend bei 120 V für 90 min durchgeführt. Darauffolgend wurden die Proteine mittels „semi-dry“ Western Blot (Panther™, HEP-1, OWL, peqlab, Erlangen, Germany) mit 1 x Transferpuffer auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Hierzu wurden 90 mA pro Gel für 2 h angelegt.

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membranen zu verhindern, wurden ungenutzte Bindungsstellen der Nitrocellulosemembranen für 90 min mit Pferdeserum und Tris-gepufferter Salzlösung (TBS, Verdünnung 1:2) abgesättigt. Anschließend wurden die Membranen für 5 min in TBS gespült und mit der 1. monoklonalen α-Hsp70 Antikörperlösung (mouse-anti human Hsp70 antibody, Dianova, Hamburg, Germany) bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen für 2 h in der 2. Antikörperlösung (goat anti-mouse IgG Peroxidase Konjugat, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach beiden Inkubationen mit den Antikörperlösungen wurden die Membranen für 5 min in TBS gespült. Anschließend wurden die Membranen in einer Färbelösung mit 4-Chlor(1)naphtol gefärbt. Die optische Dichte (Farbintensität x Fläche) der Banden wurde mit Image Studio Lite (Version 4.0.21, LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) bestimmt und die Hsp70 Menge in Relation zum Standard quantifiziert.

### 3.6.4 Nachweis des Stresshormons Cortisol

Neben seiner Funktion in der Reaktion auf Stress ist das Hormon Cortisol maßgeblich an der Osmoregulation, dem Wachstum und der Reproduktion beteiligt und beeinflusst den Metabolismus von Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden (MOMMSEN *et al.* 1999). Die Regulation und Freisetzung von Cortisol erfolgt über die Hypothalamus-Hypophyse-Interrenal (HPI)-Achse: Im Hypothalamus wird das „Corticotropin-releasing Hormone“ (CRH) freigesetzt, welches die corticotropen Zellen der Hypophyse stimuliert, Adrenocorticotropin (ACTH) auszuschütten. ACTH regt wiederum die in der Kopfniere lokalisierten interrenalen Zellen an Corticosteroide zu synthetisieren und in das Blut abzugeben (MOMMSEN *et al.* 1999, BARTON 2002). Nach der Freisetzung von Katecholaminen ist die Erhöhung des Cortisollevels eine der ersten Reaktionen von Teleostei auf Stress und wird als Indikator für das Stresslevel von Fischen verwendet (WENDELAAR BONGA 1997, BARTON 2002).

Der Cortisolgehalt wurde in Proben aus dem Rückengewebe der Tiere (Muskulatur und Niere) gemessen, da durch die geringe Größe der Forellen eine Bestimmung im Blut nicht möglich war. Zur Bestimmung des Cortisollevels wurde ein kommerziell erhältliches ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Kit (Katalognummer: CSB-E08487f, Cusabio Technology LCC; Huston, Texas, USA) verwendet. Die Proben wurden in PBS (1:11, siehe Anhang) homogenisiert. Die homogenisierten Proben wurden zweimal abwechselnd eingefroren (-20 °C) und wieder bei Raumtemperatur aufgetaut, um die Zellmembranen zu brechen, und anschließend bei 5000 rcf für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Zur Durchführung des Assays wurden die Überstände der Proben 1:10 mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer verdünnt. Auf vorbeschichteten 96-Well-Platten wurden 50 µL einer Standardreihe (0; 0,0023; 0,01; 0,039; 0,156; 0,625; 2,5; 10 ng/mL Cortisol) sowie 50 µL der Proben jeweils in Duplikaten pipettiert und in jedes Well 50 µL Antikörper (spezifisch für Cortisol und Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert mit Ziegen-Anti-Kaninchen Antikörper) hinzugegeben. Die verschlossenen Platten wurden 1 min leicht geschüttelt und darauffolgend für 40 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Wells dreimal mit 200 µL Waschpuffer gewaschen und mit 100 µL HRP-Konjugat gefüllt. Die Platten wurden nochmals für 30 min bei 37 °C inkubiert und nach der Inkubation weitere fünf Waschzyklen durchgeführt. Anschließend wurde 90 µL 3,3',5,5'-Tetramethyl [1,1'-biphenyl]-4,4'-Diamin Substrat in die Wells pipettiert, die Platten lichtundurchlässig mit Alufolie verschlossen und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die im Kit enthaltene Stopplösung unterbrochen und die Absorption bei 450 nm und 570 nm gemessen (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Der Cortisolgehalt ist in ng/L angegeben.

### 3.6.5 Nachweis von oxidativem Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* = ROS) haben in niedrigen Konzentrationen eine wichtige regulatorische Rolle bei Signalwegen und in der Immunantwort (DRÖGE 2002, YANG *et al.* 2013). ROS, wie beispielsweise Hyperoxid-Anionen, Singulett-Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid, entstehen allerdings auch als Beiprodukt im oxidativen Stoffwechsel und durch exogene Einflüsse wie beispielsweise Schadstoffe (SIES 1997, LUSHCHAK 2011, BIRNIE-GAUVIN *et al.* 2017). ROS sind hoch reaktiv und können mit vielen intrazellulären Makromolekülen interagieren (YANG *et al.* 2013). Zum Schutz vor ROS besitzen Organismen ein komplexes antioxidatives Abwehrsystem, um Schäden zu verhindern oder diese zu reparieren (BIRNIE-GAUVIN *et al.* 2017). Das antioxidative Abwehrsystem umfasst dabei sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Komponenten (SIES 1997). So wandelt beispielsweise das Enzym SOD Hyperoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid um, welches wiederum durch CAT oder Glutathionperoxidase (GPx) reduziert werden kann (REGOLI & GIULIANI 2014). Nicht enzymatische Bestandteile des antioxidativen Abwehrsystems wie reduziertes Glutathion (GSH), Ascorbinsäure (Vitamin C) und  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) können direkt mit ROS reagieren und diese so unschädlich machen (SIES 1997, REGOLI & GIULIANI 2014).

Wird das Gleichgewicht zwischen ROS und antioxidativen Systemen beispielsweise durch Schadstoffe gestört, kommt es zu oxidativem Stress (LUSHCHAK 2011, BIRNIE-GAUVIN *et al.* 2017). ROS können dann Schäden an der DNS, Proteinen und Membranen verursachen (VALAVANIDIS *et al.* 2006, BIRNIE-GAUVIN *et al.* 2017). Peroxydierte Membranen weisen eine reduzierte Fluidität sowie Permeabilität auf, was schließlich zu einem Verlust der Membranintegrität führen kann (VALAVANIDIS *et al.* 2006).

#### 3.6.5.1 Aktivität der Superoxiddismutase

Die SOD-Aktivität wurde in Proben aus den Rücken der Forellen analysiert, welche Muskulatur sowie Nierengewebe enthielten. Die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen finden sich im Anhang. Die Proben wurden bei der Präparation vor dem Fixieren in PBS (pH 7,4) gewaschen. Für die Analyse wurde ein kommerziell erhältliches Assay Kit genutzt (Produkt-nummer: 706002, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Bei der Analyse reduzieren durch Xanthinoxidase und Hypoxanthin generierte Hyperoxidradikale ein Tetrazoliumsalz, wodurch ein Formazanfarbstoff gebildet wird. SOD katalysiert wiederum die Umwandlung der Hyperoxide in Wasserstoffperoxid und molekularen Sauerstoff und verringert so die für die Farbreaktion verfügbaren Hyperoxidradikale. Über diese Methode werden Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, und FeSOD bestimmt.

## Material und Methoden

Die Proben wurden 1:5 mit 20 mM HEPES Puffer (pH 7,2) homogenisiert, zentrifugiert (1500 rcf, 4 °C, 5 min) und die Überstände bis zur weiteren Bearbeitung für maximal einen Monat bei -80 °C gelagert. Vor der Analyse wurden die Proben 5:150 mit TRIS-Puffer (50 mM TRIS-HCl, pH 8,0) verdünnt. Die SOD-Aktivität der Proben wurden auf einer 96-Well Platte gemessen. Zur Messung wurde 50 µL Tetrazoliumsalzlösung (Produktnummer: 706004, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) mit 19,95 mL Assay-Puffer vermischt und 200 µL der Mischung in jedes Well gegeben. Aus Rindererythrozyten-SOD (Produktnummer: 706005, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) wurde eine Standardreihe (0; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 U/mL SOD-Aktivität; jeweils 10 µL in Duplikaten) hergestellt. In jedes Well wurde entweder 10 µL Standard oder Probe in Duplikaten pipettiert. Um die Reaktion zu starten, wurden 50 µL Xanthinoxidaselösung (Produktnummer: 706006, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) mit 1,95 mL Probenpuffer vorsichtig vermengt und 20 µL dieser Mischung in jedes Well gegeben. Die Platten wurden mit Folie abgedeckt und nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 450 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesers (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) bestimmt. Die berechnete SOD-Aktivität ist in U/mL angegeben, wobei eine Unit der Menge Enzym entspricht, welche benötigt wird um 50 % der Hydroperoxidradikale umzusetzen.

### 3.6.5.2 Grad der Lipidperoxidation

Das Level der LPO wurde mittels des FOX (ferrous oxidation xylenol orange) Assays nach HERMES-LIMA *et al.* (1995) und MONSERRAT *et al.* (2003) adaptiert für 96-Well Platten bestimmt. In dem Assay wird durch in der Probe enthaltene Lipidperoxide in saurem Milieu zweiwertiges Eisen zu dreiwertigem Eisen oxidiert. Durch Komplexbildung von dreiwertigem Eisen mit Xylenolorange wird ein messbarer Farbumschlag hervorgerufen. Je nach Verfügbarkeit und Lebensstadium wurden unterschiedliche Organe für den FOX Assay verwendet und die Parameter der Analyse entsprechend optimiert (siehe Tabelle 4). Die Proben wurden mit Methanol auf Eis homogenisiert und anschließend zentrifugiert (15.000 rcf, 5 min, 4 °C).

**Tabelle 4:** Parameter des FOX-Assays bei den verschiedenen Versuchen.

Versuch	Organ	Verdünnung mit Methanol	Überstand [µL]/Well	Bidestilliertes Wasser [µL]/Well	Inkubationszeit [min]
<b>Versuch 1-1</b>	Kopf	1:15	25	25	180
<b>Versuch 1-2</b>	Kopf	1:15	20	30	90
<b>Versuch 2</b>	Gehirn	1:2	40	10	120
<b>Versuch 3</b>	Kopf	1:5	25	25	240
<b>Versuch 4</b>	Muskulatur	1:6	30	20	165
<b>Versuch 5</b>	Muskulatur	1:6	40	10	180

Der Überstand der Proben wurde abgenommen und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Für den FOX Assay wurden in einer 96-Well Platte pro Well 50 µL 0,75 mM FeSO<sub>4</sub>-Lösung, 50 µL 75 mM Schwefelsäure, 50 µL 0,3 mM Xylenolorange-Lösung (siehe Anhang) sowie insgesamt 50 µL Probenüberstand und bidestilliertes Wasser pipettiert. Das Gesamtvolumen pro Well betrug bei jeder Platte 200 µL. Jede Probe wurde in Triplikaten aufgetragen. Um die Messungen auf mögliche endogene Eisenrückständen in den Proben korrigieren zu können, wurde von jeder Probe zusätzlich ein Well analysiert, bei welchem die FeSO<sub>4</sub>-Lösung durch bidestilliertes Wasser ersetzt wurde. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 570 nm (ABS570) gemessen (Bio-Tek Instruments, Winooski VT, USA). Anschließend wurde in jedes Well 1 µL Cumolhydroperoxid (CHP)-Lösung (siehe Anhang) hinzugegeben und die Platte erneut für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Adsorption der Proben wurde ein weiteres Mal bei 570 nm gemessen. Von allen Messungen wurde der Messwert der Platte (Blank ermittelt durch Wells mit 200 µL bidestilliertem Wasser) sowie die Werte der jeweiligen Messung ohne FeSO<sub>4</sub>-Lösung abgezogen. Cumolhydroperoxid-Äquivalente (CHPe.) bezogen auf mg Nassgewicht der Proben wurde mit folgender Formel berechnet:

$$CHPequiv. = \frac{ABS570\ Probe}{ABS570\ Probe + CHP} * CHP\ (1\ \mu L) * \frac{Volumen_{Gesamt}\ (200\ \mu L)}{Volumen_{Probe}} * Verdünnungsfaktor \quad (1)$$

### 3.6.6 Neurotoxizität: Nachweis von Acetylcholinesterase und Carboxylesterasen

Nach der Klassifizierung von Hydrolasen durch ALDRIDGE (1953) anhand ihrer Interaktion mit Organophosphaten werden CbE sowie AChE zu den B-Esterasen gezählt. Durch die Hydrolyse von ACh in Essigsäure und Cholin unterbricht die AChE die Reizweiterleitung an cholinergen Synapsen (COLOVIC *et al.* 2013, LIONETTO *et al.* 2013). AChE kommt dabei sowohl an motorischen Endplatten wie auch in cholinergen Synapsen des zentralen Nervensystems vor (LIONETTO *et al.* 2013). Viele Organophosphat- und Carbamat-Pestizide wirken durch die spezifische Inhibierung der AChE (COLOVIC *et al.* 2013, LIONETTO *et al.* 2013). Die Inhibierung des Enzyms verursacht eine Dauererregung an der Synapse, welche unwillkürliche Muskelzuckungen (Faszikulationen) auslöst, die bis hin zum Tod des Organismus führen können (COLOVIC *et al.* 2013). Eine Änderung der AChE-Aktivität wird daher als Biomarker für Neurotoxizität verwendet (LIONETTO *et al.* 2013).

CbE können protektiv bei einer Exposition gegenüber Organophosphaten, Carbamaten und synthetischen Pyrethroiden wirken, indem sie Esterbindungen hydrolysieren oder die Pestizide an die CbE binden (CHANDA *et al.* 1997, SANCHEZ-HERNANDEZ *et al.* 2009). Dadurch können CbE

## Material und Methoden

negative Effekte auf die AChE reduzieren (CARR & CHAMBERS 1991, CHANDA *et al.* 1997, SANCHEZ-HERNANDEZ *et al.* 2009).

Die Aktivität der B-Esterasen wurde in Muskulaturproben bei 405 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski VT, USA) in 6 Intervallen über 5 min gemessen. Die Zusammensetzung der verwendeten Chemikalienlösungen finden sich im Anhang. Die Proben wurden im Verhältnis von 1:5 mit Extraktionslösung verdünnt, auf Eis homogenisiert und anschließend zentrifugiert (5000 rcf, 10 min, 4 °C). Der Probenüberstand wurde mit 50 % Glycerol (1/4 des Probenvolumens) vermischt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Alle Analysen wurden in Triplikaten durchgeführt und die Werte durch einen Blank korrigiert, bei welchem das Probenvolumen durch bidestilliertes Wasser ersetzt wurde. Der Proteingehalt der Proben wurde mit der durch MARKWELL *et al.* (1978) modifizierten Methode von LOWRY *et al.* (1951) gemessen. Hierfür wurde mit BSA eine Standardkurve (0; 2; 5; 10; 15; 20; 30; 40 µL BSA in einer Konzentration von 1 mg/mL) in einer 96-Well Platte erstellt. In die weiteren Wells wurden je 2 µL Probe pipettiert. Mit bidestilliertem Wasser wurde das Volumen in allen Wells auf 50 µL angeglichen. Anschließend wurde in jedes Well 200 µL der Lösung C pipettiert und die Platte für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurde Folin-Ciocalteu-Reagenz 1:2 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und 20 µL der Mischung in alle Wells hinzugegeben. Vor der Messung der Absorption bei 650 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski VT, USA) wurden die Platten für 45 min vor Licht geschützt bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Die AChE-Aktivität wurde spektrophotometrisch mit Hilfe der von ELLMAN *et al.* (1961) entwickelten und durch RAULT *et al.* (2008) angepassten Methode bestimmt. Hierzu wurde jeweils 2 µL des Probenüberstandes in ein Well gegeben. Anschließen wurde 178 µL Ellman-Puffer sowie 20 µL Acetylthiocholiniodid (AcSCh) Substratlösung hinzugegeben und unmittelbar darauffolgend die Absorption gemessen.

Die CbE-Aktivität wurde nach den durch SANCHEZ-HERNANDEZ *et al.* (2009) modifizierten Methoden von CARR & CHAMBERS (1991) mit dem Substrat 4-Nitrophenylvalerat (NPV) sowie CHANDA *et al.* (1997) mit dem Substrat 4-Nitrophenylacetat (NPA) durchgeführt. Jeweils 4 µL Probe wurden in einer 96-Well Platte mit 246 µL NPV-Substrat (24,75 mL Tris-HCl Puffer mit 250 µL NPV-Substratlösung) oder NPA-Substrat (23,75 mL Tris-EDTA Puffer mit 1,25 mL NPA-Substratlösung) vermischt. Direkt im Anschluss wurde die Absorption im Mikrotiterplattenleser bestimmt.

Die Enzymaktivitäten der B-Esterasen wurden auf den Gesamtproteingehalt bezogen und als Milliunits pro mg Protein angegeben. Hierbei entspricht eine Unit Enzymaktivität ein Mikromol des Substrats, welches pro Minute hydrolysiert wird.

### 3.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit JMP®14.0.0 (SAS Institute Inc., NC, USA) beziehungsweise R (Version 3.6.2, R CORE TEAM 2019) durchgeführt. Vergleiche mit der Laborkontrolle (Versuch 2) sowie vorzeitig abgebrochenen Versuchsgruppen (Versuch 4) wurden ausschließlich deskriptiv durchgeführt. Das  $\alpha$ -Level wurde auf 0,05 festgelegt. Zur Analyse der Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung wurde ein Likelihood-Verhältnis Test mit anschließenden paarweisen Vergleichen durch exakte Tests nach Fischer und einer Bonferroni-Holm Post-hoc-Korrektur (HOLM 1979) angewendet. Auf gleiche Weise wurde das Ruheverhalten ausgewertet mit einer Korrektur nach BENJAMINI & HOCHBERG (1995) auf multiples Testen. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilk Test oder über Quantil-Quantil-Diagramme überprüft. Die Homogenität der Varianzen wurde mit Levene Tests analysiert. Nach Möglichkeit wurden nicht normalverteilte oder varianzinhomogene Daten transformiert. Varianzinhomogene Daten wurden mit einer Welch-ANOVA analysiert, nicht normalverteilte Daten mittels Kruskal-Wallis Test und anschließenden Einzelvergleichen korrigiert nach BENJAMINI & HOCHBERG (1995). In Versuch 2 wurde über t-Tests sichergestellt, dass keine Unterschiede zwischen der Lösungsmittelkontrolle und der Kontrollgruppe auftraten und die Versuchsgruppen anschließend mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen. In Versuch 2 wurden die übrigen Daten mit einer genesteten ANOVA („Block“ als Nestingfaktor) ausgewertet. In Versuch 1 und 3-5 wurden die Zeit bis zu dem Erreichen des Augenpunktstadiums sowie bis zum Schlupf der Tiere und die Daten zur Mortalität mit einer Cox-Regression („Aquarium“ beziehungsweise „Petrischale“ als Zufallsvariable; Paket „coxme“; THERNEAU 2020) analysiert. Die Auswertung der Daten des Schwimmverhaltens erfolgte mit generalisierten linearen Modellen (Pakete „lme4“ BATES *et al.* 2015 beziehungsweise Paket „glmmTMB“ BROOKS *et al.* 2017) auf Grundlage einer Binomialverteilung und unter Berücksichtigung des Aquariums als Zufallsvariable und der Aufnahmezeit bei der Analyse der mittleren Geschwindigkeit sowie der Zeit in Inaktivität. Zur Analyse aller übrigen Daten wurden lineare Modelle (Pakete „lme4“ BATES *et al.* 2015) mit „Aquarium“ beziehungsweise „Petrischale“ als Zufallsvariable verwendet. Zudem wurde die Auswirkung der Videoaufzeichnung auf den Cortisolgehalt analysiert. Bei der Auswertung der Daten zur Herzschlagrate wurde zusätzlich die Temperatur während der Messung berücksichtigt. Post-hoc-Vergleiche zur Kontrollgruppe wurden mittels Dunnetts Test (Versuch 1 und 4) und Post-hoc-Vergleiche zwischen allen Versuchsgruppen mittels Tukey HSD (Versuch 2, 3 und 5) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Kapitel I: Relevanz von Nanoplastik und Mikroplastik für Süßwasser-Ökosysteme: Ein kritischer Review

R. TRIEBSKORN, T. BRAUNBECK, T. GRUMMT, L. HANSLIK, S. HUPPERTSBERG, M. JEKEL, T. P. KNEPPER, S. KRAIS, Y. K. MÜLLER, M. PITTRUFF, A. S. RUHL, H. SCHMIEG, C. SCHÜR, C. STROBEL, M. WAGNER, N. ZUMBÜLTE, H.-R. KÖHLER: Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review. *Trends in Analytical Chemistry* **110**: 375-392. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.023>.

Diese Literaturstudie entstand vor dem Hintergrund des gestiegenen Bewusstseins für ein mögliches Risiko, das von MP und NP für die Umwelt ausgehen könnte. Einhergehend mit dem größer werdenden öffentlichen Interesse hat auch die Zahl wissenschaftlicher Studien und Veröffentlichungen zu der Thematik sowie die Notwendigkeit einer evidenzbasierten Risikokommunikation zugenommen (WARDMAN *et al.* 2021). Ziel des Reviews war, die in der Literatur beschriebenen Effekte, welche durch MP und NP als alleinige Stressoren verursacht wurden, die Möglichkeit eines Gewebetransfers von MP und NP sowie eine mögliche Modulation der Auswirkungen anderer Chemikalien durch MP und NP zu diskutieren. Zudem wurde insbesondere die Umweltrelevanz der Studien betrachtet. Voraussetzung für eine zielführende Diskussion über Auswirkungen von MP und NP auf die Umwelt ist, dass eine Abgrenzung der Thematik „Mikroplastik“ zum Thema „Makroplastik“ stattfindet. In wissenschaftlichen Studien muss zudem klar benannt werden, um welche Art von MP- beziehungsweise NP-Partikeln es sich handelt, da die Partikelgröße, ihre Form sowie ihre chemische Zusammensetzung (Polymerart und Additive) sowohl das Umweltverhalten als auch mögliche Effekte der Partikel beeinflussen.

Eine Beurteilung der Umweltrelevanz von Effektstudien ist nur vor dem Hintergrund von Daten zu dem Vorkommen von MP und NP in der Umwelt möglich. Bedingt durch die Methodik der Probenahme und Partikelanalyse werden in der Umwelt vor allem größere MP-Partikel nachgewiesen, während es nur sehr wenige Daten zu kleinem MP und NP gibt. Im Rahmen des Reviews veröffentlichte Daten zur MP Belastung der Elbe zeigen, dass pro eine Million gefundener Partikel circa 10 aus Kunststoff bestehen (höchste MP Konzentration  $9 \times 10^5$  Partikel/m<sup>3</sup>). Auffällig war zudem, dass 96 % aller MP-Partikel im Größenbereich von  $< 20 \mu\text{m}$  lagen. Bei Methoden, welche die MP Belastung in Proben über den Gewichtsanteil bestimmen, fallen große Anzahlen von kleinen MP-Partikel kaum auf, da ihr Gesamtgewicht trotzdem gering ist. Insgesamt ist die Anzahl nachgewiesener MP-Partikel abhängig von der angewendeten Methodik der Probenahme, der Probenaufbereitung sowie der Analysemethode. Die Spannweite der Anzahl nachgewiesener MP-Partikel in wissenschaftlichen Studien ist daher sehr hoch und reicht im Oberflächenwasser

## Ergebnisse und Diskussion

von Werten von unter einem Partikel pro Kubikmeter bis zu Höchstwerten von über 1000 Partikel pro Liter (z.B. KAPP & YEATMAN 2018, HAN *et al.* 2020, KABIR *et al.* 2021). In Europäischen Flüssen bewegen sich die nachgewiesenen MP Konzentrationen meist im Bereich von 0-30 Partikel/m<sup>3</sup> (GAO *et al.* 2024). Neben Einflüssen der Methodik wird die MP Konzentration auch durch räumliche Faktoren wie die Landnutzung und zeitliche Faktoren wie Niederschlagsmengen beeinflusst (TALBOT & CHANG 2022). Wie unter anderem die Daten aus der Elbe zeigen, hat insbesondere die Grenze der kleinsten untersuchten Partikelgröße einen maßgeblichen Einfluss auf die gemessene MP Konzentration (GAO *et al.* 2024). Für mögliche Wirkungen auf Biota werden kleinere MP-Partikel für relevanter erachtet. Daher werden in Effektstudien vor allem kleine MP-Partikel verwendet. Daraus resultiert eine Diskrepanz zwischen verhältnismäßig niedrigeren Konzentrationen größerer MP-Partikel, welche in der Umwelt nachgewiesen werden, und in Effektstudien verwendeten sehr hohen Konzentrationen von meist sehr kleinem MP oder NP.

Neben möglichen durch Additive oder mechanischen Schädigungen des Epithels hervorgerufenen Effekten ist insbesondere die Gewebetranslokation von sehr kleinem MP oder NP eine Voraussetzung für Entzündungen und Nekrosen. Im Rahmen des Projekts MiWa wurde eine Gewebetranslokation von PS-NP ( $0,25 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ) in humane Keratinozyten gezeigt. Im Review wurden 31 Studien mit 18 verschiedenen Vertebraten- und Invertebratenarten zur Gewebetranslokation verschiedener Polymere betrachtet. Bei 22 dieser Studien wurde von Gewebetranslokation von Partikeln berichtet. Für eine Aufnahme von Partikeln in Zellen sind verschiedene Eigenschaften entscheidend. Insbesondere die Partikelgröße und deren Oberflächenladung haben einen großen Einfluss auf eine mögliche Gewebetranslokation. Sehr kleine Partikel können durch passive Diffusion in Zellen aufgenommen werden. Auch Phagozytose und Persorption können zu einer Aufnahme von Partikeln in Zellen führen. Die Ergebnisse der Literaturstudie lassen keine eindeutigen Rückschlüsse auf eine Grenze der Partikelgröße von MP und NP zu, welche in Zellen aufgenommen werden können. Eine Gewebetranslokation für Partikel  $< 1 \mu\text{m}$  ist plausibel und in Ausnahmen wurde eine Aufnahme in Gewebe auch für etwas größere Partikel glaubhaft gezeigt. Fehlerquellen, wie eine mögliche Kontamination mit Partikeln während einer Probenahme oder einer fehlerhaften Interpretation von 2D Bildern, müssen für valide Ergebnisse ausgeschlossen werden (BATEL *et al.* 2020, BENITO-KAESBACH *et al.* 2023). Der Nachweis von Gewebetranslokation von MP und NP findet zudem häufig über fluoreszenzmarkierte Partikel statt. Ist der Farbstoff nicht kovalent gebunden, kann diese Methode zu falsch positiven Ergebnissen führen, wenn sich der Farbstoff aus dem Partikel löst und sich im Fettgewebe eines Organismus anreichert (SCHÜR *et al.* 2019). Da gerade für NP die Auflösung spektroskopischer Methoden häufig nicht ausreicht, muss hier jedoch auch von einer möglichen Unterschätzung von in Gewebe aufgenommenen Partikeln ausgegangen werden.

## Ergebnisse und Diskussion

In dem Review wurden 67 Studien zu durch MP und NP als alleinige Stressoren verursachten Effekten und deren Umweltrelevanz betrachtet. Die Studien unterschieden sich stark in ihrem experimentellen Design und den veröffentlichten Informationen. So wurden in den Studien Partikel verschiedener Polymere in unterschiedlichen Größenklassen untersucht. Am häufigsten wurden Polyethylen (PE)- und PS-Partikel in einer Größe zwischen 0,5 bis > 700 µm in Effektstudien verwendet. Als Testorganismen wurden in über der Hälfte der Studien verschiedene Fischarten untersucht, während für Studien in Invertebraten überwiegend Krebstiere eingesetzt wurden. In den Studien wurde eine große Bandbreite verschiedener apikaler und biochemischer Endpunkte analysiert. Rückschlüsse zur Umweltrelevanz der untersuchten Effekte konnten nur in 18 Studien gezogen werden. In den übrigen Studien war entweder die untersuchte Partikelkonzentration nicht bekannt, es wurde die Partikelgröße nicht genannt oder es wurde MP und NP in einer Größe von < 5 µm verwendet, für welche die Umweltkonzentration nicht hinreichend bekannt ist. Nur in drei der 18 Studien wurden umweltrelevante Partikelkonzentrationen untersucht und nur in einer dieser Studien wurde ein durch MP verursachter Effekt beschrieben (ZIAJAHROMI *et al.* 2018). In den 15 Studien, welche höhere Partikelkonzentrationen verwendeten, wurden bei 11 Effekte auf unterschiedliche Endpunkte beobachtet. Von den 36 Studien, welche hinsichtlich ihrer Umweltrelevanz nicht beurteilt werden konnten, wurde in 16 Studien zu Effekten von MP mindestens ein untersuchter Endpunkt durch die Partikel beeinflusst. Zudem wurden in allen zehn Studien, welche NP und in vier Studien, welche MP und NP untersuchten, Effekte beobachtet. Bei Fischen wurden durch MP oder NP verursachte histopathologische Veränderungen, Auswirkungen auf das Immunsystem, die AChE-Aktivität, das oxidative Stresslevel, Blutparameter und Änderungen im Fett- und Energiestoffwechsel sowie im Verhalten der Tiere beschrieben. Bei Invertebraten wurden vor allem Effekte auf die Mortalität, das Wachstum und die Reproduktion untersucht.

In Kläranlagen und in der Umwelt treffen MP und NP auf eine Vielzahl anderer Umweltchemikalien sowie Bakterien und Viren und können mit diesen interagieren (WANG *et al.* 2018, TUMWESIGYE *et al.* 2023). Durch Ad- oder Absorption an MP und NP kann die Bioverfügbarkeit von Stoffen verändert werden (PRAJAPATI *et al.* 2022). Verschlucken Organismen MP oder NP mit ad- oder absorbierten Chemikalien, können diese als Vektor für die Chemikalien in den Organismus fungieren und sogar über verschiedene Trophiestufen transportiert werden (BATEL *et al.* 2016, WANG *et al.* 2018, HANSLIK *et al.* 2020, PRAJAPATI *et al.* 2022). Durch diese Eigenschaften können MP und NP die negativen Auswirkungen von Umweltchemikalien auf Organismen verstärken (z.B. OLIVEIRA *et al.* 2013, NEMATDOOST HAGHI & BANAEI 2017, ZHAO *et al.* 2020). Ein entscheidender Faktor dafür, ob Kunststoffpartikel als Vektoren fungieren, ist dabei ihre Größe. Zum einen ist bei kleinen Partikeln das Verhältnis von Volumen zur Oberfläche größer, zum anderen ist eine Gewebe-

translokation wahrscheinlicher (ZHU *et al.* 2013, VELZEBOER *et al.* 2014). Findet im Darm oder nach Gewebetranslokation der Partikel jedoch keine Desorption der Schadstoffe statt, werden Organismen in der Regel nicht durch die sorbierten Schadstoffe beeinflusst. In bestimmten Fällen ist jedoch auch eine Modulation der Effekte von Chemikalien durch MP und NP möglich, obwohl eine Sorption der Chemikalien ausgeschlossen werden kann (KRAIS *et al.* 2022). Eine Bindung von Schadstoffen an MP- und NP-Partikel kann auch zu einer Reduktion der bioverfügbaren Konzentration der Stoffe führen, wodurch Effekte auf Organismen verringert werden können (z.B. KLEINTEICH *et al.* 2018, REHSE *et al.* 2018, LI *et al.* 2020b). Die beschriebenen Mechanismen treten nicht nur bei Kunststoffpartikeln auf, sondern konnten auch bei natürlichen Partikeln wie Schwebstoffen beobachtet werden. MP und NP bieten jedoch eine andere Oberflächenmatrix als natürliche Partikel, wodurch sich der Einfluss von MP und NP von natürlichen Partikeln auf Chemikalien und Bakterien unterscheiden könnte (TUMWESIGYE *et al.* 2023). Betrachtet man die relativ geringe Anzahl von MP- und NP-Partikeln im Vergleich zu natürlichen Partikeln und bezieht andere Expositionspfade von Organismen gegenüber Chemikalien mit ein, ist die Relevanz der Rolle von MP und NP als Vektor fraglich (ZARFL & MATTHIES 2010, KOELMANS *et al.* 2013, BAKIR *et al.* 2016, BECKINGHAM & GHOSH 2017, HANSLIK *et al.* 2020).

Eine abschließende Bewertung über das Risiko durch MP und NP für aquatische Organismen ist trotz der hohen Anzahl an wissenschaftlichen Studien derzeit nicht möglich. Für größere Partikel wurden zumeist Partikelkonzentrationen getestet, welche mehrere Größenordnungen über den in der Umwelt gemessenen Partikelkonzentrationen lagen. Im Gegensatz dazu fehlen für kleines MP und NP belastbare Daten zur Partikelkonzentration in der Umwelt. Basierend auf den vorhandenen Daten wirkt das Risiko durch größeres MP eher gering. Bedenklicher erscheinen kleine MP- oder NP-Partikel, da ihre Konzentration in der Umwelt deutlich höher liegen könnte als die von größeren Partikeln und zudem eine Gewebetranslokation sowie eine Modulation der Wirkung anderer Umweltschadstoffen wahrscheinlicher ist. Zur Einordnung der Effekte von MP- und NP-Partikeln sollte zudem, soweit möglich, ein Vergleich mit natürlichen Partikeln stattfinden. Auch SAPEA („Science Advice für Policy by European Academies“), ein Teil des wissenschaftlichen Beratungsapparates der Europäischen Kommission, kommt zu dem Schluss, dass MP und NP nach bisherigem Wissensstand kein großflächiges Risiko für Menschen und Umwelt darstellen. SAPEA hebt allerdings hervor, dass es in bestimmten Fällen zu negativen Auswirkungen kommen kann und dass sich die Einschätzung des Risikos durch NP und MP ändern könnte, wenn Wissenslücken zur Methodik der Probenahme sowie zu Effekten geschlossen werden und die Umweltverschmutzung mit Kunststoffpartikeln weiterhin ansteigt (EUROPEAN COMMISSION 2019).

## 4.2 Kapitel II: PS-Mikroplastik Exposition hat keine Auswirkungen auf juvenile Bachforellen und moduliert nicht die durch das Pestizid Methiocarb verursachten Effekte

H. SCHMIEG, S. HUPPERTSBERG, T. P. KNEPPER, S. KRAIS, K. REITTER, F. REZBACH, A. S. RUHL, H.-R. KÖHLER, R. TRIEBSKORN: Polystyrene microplastics do not affect juvenile brown trout (*Salmo trutta f. fario*) or modulate effects of the pesticide methiocarb.

Environmental Sciences Europe **32** (49). 2020, doi: <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00327-4>.

In dieser Studie wurden die Effekte einer 96 h Exposition von juvenilen Bachforellen gegenüber  $10^4$  Partikel/L PS-MP ( $< 50 \mu\text{m}$ ) sowie nominal 1 mg/L Methiocarb und der Co-Exposition von  $10^4$  Partikel/L PS-MP und nominal 1 mg/L Methiocarb untersucht (Versuch 2). Als Lösungsvermittler wurde 0,01 % DMSO verwendet. Um eine Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen zu gewährleisten, wurde in allen Aquarien die gleiche Menge DMSO hinzugegeben. Neben einer Negativkontrolle wurde zusätzlich eine Lösungsmittelkontrolle sowie eine Laborkontrolle durchgeführt. Die Laborkontrolle ermöglichte, den Einfluss der Haltungsbedingungen während des Versuchs zu beurteilen. Physikalisch-chemische Wasserparameter wurden bei Beginn und Ende des Versuchs gemessen (durchschnittliche Werte: Temperatur  $7,0 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ; pH  $7,3 \pm 0,5$ ; Sauerstoffkonzentration  $10,9 \pm 0,4 \text{ mg/L}$ , Sauerstoffsättigung  $94,7 \pm 2,4 \%$ ; Leitfähigkeit  $489,8 \pm 15,8 \mu\text{S/cm}$ ; Nitrit  $\leq 0,2 \text{ mg/L}$ ).

In den Kontrollgruppen sowie in der Versuchsgruppe, welche ausschließlich PS-MP enthielt, war die Methiocarbkonzentration  $< 250 \text{ ng/L}$  (LoQ). Die gemessene Methiocarbkonzentration bei Versuchsbeginn in den Versuchsgruppen mit ausschließlich Methiocarb sowie mit der Mischung von PS-MP und Methiocarb betrug ungefähr 50 % der nominalen Konzentration. Bei Versuchsende war die Konzentration des Pestizids um weitere 34-50 % in beiden Versuchsgruppen gesunken. Es konnten keine Unterschiede in der Methiocarbkonzentration zwischen der Versuchsgruppe mit ausschließlich Methiocarb und der Co-Exposition von Methiocarb und PS-MP beobachtet werden. Eine reduzierte Methiocarbkonzentration in dem beobachteten Umfang lässt sich nicht allein durch einen abiotischen Abbau begründen (EFSA 2006). Vor Versuchsbeginn wurden die Glasaquarien mit den entsprechenden Testmedien befüllt, um freie Bindungsstellen zu sättigen und den Verlust durch Sorption möglichst gering zu halten. Es ist möglich, dass dennoch ein Verlust durch Sorption an die Aquarien, aber auch an zur Probenahme verwendete Gefäße stattfand. Zudem ist es wahrscheinlich, dass sich die Methiocarbkonzentration durch die Aufnahme in die Forellen weiter reduziert hat.

## Ergebnisse und Diskussion

Es wurden keine Auswirkungen von PS-MP auf die Mortalitätsrate der Fische beobachtet. Auch während der Methiocarb-Exposition verstarb kein Tier, allerdings mussten drei Forellen aus der Versuchsgruppe mit Methiocarb (10 % der Tiere in der Versuchsgruppe) und ein Fisch aus der Versuchsgruppe mit der Mischung aus Methiocarb und PS-MP (3 % der Tiere in der Versuchsgruppe) auf Grund ihres schlechten Allgemeinzustands euthanasiert werden. Das Gewicht der Forellen lag im Mittel bei  $3,0 \pm 1,0$  g und war in allen Versuchsgruppen vergleichbar.

Weder die Exposition gegenüber PS-MP noch gegenüber Methiocarb oder der Mischung aus beiden verursachte eine Veränderung der SOD-Aktivität oder des Levels der LPO. In der Literatur werden sehr unterschiedliche Auswirkungen von PS-MP auf das oxidative Stresslevel von Fischen beschrieben: In Larven von Zebrabärblingen wurde die Aktivität der GPx sowie der CAT nicht durch die Exposition gegenüber PS-MP ( $45 \mu\text{m}$ ) beeinflusst, während das Level der reduzierten Form von GSH signifikant verringert war (CHEN *et al.* 2017). In adulten Zebrabärblingen wurde durch  $5 \mu\text{m}$  PS-MP einerseits in zwei Studien (LU *et al.* 2016, QIAO *et al.* 2019) eine Erhöhung der SOD- und CAT-Aktivität beobachtet, während in einer weiteren Studie (CHEN *et al.* 2020) keine Auswirkungen auf die Aktivität von SOD, CAT und GPx gefunden wurde. Zudem wurden in einer Studie mit etwas kleinerem PS-MP ( $2 \mu\text{m}$ , 7 d) keine Effekte auf die SOD- und CAT-Aktivität sowie den Grad der LPO adulter Zebrabärblinge beobachtet, wobei jedoch der GSH-Gehalt signifikant erhöht war (ZHANG *et al.* 2023). Auch in anderen Fischarten wurden sehr unterschiedliche Auswirkungen auf das oxidative Stresslevel durch PS-MP beobachtet. In einer Studie von YANG *et al.* (2020) wurde nach einer siebentägigen Exposition gegenüber  $50 \mu\text{m}$  PS-MP keine signifikante Veränderung der CAT- und GPx-Aktivität in Larven von Goldfischen (*Carassius auratus*) beobachtet. Die Aktivität der SOD war bei einer Exposition gegenüber  $100 \mu\text{g/L}$  PS-MP signifikant erhöht, nicht jedoch bei der höheren Konzentration von  $1000 \mu\text{g/L}$  PS-MP. Im Gegensatz dazu wurde ein signifikant erhöhtes ROS-Level in der höchsten Versuchsgruppe ( $1000 \mu\text{g/L}$  PS-MP) gemessen (YANG *et al.* 2020). In Nilbuntbarschen (*Oreochromis niloticus*) exponiert für 14 d gegenüber  $5 \mu\text{m}$  und  $70\text{-}90 \mu\text{m}$  PS-MP war die SOD-Aktivität sowie der Grad der LPO signifikant erhöht (DING *et al.* 2020). In einer ähnlichen Studie ( $5 \mu\text{m}$  PS-MP, 14 d), bei welcher Nilbuntbarsche gegenüber einer geringeren Partikelkonzentration exponiert wurden, verursachten die Partikel eine signifikante Reduktion der SOD-Aktivität und hatten keine Auswirkung auf das Level der LPO (HUANG *et al.* 2021). Es gibt bisher keine eindeutige Erklärung, unter welchen Voraussetzungen PS-MP zu oxidativen Stress in Fischen führt. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Studien verdeutlichen, dass die Ursache komplex ist und sich nicht nur auf die Größe der Partikel oder die untersuchte Fischart zurückführen lässt. Mögliche Erklärungen – neben der Größe und Form der Partikel – sind Unterschiede in den Versuchsbedingungen sowie unterschiedliche Additive, welche in den untersuchten PS-MP-Partikeln enthalten sein können. Zu

einem möglichen Einfluss von Methiocarb auf das oxidative Stresslevel ist wenig bekannt. Allerdings wurde in Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*) oxidativer Stress, wie eine erhöhte SOD-Aktivität und vermehrte LPO, bei Gabe von Methiocarb beschrieben (OZDEN & ALPERTUNGA 2010, OZDEN *et al.* 2012).

Es gibt wenige Studien zu möglichen proteotoxischen Effekten von MP und Carbamat-Pestiziden. Im vorliegenden Versuch konnte kein Einfluss auf das Hsp70-Level von Bachforellen durch PS-MP, Methiocarb und der Mischung aus beiden festgestellt werden. Im Gegensatz dazu verursachte die Gabe von PS-MP beziehungsweise PS-NP (0,5-1 µm; 10 mg/100 g Futter) eine veränderte Genexpression von Hsp70 in Rosenberggarnelen (*Macrobrachium rosenbergii*; JAIKUMAR *et al.* 2021).

PS-MP hatte im für die vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuch keinen Effekt auf die AChE- und CbE-Aktivität, während die Exposition gegenüber Methiocarb und der Mischung aus Methiocarb und PS-MP zu einer 59 % Reduktion der AChE-Aktivität, zu einer 42-44 % Verringerung der CbE-*npa*-Aktivität und einer 83 % Reduktion CbE-*npv*-Aktivität führte. Auch in Studien anderer Arbeitsgruppen wurden bei frühen Entwicklungsstadien von Zebrabärblingen und Goldfischen bei der Exposition mit PS-MP (45 µm beziehungsweise 50 µm) keine signifikanten Veränderungen der AChE-Aktivität beobachtet (CHEN *et al.* 2017, YANG *et al.* 2020). Im Gegensatz dazu bewirkte eine Exposition von Zebrabärblingen mit 1 µm PS-MP jedoch ein erhöhtes ACh-Level (XIANG *et al.* 2023) und die Exposition gegenüber einer Mischung aus PS-MP und PE-MP hoher Dichte (< 90 µm) bei hohen Konzentrationen eine Inhibierung der AChE-Aktivität (LIMONTA *et al.* 2021). Zudem wurde bei Nilbuntbarschen (*Oreochromis niloticus*) und Reiskärpflingen (*Oryzias javanicus*) eine signifikante Reduktion der AChE-Aktivität durch 5 µm PS-MP beschrieben, während bei größerem PS-MP und PS-NP kein Einfluss auf die Enzymaktivität bei Nilbuntbarschen beobachtet wurde (DING *et al.* 2018, DING *et al.* 2020, HUANG *et al.* 2021, USMAN *et al.* 2021). In einer Metaanalyse über 35 Studien kamen XIONG *et al.* (2023) zum Schluss, dass MP und NP zu einer deutlichen Reduktion des AChE-Levels im Gehirn von aquatischen Organismen führen kann. Denkbare Erklärungen für die Unterschiede bei den beobachteten Effekten von MP sind neben der Partikelgröße, den enthaltenen Additiven und dem Expositionszeitraum beispielsweise ein möglicher Zusammenhang neurotoxischer Effekte und oxidativem Stress, Störungen im Metabolismus und Schädigung von Nervengewebe (CHEN *et al.* 2017, BARBOZA *et al.* 2020, DING *et al.* 2020, XIONG *et al.* 2023). CHEN *et al.* (2023) verdeutlichten allerdings in einer Studie mit Zebrabärblingen, dass die durch MP unterschiedlicher Polymerarten verursachte Reduktion der AChE-Aktivität vergleichbar mit dem Effekt natürlicher Partikel aus Siliciumdioxid ist. Die in den Versuchsgruppen mit Methiocarb beobachtete Hemmung der AChE-Aktivität entspricht der Wirkweise von Carbamat-Pestiziden, welche durch die Hemmung des

## Ergebnisse und Diskussion

Enzyms zu einer Akkumulation von ACh führen und so eine cholinerge Krise verursachen können (FUKUTO 1990, ROSMAN *et al.* 2009). CbE spielen eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Pestiziden. Es wird vermutet, dass sie eine protektive Wirkung bei Pestizidvergiftungen haben (WHEELock *et al.* 2005, MAYMÓ *et al.* 2006, SANCHEZ-HERNANDEZ *et al.* 2009). Möglicherweise war die eingesetzte Methiocarbkonzentration in dem an der Universität Tübingen durchgeführten Versuch so hoch, dass keine protektive Wirkung der CbEs beobachtet werden konnte, da eine Hemmung aller drei untersuchter Enzyme vorlag.

Im Vergleich zu den Kontrollgruppen konnten keine histologischen Veränderungen im Gewebe der Leber und der Kiemen durch Exposition gegenüber PS-MP festgestellt werden. Die veröffentlichten Studien zu durch MP verursachten histopathologischen Veränderungen müssen kritisch betrachtet werden (BAUMANN *et al.* 2016, BATEL *et al.* 2020, DE SALES-RIBEIRO *et al.* 2020). Wie von DE SALES-RIBEIRO *et al.* (2020) für Leber- und Darmhistologie umfassend diskutiert, beschreiben die meisten Studien teilweise drastische Effekte, welche jedoch nicht durch die veröffentlichten Abbildungen untermauert werden oder bei welchen es sich höchstwahrscheinlich um Artefakte handelt. Die mangelnde Qualität vieler Studien zu der histopathologischen Wirkung von MP macht eine Abschätzung zu möglichen Schäden schwierig, auch wenn nicht auszuschließen ist, dass MP zu histopathologischen Veränderungen führen kann. In dem von mir durchgeführten Versuch führte Methiocarb und die Co-Exposition von Methiocarb und PS-MP in der semi-quantitativen Auswertung zu einem signifikant schlechteren Zustand der Leber und der Kieme. Die Leber der Forellen hatte einen verringerten Glykogengehalt, welcher zu atrophischen Zellen und vergrößerten Interzellularen führte. Zudem führte das Carbamat-Pestizid zu einer vermehrten Vakuolisierung, zu Entzündungen und zu fokalen Nekrosen (< 10% des Gewebes). In der Kieme wurde bei Fischen beider Versuchsgruppen, welche Methiocarb ausgesetzt waren, eine deutliche Zunahme von Hyperplasie und Hypertrophie beobachtet. Es kam vermehrt zur Fusion von Sekundärlamellen, es traten Ödeme und auf kleine Bereiche begrenzte Nekrosen auf. Auch in Regenbogenforellen wurden ähnliche histopathologische Effekte bei einer Exposition gegenüber Methiocarb gefunden (ALTINOK *et al.* 2006, ALTINOK & CAPKIN 2007). Im Vergleich scheinen Bachforellen sensitiver gegenüber Methiocarb zu reagieren als Regenbogenforellen.

Zusammenfassend wurden bei dem Versuch keine Effekte durch PS-MP auf juvenile Bachforellen beobachtet und die durch Methiocarb verursachten histopathologischen Veränderungen und Reduzierungen der AChE- und CbE-Aktivität wurden nicht durch die Co-Exposition mit PS-MP moduliert.

## 4.3 Kapitel III: Effekte von Amitriptylin und PS-Mikroplastik auf die Entwicklung von Bachforellen

H. SCHMIEG, J. K. Y. BURMESTER, S. KRAIS, A. S. RUHL, I. M. SCHMIDGALL, S. TISLER, C. ZWIENER, H.-R. KÖHLER, R. TRIEBSKORN: Interacting Effects of Polystyrene Microplastics and the Antidepressant Amitriptyline on Early Life Stages of Brown Trout (*Salmo trutta f. fario*).

Water **12** (9): 2361. 2020, doi: <https://doi.org/10.3390/w12092361>.

Im Rahmen dieser Studie wurde der Einfluss von PS-MP (< 50 µm) und dem Antidepressivum Amitriptylin als alleinige Stressoren und in Co-Exposition auf die Entwicklung von Bachforellen untersucht. Hierfür wurden zwei Versuche durchgeführt. Im ersten Experiment (Versuch 1) wurden die Auswirkungen von 100, 10<sup>4</sup> und 10<sup>5</sup> Partikel/L PS-MP auf die Entwicklung von Bachforellen getestet. Im ersten Teil des Versuchs wurden Forelleneier innerhalb von 24 h nach ihrer Befruchtung gegenüber PS-MP in Petrischalen exponiert. Nach dem Schlupf wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) die Struktur des Chorions der Forellen analysiert. Bei Aufzehrung des Dottersacks wurde ein Teil der Bachforellenlarven zur Analyse des Grads der LPO beprobt, während die restlichen Forellen für den zweiten Teil des Experiments in Aquarien umgesetzt und für einen weiteren Monat gegenüber den entsprechenden Partikelkonzentrationen exponiert wurden. Am Ende des zweiten Teils des ersten Versuchs wurde die Aktivität der SOD und das LPO-Level analysiert. Die Wasserparameter wurden 177 Tage nach der Fertilisation und bei Versuchsende bestimmt und lagen im Mittel bei einer Temperatur von 6,4 ± 0,5 °C, einem pH von 8,5 ± 0,1, einer Leitfähigkeit von 493,3 ± 7,3 µS/cm, sowie einer Sauerstoffkonzentration von 12,7 ± 0,2 mg/L und einer Sauerstoffsättigung von 107,3 ± 1,6 %.

Die mikroskopische Analyse des Chorions zeigte, dass die Eihülle von Bachforellen aus mehreren Schichten besteht und keine Poren im Mikrometerbereich besitzt. Die Embryonen kommen daher nicht direkt mit MP in Berührung. Auch für Blauaugen-Reisfische (*Oryzias melastigma*) und Zebraabärblinge wurde beschrieben, dass sich MP außen am Chorion anlagert, aber nicht in das Ei aufgenommen wird (LEMOINE *et al.* 2018, LI *et al.* 2020b, ZHANG *et al.* 2020, CHENG *et al.* 2021, CHEN *et al.* 2023). Selbst für NP ist die Aufnahme bei Zebraabärblingen über das Chorion gering (VAN POMEREN *et al.* 2017).

Auf Grund der protektiven Wirkung des Chorions wurden in einem zweiten Experiment (Versuch 3) Forelleneier erst ab dem Augenpunktstadium für 2 Monate gegenüber 10<sup>5</sup> und 10<sup>6</sup> Partikel/L PS-MP und pulsweise gegenüber Amitriptylin (Mittelwert 48 ± 33 µg/L) oder den jeweiligen binären Mischungen exponiert. Die Wasserwerte wurden bei Beginn des Versuchs, nach 55 Tagen und bei Versuchsende bestimmt (Temperatur: 7,1 ± 0,2 °C; pH: 8,3 ± 0,2;

## Ergebnisse und Diskussion

Leitfähigkeit:  $430,8 \pm 17,2 \mu\text{S}/\text{cm}$ ; Sauerstoffkonzentration:  $10,9 \pm 0,1 \text{ mg}/\text{L}$  und Sauerstoffsättigung:  $95,1 \pm 0,8 \%$ ). Neben Entwicklungsparametern wurden wie im ersten Versuch Auswirkungen auf das oxidative Stresslevel (SOD-Aktivität und Grad der LPO) und zusätzlich die Aktivität der AChE sowie zweier CbE, das Ruheverhalten der Forellen und das Verhalten unter Stressbedingungen (Videoaufzeichnung) untersucht. Die Konzentration des Antidepressivums Amitriptylin wurde in Poolproben durch Selina Tisler (Arbeitsgruppe Umweltanalytik, Universität Tübingen) bestimmt. In der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen, welche nur PS-MP enthielten, lag die Amitriptylinkonzentration konstant unter der Bestimmungsgrenze von  $10 \text{ ng}/\text{L}$ . Da in den Versuchsgruppen mit dem Antidepressivum bei Versuchsbeginn nur 56 % bis 76 % der nominalen Amitriptylinkonzentration von  $300 \mu\text{g}/\text{L}$  gemessen wurde und die Konzentration vor dem Wasserwechsel auf bis zu 6 % der nominalen Konzentration absank, wurde die zu erwartende Amitriptylinkonzentration über den Versuchsverlauf auf Basis der gemessenen Werte als Modell pseudo-erster Ordnung modelliert:

$$y = c_0 * e^{-k * t_{exp}} \quad (2)$$

Hierbei war  $c_0$  die Ausgangskonzentration und  $t_{exp}$  die Expositionszeit. Zur Anpassung des Modells wurden für  $k$  Werte zwischen 0,19 und 0,29 angenommen. Das Modell ergab eine pulsweise Exposition gegenüber Amitriptylin mit einer durchschnittlichen Amitriptylinkonzentration von  $48 \pm 33 \mu\text{g}/\text{L}$ . Amitriptylin ist bei pH 7 sehr stabil gegenüber Photolyse und Biodegradation (BAENA-NOGUERAS *et al.* 2017). Eine Verringerung der Amitriptylinkonzentration in der Wasserphase durch Sorption an die Oberflächen der verschiedenen verwendeten Gefäße ist wahrscheinlich. Es ist bekannt, dass die Amitriptylinkonzentration in Abwässern durch die schnell stattfindende Sorption an Kaolinit und Ca-Montmorillonit reduziert werden kann (Lv *et al.* 2013, CHANG *et al.* 2014). Vor Versuchsbeginn wurden die Aquarien mit den entsprechenden Testmedien gefüllt, um Verluste an Oberflächen so gering wie möglich zu halten. Neben einer weiteren Sorption an die Aquarien besteht zudem die Möglichkeit, dass Amitriptylin an Probenahmegefäße sowie Messzylinder sorbierte. Auch wenn es nicht beobachtet werden konnte, kann zudem eine unvollständige Lösung oder ein späteres Ausfallen von Amitriptylin nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Während des Versuchs wurde die Konzentration des Antidepressivums zudem durch die Aufnahme und die metabolische Umsetzung in den Bachforellen beeinflusst. Studien haben gezeigt, dass sich Amitriptylin in verschiedensten Geweben wie beispielsweise im Gehirn, der Kieme, den Augen und der Leber von Fischen mit Biokonzentrationsfaktoren zwischen 4 bis 325 anreichert und zu teilweise bioaktiven Metaboliten verstoffwechselt wird (LAJEUNESSE *et al.* 2011, MUIR *et al.* 2017, ZIARRUSTA *et al.* 2017, DAVID *et al.* 2018, GOULD *et al.* 2024). Im vorliegenden Versuch wurden trotz der fluktuierenden und deutlich niedrigeren Amitriptylinkonzentration starke, in den folgenden Abschnitten diskutierte, Effekte auf die frühen Entwicklungsstadien von

## Ergebnisse und Diskussion

Bachforellen beobachtet. Somit war die Beurteilung der durch Amitriptylin hervorgerufenen Auswirkungen sowie eine potenzielle Modulierung der Effekte durch PS-MP möglich.

In beiden Experimenten ergaben sich in keiner Versuchsgruppe Auswirkungen auf die Mortalitätsrate. Im ersten Experiment begann die Pigmentierung der Augen 37 dpf und war 55 dpf abgeschlossen. Die Forellen schlüpften im ersten Experiment (Versuch 1 – Exposition gegenüber MP) zwischen 68 und 84 dpf und im zweiten Experiment (Versuch 3 – Exposition gegenüber MP und Amitriptylin) im Mittel 11 d nach Versuchsbeginn. Die mittlere Herzschlagrate betrug im ersten Versuch 53 und im zweiten Experiment 56 Schläge/Minute (Temperatur 7,3 °C beziehungsweise 7,1 °C). Gegenüber PS-MP exponierte Bachforellen entwickelten sich in beiden Versuchen vergleichbar mit den Kontrollgruppen. Auch in anderen Studien wurden zumeist keine oder nur gering- bis mittelgradige Auswirkungen von MP und großem MP auf die Entwicklung von Fischen beobachtet (CHEN *et al.* 2017, LEMOINE *et al.* 2018, JAKUBOWSKA *et al.* 2020, LI *et al.* 2020b, MALAFAIA *et al.* 2020, CHENG *et al.* 2021, JAKUBOWSKA *et al.* 2022). In manchen Studien wurde hingegen eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit von gegenüber MP exponierten Fischen in frühen Entwicklungsstadien beschrieben (ZHANG *et al.* 2020, CHEN *et al.* 2023). CHEN *et al.* (2023) heben allerdings hervor, dass die gleichen Effekte auch bei einer Exposition gegenüber natürlichen Siliciumdioxidpartikeln auftraten (CHEN *et al.* 2023). Im Vergleich zu den Kontrolltieren schlüpften die gegenüber Amitriptylin und der Mischung von PS-MP und Amitriptylin exponierten Forellen in meinem Versuch circa 2 Tage früher und waren bei Versuchsende kleiner und hatten ein geringeres Körpergewicht. Auch bei Karpfen (*Cyprinus carpio*) und Zebrafischen wurde ein früherer Schlupf bei Exposition gegenüber Amitriptylin beobachtet (YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2017, GOULD *et al.* 2024). Eine sehr hohe Konzentration von 3 mg/L Amitriptylin kann hingegen auch einen verzögerten Schlupf von Zebrafischen verursachen (SEHONOVA *et al.* 2019a). Darüber hinaus beschrieben YANG *et al.* (2014), dass bereits eine Konzentration von 100 ng/L Amitriptylin über 120 h zu einer geringeren Körpergröße bei Zebrafischen führen kann, während in zwei anderen Studien keine oder nur geringgradige Auswirkungen auf die Körpergröße von Zebrafischen beobachtet wurden (WU *et al.* 2017a, GOULD *et al.* 2024).

Im zweiten Experiment befanden sich mit im Mittel 1,1 % signifikant weniger Tiere der Versuchsgruppe mit  $10^6$  Partikel/L PS-MP in ihrer Ruheposition in Seitenlage als in der Kontrollgruppe mit im Mittel 10 %. Da die Ausprägung dieses Effekts jedoch insgesamt sehr gering war, ist davon auszugehen, dass die biologische Relevanz vernachlässigbar ist. Es zeigte sich kein Einfluss von PS-MP auf das Verhalten der Fische unter Stressbedingungen. In der Literatur werden sehr unterschiedliche Auswirkungen durch MP auf das Verhalten von Fischen beschrieben. Vergleichbar zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden in manchen

## Ergebnisse und Diskussion

Studien keine oder nur geringfügige Auswirkungen von MP auf verschiedene Verhaltensparameter beobachtet (z. B. CHEN *et al.* 2017, TOSETTO *et al.* 2017, YANG *et al.* 2020), während in anderen Versuchen unterschiedlich starke Verhaltenseffekte durch MP-Exposition, aber auch durch Exposition gegenüber natürlichen Partikeln, beschrieben wurden (z.B. YIN *et al.* 2019, SUN *et al.* 2021, CHEN *et al.* 2023). Mögliche Gründe für ein verändertes Verhalten durch Partikelexposition können beispielsweise neurotoxische Effekte oder Auswirkungen auf den Energiemetabolismus sein (SUN *et al.* 2021). Nahezu alle gegenüber Amitriptylin oder der Mischung aus Amitriptylin und PS-MP exponierten Forellen waren in Ruheposition in Seitenlage, während dieses Verhalten nur bei 10 % der Tiere der Kontrollgruppe auftrat. Darüber hinaus wurde bei gegenüber Amitriptylin exponierten Tieren auch kreisförmiges Schwimmen und Schwimmen in Seitenlage beobachtet. Unter Stressbedingungen schwammen die Forellen langsamer, waren inaktiver und legten weniger Strecke zurück als Tiere in der Kontrollgruppe und der MP Versuchsgruppen. Zudem hatten gegenüber Amitriptylin exponierte Bachforellen mehr Körperkontakt als Tiere der Kontrollgruppe. Dieser Effekt war jedoch sehr variabel und nur bei der Co-Exposition von  $10^5$  Partikel/L PS-MP und Amitriptylin signifikant. Abnormale Bewegungsmuster wie Schwimmen auf der Seite wurden auch bei Exposition von Zebrabärblingen gegenüber 10 mg/L Amitriptylin berichtet (DEMIN *et al.* 2017). Auch MESHALKINA *et al.* (2018) beschrieben, dass gegenüber 50 µg/L Amitriptylin exponierte Zebrabärblinge weniger geradeaus und vermehrt im Kreis schwammen. Eine erhöhte Inaktivität von Fischen kann entweder auf einen reduzierten Fluchtreflex unter Stressbedingungen oder auf eine erhöhte Zeit in Schockstarre als Reaktion auf Stress zurückgeführt werden (STEWART *et al.* 2012). Auf Grund der bei Menschen beschriebenen Wirkung beruht der beobachtete Effekt vermutlich auf der angstlösenden und sedierenden Wirkung von Amitriptylin (SEIFERT *et al.* 2022, BAKKER *et al.* 2023). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde auch bei Zebrabärblingen eine reduzierte Aktivität durch eine Exposition gegenüber Amitriptylin festgestellt (DEMIN *et al.* 2017, MESHALKINA *et al.* 2018, HUANG *et al.* 2019, SEHONOVA *et al.* 2019a, LI *et al.* 2022, QIU *et al.* 2022, GOULD *et al.* 2024). Zudem wurde durch Amitriptylin eine verminderte Reaktion auf Stress bei Zebrabärblingen und ein verändertes Sozialverhalten beobachtet (DEMIN *et al.* 2020, LI *et al.* 2022, QIU *et al.* 2022, ZHANG *et al.* 2023). In den von mir durchgeführten Versuchen waren die Auswirkungen auf das Verhalten von Bachforellen durch Amitriptylin und die Mischung aus Amitriptylin und PS-MP vergleichbar. Bei Zebrabärblingen beobachteten ZHANG *et al.* (2023) eine leicht erhöhte Aktivität durch die Co-Exposition gegenüber Amitriptylin und PS-MP während SANTOS *et al.* (2024) eine geringgradig reduzierte Aktivität bei Exposition gegenüber Amitriptylin und PS-NP beschrieben.

In keiner Versuchsgruppe beider Experimente wurde ein Einfluss auf die Aktivität der SOD und das LPO-Level der Bachforellen nachgewiesen (vergleiche Diskussion 6.2). Ein Effekt durch

## Ergebnisse und Diskussion

Amitriptylin auf das oxidative Stresslevel wurden bei Zebrabärblingen (YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2019b, KARASAKAL *et al.* 2020), Karpfen (SEHONOVA *et al.* 2017) und Goldbrassen (BLANCO-RAYÓN *et al.* 2021) beobachtet, während in anderen Studien ebenfalls keine Effekte auf das oxidative Stresslevel bei Zebrabärblingen auftraten (ZHANG *et al.* 2023, SANTOS *et al.* 2024). Die uneinheitlichen Ergebnisse lassen sich auf verschiedene untersuchte Endpunkte des komplexen Abwehrsystems gegen oxidativen Stress, mögliche artspezifische Unterschiede und unterschiedliche Versuchsdesigns zurückführen.

Wie für juvenile Bachforellen unter 6.2 beschrieben und diskutiert, hatte PS-MP auch bei frühen Entwicklungsstadien der Bachforelle keinen Effekt auf die Aktivität der AChE und der zwei untersuchten CbE. Die Exposition gegenüber Amitriptylin und der Mischung von Amitriptylin und PS-MP führte im Gegensatz dazu bei Bachforellenlarven zu einer erhöhten AChE-Aktivität und reduzierten Aktivität der zwei CbE. Es ist bekannt, dass Amitriptylin an muskarinische ACh Rezeptoren bindet (SNYDER & YAMAMURA 1977) und die ACh Konzentration bei Zebrabärblingen beeinflussen kann (LI *et al.* 2022, QIU *et al.* 2022). Zudem wurden unterschiedliche durch Amitriptylin ausgelöste Effekte auf die AChE-Aktivität von Fischen beschrieben: Eine siebentägige Exposition mit 0,2 µg/L beziehungsweise 10 µg/L Amitriptylin hatte keine Auswirkung auf die AChE-Aktivität von Goldbrassen beziehungsweise Zebrabärblingen (BLANCO-RAYÓN *et al.* 2021, LI *et al.* 2022). Bei einer Exposition gegenüber 8,64 µg/L (4 beziehungsweise 30 Tage) wurde hingegen eine erhöhte AChE-Aktivität bei Zebrabärblingen festgestellt (KARASAKAL *et al.* 2020), während 3 mg/L (96 h) zu einer reduzierten Aktivität des Enzyms führten (SANTOS *et al.* 2024). Die in der Literatur beschriebenen Unterschiede lassen sich wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen wie Expositionszeitraum und Amitriptylinkonzentration zurückführen.

Mit Ausnahme des gering ausgeprägten Effekts auf das Ruheverhalten von Bachforellen wurden in den von mir durchgeführten Versuchen keine Auswirkungen durch PS-MP auf die Entwicklung von Bachforellen, die untersuchten Biomarker sowie die Verhaltensparameter beobachtet. Amitriptylin beeinflusste die Entwicklung der Forellen, führte zu einer Erhöhung der AChE-Aktivität, einer Reduzierung der CbE-Aktivität und zu starken Verhaltensveränderungen. PS-MP modulierte die durch Amitriptylin hervorgerufenen Effekte bei frühen Entwicklungsstadien von Bachforellen nicht.

## 4.4 Kapitel IV: Effekte von Amitriptylin und PS-Mikroplastik auf juvenile Bachforellen

H. SCHMIEG, S. KRAIS, K. KÜBLER, A. S. RUHL, I. M. SCHMIDGALL, C. ZWIENER, H.-R. KÖHLER, R. TRIEBSKORN: Effects of the Antidepressant Amitriptyline on Juvenile Brown Trout and Their Modulation by Microplastics.

Toxics **10** (12): 763. 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/toxics10120763>

In dieser Studie wurden Effekte des Antidepressivums Amitriptylin auf juvenile Bachforellen untersucht. Zusätzlich wurde betrachtet, ob die Co-Exposition mit PS-MP die Auswirkungen von Amitriptylin auf Bachforellen moduliert. Hierzu wurden in einem Versuch (Versuch 4) sieben Monate alte Bachforellen gegenüber nominal 0, 1, 10, 100, 300 und 1000 µg/L Amitriptylin exponiert. In einem weiteren Experiment (Versuch 5) wurden anschließend neun Monate alte Bachforellen nominal 100 µg/L Amitriptylin, 10<sup>4</sup> (MP<sub>tt</sub>) oder 10<sup>5</sup> Partikel/L PS-MP (MP<sub>ht</sub>) beziehungsweise der Co-Expositionen von nominal 100 µg/L Amitriptylin + 10<sup>4</sup> Partikel/L PS-MP (MIX<sub>tt</sub>) oder 100 µg/L Amitriptylin + 10<sup>5</sup> Partikel/L PS-MP (MIX<sub>ht</sub>) ausgesetzt. Während der Versuche wurde das Verhalten der Forellen (Position im Aquarium) fotografisch dokumentiert. Nach jeweils drei Wochen wurden die Tiere beprobt und Gewebeproben zur Bestimmung des Cortisolgehalts, der Aktivität der SOD sowie der AChE und zweier CbE und des LPO-Levels entnommen. Zusätzlich wurde pro Aquarium das Verhalten unter Stressbedingungen von je drei Tieren vor der Probenahme gefilmt. Die Amitriptylinkonzentration wurde in Poolproben durch die Arbeitsgruppe Umweltanalytik (Universität Tübingen) bestimmt. Die zu Beginn und am Ende der Experimente gemessenen Wasserparameter waren in beiden Versuchen in einem ähnlichen Bereich (Versuch 4: pH = 7,5 ± 0,2; Temperatur = 6,6 ± 0,3 °C; Leitfähigkeit = 481,5 ± 3,1 µS/cm; Sauerstoffkonzentration und -sättigung = 11,2 ± 0,1 mg/L beziehungsweise 96 ± 1 %; Versuch 5: pH = 7,6 ± 0,1; Temperatur = 6,4 ± 0,2 °C; Leitfähigkeit = 480,2 ± 4,7 µS/cm; Sauerstoffkonzentration und -sättigung = 11,2 ± 0,3 mg/L beziehungsweise 95 ± 2 %; Gesamthärte = 15,1 ± 0,5). In beiden Experimenten war die Nitritkonzentration ≤ 0,1 mg/L.

In den Kontrollgruppen und den Gruppen, welche nur MP enthielten, wurden keine Spuren von Amitriptylin nachgewiesen. Die analysierten Amitriptylinkonzentrationen lagen deutlich unter den nominalen Konzentrationen. Die Abweichung war bereits in den Stammlösungen feststellbar. Es wurde keine unvollständige Löslichkeit oder ein Niederschlag des Antidepressivums beobachtet. Dies kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden. Ein Abbau von Amitriptylin durch Biodegradation, Hydro- oder Photolyse ist bei den im Versuch bestehenden Bedingungen unwahrscheinlich (BAENA-NOGUERAS *et al.* 2017). Eine mögliche Erklärung ist, dass das Amitriptylin

teilweise an Bindungsstellen an dem Glas der verschiedenen Gefäße (Flaschen, Messzylinder und Aquarien) adsorbiert ist und dadurch nicht mehr in der Wasserphase gemessen werden konnte. Auch wenn die Diskrepanz der Amitriptylinkonzentration keine Ableitung genauer Effektkonzentrationen wie einer Effektschwelle (LOEC = Lowest Observed Effect Concentration) zulässt, war es möglich, Aussagen zu den durch das Antidepressivum hervorgerufenen Effekten zu treffen und eine mögliche Modulation dieser durch die Co-Exposition mit MP zu untersuchen:

In beiden Versuchen wurden keine signifikanten Auswirkungen auf Mortalität, Körperlänge und -gewicht der Forellen beobachtet. Jedoch zeigten die Forellen, welche gegenüber nominal 1000 µg/L Amitriptylin (Realkonzentration beziehungsweise gemessene Konzentration: 135 µg/L Amitriptylin) exponiert wurden, innerhalb von 24 h starke Beeinträchtigungen beim Schwimmen und Auffälligkeiten bei der Atmung. Die Versuchsgruppe wurde daher aus Tierwohlgründen umgehend anästhesiert und beprobt. Eine mögliche Erklärung für die schnell einsetzenden starken Effekte ist eine deutlich erhöhte Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt. Diese lebensbedrohliche Folge bei einer Überdosis trizyklischer Antidepressiva wurde beim Menschen beobachtet und als Serotoninsyndrom beschrieben (BOYER & SHANNON 2005, DEMIN *et al.* 2017). Die Fische, welche gegenüber nominal 300 µg/L Amitriptylin exponiert waren (Realkonzentration beziehungsweise gemessene Konzentration: 20 µg/L Amitriptylin), zeigten auffälliges Verhalten, wie Schwimmen in Seitenlage oder mit dem Bauch nach oben. Die Verhaltensauffälligkeiten nahmen im Verlauf des Versuchs zu und die Tiere mussten nach einer Woche beprobt werden, da die vorher festgelegten Abbruchkriterien erreicht wurden. In beiden Versuchen zeigten auch gegenüber nominal 100 µg/L Amitriptylin exponierte Forellen sowie Tiere aus der MIX<sub>tt</sub> Versuchsgruppe diese Verhaltensauffälligkeiten. Im Gegensatz zu der höheren Amitriptylinkonzentration trat das abnormale Verhalten allerdings jeweils nur für sehr kurze Zeitspannen auf, so dass von keiner maßgeblichen Beeinträchtigung des Tierwohls auszugehen war. Ähnliche Verhaltensauffälligkeiten wurden auch für Zebraäbrlinge beschrieben, welche für 20 min gegenüber 10 mg/L Amitriptylin exponiert wurden (DEMIN *et al.* 2017). Zudem hielten sich während beider meiner Versuche die Bachforellen der Versuchsgruppen mit nominal 100 µg/L Amitriptylin sowie der Gruppe MIX<sub>tt</sub> signifikant häufiger in der oberen Hälfte der Aquarien auf als die Kontrollgruppen. Dieser Effekt war hingegen nur abgeschwächt in der Versuchsgruppe MIX<sub>ht</sub> zu beobachten. Bei Zebraäbrlingen wurde ebenfalls ein häufigerer Aufenthalt in der oberen Hälfte eines neuen Aquariums („novel tank test“) bei Amitriptylinexposition beschrieben (DEMIN *et al.* 2017, MESHALKINA *et al.* 2018). Vermehrtes Erkunden und eine verminderte Aversion gegenüber helleren Bereichen eines Aquariums kann bei Fischen als verminderte Angstreaktion angesehen werden und lässt sich vermutlich auf die anxiolytische Wirkung von Amitriptylin zurückführen (MAXIMINO *et al.* 2010, STEWART *et al.* 2012). Wie unter 6.3 für Bachforellenlarven

beschrieben, zeigten auch in den Versuchen 4 und 5 gegenüber nominal  $\geq 10 \mu\text{g/L}$  ausgesetzte juvenile Forellen unter Stressbedingungen weniger Aktivität (Geschwindigkeit, zurückgelegte Distanz, mehr Zeit in Inaktivität) als die Kontrollgruppen. Durch Amitriptylin verursachte Hypoaktivität wurde auch durch andere Arbeitsgruppen bei Zebrabärblingen gezeigt (DEMIN *et al.* 2017, MESHALKINA *et al.* 2018, HUANG *et al.* 2019, SEHONOVA *et al.* 2019a, LI *et al.* 2022, QIU *et al.* 2022, GOULD *et al.* 2024). Die plausibelste Erklärung für die beobachteten Verhaltensänderungen ist, dass Amitriptylin bei Fischen vergleichbar zum Menschen sedierend und angstlösend wirkt. Es wurden keine Auswirkungen von PS-MP auf das Verhalten von Bachforellen beobachtet. Vergleichbar zu meinem Experiment beschrieben auch ZHANG *et al.* (2023) und SANTOS *et al.* (2024) geringgradige Modulationen auf das Verhalten bei der Co-Exposition von PS-MP beziehungsweise PS-NP und Amitriptylin im Vergleich zu deren Einzelwirkung.

Bei keiner Versuchsgruppe der Versuche 4 und 5 wurden Auswirkungen auf das oxidative Stresslevel gefunden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten aus der akuten Exposition von juvenilen Bachforellen gegenüber PS-MP (Versuch 2) und den Experimenten mit Bachforellenlarven (Versuch 1 und 3) überein. Eine detaillierte Diskussion zu den Ergebnissen anderer Studien zu Auswirkungen von PS-MP und Amitriptylin auf das oxidative Stresslevel von Fischen findet sich in Kapitel 6.2 beziehungsweise 6.3.

In Reaktion auf Stress kann in Fischen das Hormon Cortisol ansteigen. Es wurde gezeigt, dass das Antidepressivum Citalopram das Cortisollevel in Fischen reduzieren kann (WENDELAAR BONGA 1997, KEYSOMI *et al.* 2013). In den durchgeführten Versuchen wurde das Cortisollevel der juvenilen Forellen weder durch PS-MP noch durch Amitriptylin beeinflusst. Auch bei frühen Entwicklungsstadien von See- und Regenbogenforellen wurden keine signifikanten Auswirkungen von PS-MP auf das Cortisollevel beobachtet (JAKUBOWSKA *et al.* 2020, JAKUBOWSKA *et al.* 2022).

Im ersten Versuch (Versuch 4) führte die Exposition gegenüber nominal  $100 \mu\text{g/L}$  Amitriptylin zu einer signifikant erhöhten Aktivität der AChE. Dieser Effekt konnte allerdings nicht im zweiten Versuch (Versuch 5) beobachtet werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse bei den zwei von mir durchgeführten Versuchen sind vermutlich entweder auf die niedrigere Amitriptylinkonzentration im zweiten Versuch (Versuch 5) oder eine höhere Sensitivität der zwei Monate jüngeren Tiere (Versuch 4) zurückzuführen. Dies würde auch die ausgeprägteren Effekte auf die Aktivität der Enzyme bei Bachforellenlarven (siehe 6.3) erklären. Im Gegensatz zu Bachforellenlarven wurde bei juvenilen Forellen zudem auch keine Auswirkung von Amitriptylin auf die Aktivität der untersuchten CbE festgestellt. Wie bei einer akuten Exposition für 96 h (siehe 6.2) und bei Bachforellenlarven (siehe 6.3) diskutiert, hatte auch in Versuch 5 PS-MP keine Auswirkung auf die Aktivität der AChE und der zwei untersuchten CbE.

## Ergebnisse und Diskussion

Während die beobachteten Effekte bei einer Co-Exposition von  $10^4$  Partikel/L und Amitriptylin vergleichbar mit den Effekten des Antidepressivums als alleinigem Stressor waren, reduzierte die höchste eingesetzte PS-MP Konzentration von  $10^5$  Partikel/L den Einfluss von Amitriptylin auf das Verhalten der Tiere während des Versuchs. Eine mögliche Ursache ist, dass die hohe Partikelanzahl die Bioverfügbarkeit des Antidepressivums reduziert hat. WAGSTAFF *et al.* (2022) konnten zeigen, dass signifikante Mengen von Amitriptylin innerhalb von 24 h an Polyamid-MP adsorbieren (MP-Abwasser Verteilungskoeffizient von 749 L/kg).

Zusammenfassend hatten nominale Konzentrationen von 300 und 1000  $\mu\text{g/L}$  Amitriptylin so starke Auswirkungen auf juvenile Bachforellen, dass die Tiere aus Tierwohlgründen früher beprobt werden mussten. Niedrigere Konzentrationen des Antidepressivums beeinflussten das Verhalten sowie teilweise die Aktivität der AChE. Im Gegensatz dazu wurden keine negativen Auswirkungen auf juvenile Bachforellen durch die Exposition mit bis zu  $10^5$  Partikel/L PS-MP beobachtet. Einer der durch Amitriptylin verursachten Verhaltenseffekte wurde durch die Co-Exposition mit  $10^5$  Partikel/L reduziert.

## 5 Synthese

Die Ergebnisse der Versuche sind in den Tabellen 5 und 6 zusammengefasst. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die Annahme oder Ablehnung der übergeordneten Hypothesen. Nachfolgend werden die Fragestellungen der Arbeit diskutiert.

### 5.1 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

**Tabelle 5:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Expositionen gegenüber Einzelsubstanzen. Grüne Felder mit einem „=“ zeigen an, dass kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe auftrat. Gelbe Felder verdeutlichen einen Trend zu einem Effekt beziehungsweise, dass alle oder einzelne Tiere aus Tierwohlgründen euthanisiert wurden. Rote Felder heben eine signifikante Veränderung des Endpunkts im Vergleich zur Kontrollgruppe hervor. Pfeile geben die Richtung des Effekts an (↑ Erhöhung; ↓ Verringerung). Grau hinterlegte Felder verdeutlichen, dass der Endpunkt nicht untersucht wurde.

Einzelsubstanz		PS-MP		Amitriptylin		Methiocarb
Lebensstadium		Embryo/ Larven	Juvenile	Embryo/ Larven	Juvenile	Juvenile
Endpunkte						
Mortalität		=	=	=	Alle Tiere: ↑ ≥ 300 µg/L	Einzelne Tiere: ↑ 1 mg/L
Körperlänge und -gewicht		=	=	↓ 300 µg/L	=	=
Zeit bis Augenpunktstadium		=				
Zeit bis Schlupf		=		↓ 300 µg/L		
Herzschlagrate		=		=		
Ruheverhalten in Seitenlage		↓ 10 <sup>6</sup> Partikel/L*		↑ 300 µg/L		
Aufenthalt obere Hälfte des Aquariums			=		↑ 100 µg/L	
Verhalten unter Stress	Zurückgelegte Distanz	=	=	↓ 300 µg/L	↓ 10 µg/L	
	Ø Geschwindigkeit	=	=	↓ 300 µg/L	↓ ≥ 10 µg/L	
	Zeit in Inaktivität	=	=	↑ 300 µg/L	↑ ≥ 10 µg/L	
	Sozialverhalten	=		Trend: ↑ 300 µg/L		
AChE-Aktivität		=	=	↑ 300 µg/L	↑ 100 µg/L	↓ 1 mg/L
CbE-Aktivität		=	=	↓ 300 µg/L	=	↓ 1 mg/L
SOD-Aktivität		=	=	=	=	=
LPO-Gehalt		=	=	=	=	=
Stressproteinlevel (Hsp70)			=			=
Cortisollevel			=		=	
Histologie von Leber und Kieme			=			↓ 1 mg/L

\*Effekt biologisch nicht relevant.

## Synthese

**Tabelle 6:** Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Co-Exposition von Amitriptylin und Methiocarb mit PS-MP. Grüne Felder mit einem „=“ zeigen an, dass kein Unterschied bei diesem Endpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe auftrat. Gelbe Felder verdeutlichen einen Trend zu einem Effekt beziehungsweise, dass alle oder einzelne Tiere aus Tierwohlgründen euthanisiert wurden. Rote Felder heben eine signifikante Veränderung des Endpunkts im Vergleich zur Kontrollgruppe hervor. Pfeile geben die Richtung des Effekts an (↑ Erhöhung; ↓ Verringerung). Grau hinterlegte Felder verdeutlichen, dass der Endpunkt nicht untersucht wurde.

Co-Exposition		PS-MP und Amitriptylin		PS-MP und Methiocarb	
Lebensstadium		Embryo/ Larven	Juvenile		
Endpunkte					
Mortalität		=	=		Einzelne Tiere: ↑ 1 mg/L + 10 <sup>4</sup> Partikel/L
Körperlänge und -gewicht		↓ 300 µg/L + ≥ 10 <sup>5</sup> Partikel/L	=		=
Zeit bis Augenpunktstadium					
Zeit bis Schlupf		↓ 300 µg/L + ≥ 10 <sup>5</sup> Partikel/L			
Herzschlagrate		=			
Ruheverhalten in Seitenlage		↑ 300 µg/L + ≥ 10 <sup>5</sup> Partikel/L			
Aufenthalt obere Hälfte des Aquariums			↑ 100 µg/L + 10 <sup>4</sup> Partikel/L	= 100 µg/L + 10 <sup>5</sup> Partikel/L*	
Verhalten unter Stress	Zurückgelegte Distanz	↓ 300 µg/L + ≥ 10 <sup>5</sup> Partikel/L	↓ 100 µg/L + ≥ 10 <sup>4</sup> Partikel/L		
	Ø Geschwindigkeit	↓ 300 µg/L + ≥ 10 <sup>5</sup> Partikel/L	↓ 100 µg/L + ≥ 10 <sup>4</sup> Partikel/L		
	Zeit in Inaktivität	↑ 300 µg/L + ≥ 10 <sup>5</sup> Partikel/L	↑ 100 µg/L + ≥ 10 <sup>4</sup> Partikel/L		
	Sozialverhalten	↑ 300 µg/L + 10 <sup>5</sup> Partikel/L			
AChE-Aktivität		↑ 300 µg/L + ≥ 10 <sup>5</sup> Partikel/L	=		↓ 1 mg/L + 10 <sup>4</sup> Partikel/L
CbE-Aktivität		↓ 300 µg/L + ≥ 10 <sup>5</sup> Partikel/L	=		↓ 1 mg/L + 10 <sup>4</sup> Partikel/L
SOD-Aktivität		=	=		=
LPO-Gehalt		=	=		=
Stressproteinlevel (Hsp70)					=
Cortisollevel			=		
Histologie von Leber und Kieme					↓ 1 mg/L + 10 <sup>4</sup> Partikel/L

\*Unterschied im Vergleich zur Exposition gegenüber Amitriptylin als alleiniger Stressor.

## Synthese

**Tabelle 7:** Übersicht über die Annahme oder Ablehnung der übergeordneten Hypothesen:  
 ✓ = angenommen; ✗ = abgelehnt; ? = uneindeutig (Nr. = Nummer).

Fragestellung	Nr.	Hypothese	Fazit	Begründung
Auswirkungen von PS-MP	1	PS-MP beeinträchtigt die Entwicklung von Bachforellen.	✗	Abgelehnt: Keine Effekte beobachtet.
	2	PS-MP verändert das Verhalten von Bachforellen.	✗	Abgelehnt: Keine Effekte beobachtet.
	3	Molekulare Biomarker sowie der Gewebezustand der Leber und Kieme von Bachforellen werden negativ durch PS-MP beeinflusst.	✗	Abgelehnt: Keine Effekte beobachtet.
	4	Höhere Konzentrationen PS-MP haben stärkere Effekte auf Bachforellen als niedrigere Konzentrationen.	✗	Abgelehnt: Keine Effekte beobachtet.
Auswirkungen von Methiocarb	5	Methiocarb hat negative Effekte auf molekulare Biomarker sowie den Gewebezustand der Leber und Kieme von Bachforellen.	✓	Angenommen: Hemmung der AChE- und CbE-Aktivität und Verschlechterung des Gewebezustands von Leber und Kieme.
Auswirkungen von Amitriptylin	6	Amitriptylin beeinträchtigt die Entwicklung von Bachforellen.	✓	Angenommen: Früherer Schlupf, verringerte Körperlänge und Gewicht.
	7	Amitriptylin beeinflusst das Verhalten von Bachforellen.	✓	Angenommen: Verändertes Ruheverhalten, Verhalten während der Versuche und unter Stress.
	8	Amitriptylin hat negative Effekte auf molekulare Biomarker der Bachforelle.	✓	Angenommen: Erhöhung der AChE- und Verringerung der CbE-Aktivität.
	9	Höhere Konzentrationen Amitriptylin haben stärkere Effekte auf Bachforellen als niedrigere Konzentrationen.	✓	Angenommen: Effekte ab nominal $\leq 10\mu\text{g/L}$ Amitriptylin. Deutlichste Effekte bei nominal 300 und 1000 $\mu\text{g/L}$ Amitriptylin.
Auswirkungen der Co-Exposition	10	Die durch Methiocarb und Amitriptylin verursachten Effekte werden durch PS-MP verstärkt oder reduziert.	✓ / ✗	Teilweise angenommen: Keine Auswirkungen bei der Co-Exposition von PS-MP und Methiocarb. Reduzierung eines Amitriptylin verursachten Verhaltenseffekts.
Sensitivität unterschiedlicher Lebensstadien	11	Das Chorion schützt Embryonen zu einem gewissen Grad vor Effekten durch PS-MP.	✓	Angenommen: REM-Bilder zeigen, dass MP ohne Verletzung das Chorion nicht passieren können.
	12	Nach dem Schlupf reagieren jüngere Lebensstadien der Bachforelle sensibler auf die Exposition gegenüber PS-MP und Amitriptylin als ältere Lebensstadien.	?	Nicht eindeutig: Bei keinem Lebensstadium biologisch relevante Effekte durch PS-MP; Alle Lebensstadien wurden durch Amitriptylin beeinträchtigt, ein direkter Vergleich ist jedoch schwierig.

## 5.2 Fragestellung I: Hat Polystyrol-Mikroplastik negative Effekte auf Bachforellen unterschiedlicher Lebensstadien? In welchem Konzentrationsbereich treten diese Effekte auf?

In den durchgeführten Versuchen konnten keine negativen Auswirkungen durch PS-MP auf die Entwicklung oder Überlebenswahrscheinlichkeit von Bachforellen beobachtet werden. Zudem verursachte PS-MP keine adversen Effekte auf das oxidative Stresslevel (SOD-Aktivität und LPO-Gehalt), das Stressproteinlevel (Hsp70-Level), den Cortisolgehalt und die Aktivität von AChE und zweier CbE in verschiedenen Lebensstadien der Bachforelle. Des Weiteren traten keine histopathologischen Veränderungen in der Leber und den Kiemen bei gegenüber PS-MP exponierten Forellen auf. Während das Ruheverhalten bei gegenüber  $10^6$  Partikel/L PS-MP exponierter larvaler Bachforellen geringfügig verändert war, wurden keine Verhaltensveränderungen unter Stressbedingungen sowie auf die Position im Aquarium beobachtet. Auf Grund der geringgradigen Ausprägung scheint die Auswirkung von PS-MP auf das Ruheverhalten der Bachforellenlarven biologisch nicht relevant zu sein.

**Zusammenfassend wurden weder bei der umweltrelevanten Konzentration von 100 Partikel/L PS-MP über 182 d noch bei deutlich über den bisher valide in der Umwelt gemessenen Partikelkonzentration von bis zu einer Millionen Partikel/L PS-MP biologisch relevante Effekte bei Bachforellen beobachtet.**

Zu berücksichtigen ist jedoch, dass sich diese Aussage auf das an der Universität Tübingen untersuchte PS-MP bezieht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass PS-MP mit beispielsweise anderen Additiven oder einer anderen Partikelgröße negative Folgen auf Fische in der Umwelt haben kann. Eine umfassende Bewertung des Umweltrisikos durch MP auf Fische ist herausfordernd: Die vielfältigen Versuchsdesigns, die unterschiedlichen untersuchten Partikel (Polymere, Form, Größe, Additive) und zum Teil die Qualität der Studien erschweren die Vergleichbarkeit der wissenschaftlichen Untersuchungen. In wissenschaftlichen Studien wurden unter anderem neuro- und embryotoxische Effekte, histopathologische Veränderungen sowie Auswirkungen auf das oxidative Stresslevel, das Immunsystem, den Energie- und Fettstoffwechsel und das Verhalten von Fischen durch MP beschrieben (z. B. OLIVEIRA *et al.* 2013, WEN *et al.* 2018, ESPINOSA *et al.* 2019, QIAO *et al.* 2019, ZHANG *et al.* 2020, SOLOMANDO *et al.* 2021, SUN *et al.* 2021, CHEN *et al.* 2023). In der unter Kapitel 4.1 beschriebenen Literaturstudie zeigte sich, dass die meisten dieser Effekte nach Exposition gegenüber nicht umweltrelevanten Partikelkonzentrationen auftraten. Die Studien geben somit Aufschluss über ein mögliches

Gefahrenpotential von MP für Organismen, während die Wahrscheinlichkeit, dass diese Gefahren in der Umwelt eintreten, also das von MP ausgehende Risiko, gering ist oder nicht abgeschätzt werden kann. Die Mehrheit der Partikel, auf welche ein Organismus im Süßwasser trifft, ist natürlichen Ursprungs. So zeigen die im Rahmen der im MiWa Projekt durchgeführten Literaturstudie veröffentlichten Daten, dass in der Elbe pro eine Million gefundener Partikel circa 10 aus Kunststoff bestehen. Daher sollte zur Einordnung der beobachteten Effekte, sofern möglich, ein Abgleich mit Effekten durch natürliche Partikel wie bei CHEN *et al.* (2023) erfolgen. Insgesamt erscheint das Umweltrisiko durch MP nach aktuellem Wissenstand eher gering (BURNS & BOXALL 2018, EUROPEAN COMMISSION 2019, VÖLKER *et al.* 2020, CATARINO *et al.* 2021, WARDMAN *et al.* 2021). Dennoch kann die Verschmutzung mit MP in bestimmten Fällen zu schwerwiegenden Folgen auf Biota führen. Ein Beispiel hierfür verdeutlicht die Studie von TIAN *et al.* (2021) zur Auswirkung von Reifenabrieb auf Silberlachse. Im Vergleich zu größeren Partikeln sind die Auswirkungen kleiner MP- oder NP-Partikel potenziell relevanter für die Umwelt. Es ist wahrscheinlich, dass die Umweltkonzentration kleiner Partikel deutlich über der von größeren MP-Partikeln liegt. Zudem ist eine Gewebetranslokation unter bestimmten Voraussetzungen plausibel und eine Modulation der Wirkung anderer Umweltschadstoffe durch das höhere Verhältnis von Oberfläche zu Volumen wahrscheinlicher.

Die Umwelt ist ubiquitär mit persistentem MP belastet und die Verschmutzung mit MP wird voraussichtlich in Zukunft weiter ansteigen (LU *et al.* 2021, GAO *et al.* 2024, POTTINGER *et al.* 2024, THOMPSON *et al.* 2024). Unstrittig ist, dass Kunststoffe nicht in die Umwelt gehören und eine weitergehende Verschmutzung der Umwelt mit Makro-, Mikro und Nanoplastik verhindert werden sollte (WARDMAN *et al.* 2021, POTTINGER *et al.* 2024, THOMPSON *et al.* 2024). Eine Risikokommunikation zu MP sollte dabei umsichtig und mit einer klaren Abgrenzung zur Problematik durch Makroplastik erfolgen. Es sollten weder die bisher in wissenschaftlichen Untersuchungen beobachteten Auswirkungen von MP übertrieben dargestellt werden noch potenzielle Folgen vollständig negiert werden. Auf Grund der Komplexität der Problematik und den bestehenden Wissenslücken bezüglich der Probenahme, Probenaufbereitung und Analytik, insbesondere für kleine Partikelgrößen, sowie den Unsicherheiten im Wirkmechanismus der beobachteten Effekte ist weitere zielgerichtete und qualitativ hochwertige Forschung in diesem Bereich notwendig.

### 5.3 Fragestellung II: Beeinflusst die als Wirkkonzentration bei anderen Fischarten bekannte Konzentration von 1 mg/L Methiocarb die Gesundheit juveniler Bachforellen

Die nominale Konzentration von 1 mg/L Methiocarb führte bei vier von insgesamt 60 Bachforellen zu einem so schlechten Allgemeinzustand, dass sie aus Gründen des Tierwohls aus dem Versuch entnommen wurden. Darüber hinaus verursachte Methiocarb eine Hemmung der AChE- und CbE-Aktivität. Dieser Wirkmechanismus entspricht der bekannten Wirkung von Carbamat-Pestiziden (FUKUTO 1990, GUPTA 2014). Die Exposition gegenüber Methiocarb führte zudem zu einem signifikant schlechteren histopathologischen Zustand der Leber und Kieme der Bachforellen. Die beobachteten Effekte ähneln den für höhere Konzentrationen beschriebenen Auswirkungen von Methiocarb auf Regenbogenforellen (ALTINOK *et al.* 2006, ALTINOK & CAPKIN 2007). Methiocarb hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der SOD und den Grad der Lipidperoxidation sowie auf das Hsp70-Level der juvenilen Bachforellen. Bezogen auf die LC<sub>50</sub> Daten erscheinen Invertebraten sensibler auf Methiocarb zu reagieren als Fische (JURADO *et al.* 2022).

Ziel des Versuchs war es, eine mögliche Modulation der Wirkung des Pestizids durch PS-MP zu untersuchen. Daher wurde bewusst eine Methiocarbkonzentration gewählt, welche sehr wahrscheinlich Effekte bei den Bachforellen verursacht. Die eingesetzte Konzentration von nominal 1 mg/L lag allerdings deutlich über den gemessenen Umweltkonzentration von wenigen ng pro Liter bis zu 5400 ng/L Methiocarb (GARCÍA DE LLASERA & BERNAL-GONZÁLEZ 2001) und der geschätzte PNEC von 2 ng/L bis 100 ng/L Methiocarb (LOOS *et al.* 2018).

Die EU ist 2019 zu dem Entschluss gekommen, dass die Anwendung von Methiocarb in Pflanzenschutzmitteln ein unannehmbares Risiko für Arbeitnehmer sowie ein hohes Risiko für Vögel, Säuger und Regenwürmer birgt und hat daher die Zulassung des Wirkstoffs nicht erneuert (EU 2019). Solange es nicht zu einer illegalen Anwendung kommt, ist davon auszugehen, dass die Umweltkonzentration von Methiocarb in der EU weiter zurückgeht und keine relevante Gefährdung für Nicht-Zielorganismen mehr besteht. In Ländern, in welchen Methiocarb weiterhin in Pestizidprodukten eingesetzt wird, sollten bei einer Abschätzung möglicher Folgen auch Mischungseffekte berücksichtigt werden. Es ist möglich, dass bei einer gleichzeitigen Exposition von Stoffen, insbesondere solchen mit einem ähnlichen Wirkmechanismus, in Nicht-Zielorganismen additive oder sogar synergistische Effekte auftreten können (SCHWARZENBACH *et al.* 2006, HERNÁNDEZ *et al.* 2017).

**Insgesamt betrachtet verursachte Methiocarb bei Bachforellen eine Hemmung der AChE- sowie der CbE-Aktivität und eine Verschlechterung des histopathologischen Zustands von Leber und Kieme. Die getestete Konzentration lag dabei deutlich über den in der Umwelt gemessenen Konzentrationen. Das von Methiocarb ausgehende Umweltrisiko für Bachforellen ist aufgrund der niedrigen Umweltkonzentrationen sowie dem Verbot des Pestizids in der EU in Deutschland aktuell sehr niedrig.**

#### 5.4 Fragestellung III: Beeinflusst das Antidepressivum Amitriptylin die Gesundheit von Bachforellen unterschiedlicher Lebensstadien? In welchem Konzentrationsbereich treten Wirkungen auf?

Nominal 1000 µg/L Amitriptylin (gemessen 135 µg/L Amitriptylin) sowie nominal 300 µg/L Amitriptylin (gemessen 20 µg/L) verursachten so starke Effekte bei juvenilen Bachforellen, dass diese aus Tierwohlgründen euthanasiert werden mussten. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass wildlebende Fische, welche anderen Stressoren wie Strömung und Prädatoren ausgesetzt sind, in dem beobachteten Zustand in der Umwelt überlebensfähig wären. Nominal 300 µg/L Amitriptylin (gemessen 48 µg/L Amitriptylin) beeinflusste die Entwicklung von Bachforellen und führte zu einem früheren Schlupf sowie einem geringeren Wachstum, während keine Veränderung der Herzschlagrate auftrat. Dass sich Amitriptylin auf den Schlupf und das Wachstum von Fischen auswirken kann, wurde auch für Karpfen und Zebraäbrlinge beschrieben (YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2017, SEHONOVA *et al.* 2019a, GOULD *et al.* 2024). YANG *et al.* (2014) beobachteten dabei bereits ein reduziertes Wachstum von Zebraäbrlingslarven bei einer Exposition gegenüber 100 ng/L Amitriptylin. Eine geringere Körpergröße kann in der Umwelt sowohl weniger Energiereserven bedeuten als auch zu einem höheren Risiko durch Prädation und zu einer geringeren Fekundität führen (PARADIS *et al.* 1996, KOOPS *et al.* 2004).

Sowohl bei frühen Entwicklungsstadien als auch bei juvenilen Bachforellen führte die Exposition gegenüber Amitriptylin zu einer Verhaltensänderung. Während des Versuchs hielten sich juvenile Bachforellen vermehrt in der oberen Hälfte der Aquarien auf, Bachforellenlarven waren in Ruheposition fast ausschließlich in Seitenlage. Unter Stress (helles Licht, wenig Wasser, keine Belüftung) legten Bachforellen, welche gegenüber Amitriptylin exponiert waren, weniger Distanz zurück, waren inaktiver und schwammen mit einer reduzierten mittleren Geschwindigkeit. Zudem war die Zeit, in welcher Bachforellenlarven Körperkontakt zu ihren Artgenossen hatten, in den Versuchsgruppen mit Amitriptylin erhöht. Bei Effekten auf das Verhalten lag die LOEC bei nominal 10 µg/L Amitriptylin. Der beobachtete Effekt auf das Schwimmverhalten juveniler

Forellen während des Versuchs lässt sich vermutlich auf die anxiolytische Wirkung von Amitriptylin zurückführen. Ein vermehrtes exploratives Verhalten und keine Präferenz für dunklere Bereiche eines Aquariums gilt als mutigeres Verhalten bei Fischen (MAXIMINO *et al.* 2010, STEWART *et al.* 2012). Die Hypoaktivität unter Stressbedingungen lässt sich hingegen entweder auf einen reduzierten Fluchreflex oder auf die sedierende Wirkung von Amitriptylin zurückführen. Die von mir gewonnenen Ergebnisse ergänzen Beschreibungen zu durch Amitriptylin verursachten Verhaltensveränderungen bei Zebraärblingen (DEMIN *et al.* 2017, MESHALKINA *et al.* 2018, HUANG *et al.* 2019, SEHONOVA *et al.* 2019a, DEMIN *et al.* 2020, LI *et al.* 2022, QIU *et al.* 2022, ZHANG *et al.* 2023, GOULD *et al.* 2024). Verhaltensveränderungen, wie die durch Amitriptylin induzierte Hypoaktivität bei Bachforellen, können populationsrelevante Auswirkungen haben und beispielsweise das Prädationsrisiko maßgeblich erhöhen oder den Fortpflanzungserfolg beeinflussen (SCOTT & SLOMAN 2004).

In keinem der drei Versuche verursachte die Exposition mit Amitriptylin eine Veränderung der SOD-Aktivität oder des Grades der Lipidperoxidation bei Bachforellen. Auch das Cortisollevel juveniler Bachforellen wurde nicht durch die Exposition gegenüber Amitriptylin beeinflusst. Während in den Studien von ZHANG *et al.* (2023) und SANTOS *et al.* (2024) ebenfalls keine Effekte auf das oxidative Stresslevel von Zebraärblingen beobachtet wurden, beeinflusste die Exposition gegenüber dem Antidepressivum das oxidative Stresslevel von Fischen in mehreren weiteren Studien (YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2017, SEHONOVA *et al.* 2019b, KARASAKAL *et al.* 2020, BLANCO-RAYÓN *et al.* 2021). Die beschriebenen Unterschiede lassen sich vermutlich auf die unterschiedlichen Versuchsdesigns sowie die Komplexität des Abwehrsystems gegen oxidativen Stress zurückführen.

In Reaktion auf Amitriptylin war die AChE-Aktivität bei frühen Entwicklungsstadien der Bachforelle sowie sieben Monate alten Bachforellen erhöht. Darüber hinaus war die Aktivität der zwei untersuchten CbE bei gegenüber Amitriptylin exponierten Bachforellenlarven verringert. Amitriptylin bindet an muskarinische ACh Rezeptoren, dies kann eine Auswirkung auf die AChE erklären (SNYDER & YAMAMURA 1977).

**Zusammenfassend ergaben die an der Universität Tübingen durchgeführten Versuche, dass Amitriptylin starke Effekte in Bachforellen verursachen kann. Aufgrund der Unsicherheit bezüglich der Realkonzentrationen in den Versuchen ist eine genaue Abschätzung der LOEC nicht möglich. Die LOEC liegt allerdings bei oder unter den nominal eingesetzten 10 µg/L Amitriptylin. Darüber hinaus lassen die nominalen und gemessenen Konzentrationen den Rückschluss zu, dass Amitriptylin in einem Konzentrationsbereich von 1-300 µg/L zu möglicherweise populationsrelevanten Effekten bei Bachforellen führt.**

## Synthese

Da es sich bei Amitriptylin um einen vor 2006 zugelassenen Wirkstoff handelt, gibt es keine offizielle gestufte Umweltrisikobewertung nach Richtlinie 2001/83/EG und dem Arzneimittelgesetz (EU 2001, AMG 2005). Nach den Standards der Umweltrisikobewertung von Humanarzneimitteln lässt sich jedoch die geschätzte Umweltkonzentration (PEC – predicted no effect concentration) ableiten. Um ein Umweltrisiko zu vermeiden, werden vor dem Hintergrund des Vorsorgeprinzips eher Werte angenommen, welche die PEC über- als unterschätzen (EMA 2024).

$$PEC_{\text{Oberflächenwasser}} = \frac{\text{Dosis} * \text{Marktdurchdringungsfaktor}}{\text{Abwassermenge} * \text{Verdünnungsfaktor}} \quad (3)$$

Bei der Berechnung wird die maximale tägliche Dosis der Arzneimittel als Dosis angenommen. Diese liegt für Amitriptylin bei 300 mg/Tag/Person (FREISSMUTH *et al.* 2020). Als Marktdurchdringungsfaktor wird ein Standardwert von 1 % verwendet. Alternativ wäre es bei ausreichender Datenlage möglich, den Marktdurchdringungsfaktor durch belegte Daten zu Patientenzahlen genauer abzuschätzen. Für die Abwassermenge wird standardmäßig ein Wert von 200 L/Person/Tag angenommen und für den Verdünnungsfaktor ein Wert von 10 (EMA 2024). Dadurch ergibt sich eine PEC für Amitriptylin von 1,5 µg/L. Die in der Umwelt gemessenen Amitriptylinkonzentrationen (MEC – measured environmental concentration) liegen mit maximal 196 ng/L deutlich unter der konservativ berechneten PEC (PIVETTA *et al.* 2020). Eine Ausnahme bildet dabei ein in Tschechien gemessener Wert von 7,46 µg/L Amitriptylin in einem durch die Arzneimittelindustrie verschmutzten Grundwasserbrunnen (LHOTSÝ *et al.* 2017). Überschreitet die PEC eines Humanarzneimittels 10 ng/L, erfolgt nach der gestuften Risikobewertung eine detailliertere Abschätzung des Umweltrisikos. In der zweiten Stufe der Risikobewertung werden Stoffeigenschaften und die Ökotoxizität der Arzneimittel berücksichtigt. Zur Berechnung eines Risikoquotienten (RQ) wird die PEC mit der PNEC verglichen. Als PNEC wird dabei die niedrigste Konzentration, welche einen Effekt bei 10 % der Tiere verursacht (EC<sub>10</sub>), aus ökotoxikologischen Versuchen mit Arten unterschiedlicher Trophieebenen eingesetzt und durch einen Sicherheitsfaktor von 10 dividiert. Alternativ zur EC<sub>10</sub> wird die niedrigste Konzentration, bei welcher keine Effekte auftraten (NOEC – no observed effect concentration) verwendet (EMA 2024).

$$RQ_{\text{Oberflächenwasser}} = \frac{PEC_{\text{Oberflächenwasser}}}{PNEC_{\text{Oberflächenwasser}}} \quad (4)$$

Ein RQ ≥ 1 wird dabei als hohes Umweltrisiko eingestuft und ein RQ ≥ 0,1 als mittleres Umweltrisiko (ZHOU *et al.* 2019). Bei Bachforellen wurden Effekte auf das Verhalten ab einer nominalen Konzentration von 10 µg/L Amitriptylin beobachtet (LOEC). Die korrespondierende NOEC lag bei nominal 1 µg/L. Damit ergibt sich auf Basis der durchgeführten Versuche mit einem RQ von 15 ein hohes Umweltrisiko durch Amitriptylin. Auch bei einem weniger konservativen

Ansatz (Abgleich der MEC mit auf NOEC oder LOEC basierenden PNECs) ergibt sich mit einem RQ  $> 0,1$  beziehungsweise RQ  $> 1$  ein mittleres bis hohes Umweltrisiko (ZHOU *et al.* 2019). Die im Rahmen meiner Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstützen die Aussage, dass Amitriptylin zu den neuroaktiven Wirkstoffen mit einem wahrscheinlich hohen Risiko für Wildfische gehört (DUARTE *et al.* 2022, SUMPTER & MARGIOTTA-CASALUCI 2022). In der Literatur sind darüber hinaus Effekte durch das Antidepressivum auf Fische in einem direkt umweltrelevanten Bereich beschrieben (YANG *et al.* 2014, GOULD *et al.* 2024). Bei ionisierbaren Substanzen wie Amitriptylin sollte zudem bei der Beurteilung von Effekten der pH-Wert berücksichtigt werden, da der neutrale beziehungsweise der geladene Anteil des Wirkstoffs unterschiedlich zur Toxizität beitragen. So ist die Base Amitriptylin bei einem pH von 9 deutlich toxischer als bei niedrigerem pH (KÖHLER *et al.* 2023).

**Ungeachtet dessen werden zumeist in der Umwelt nur sehr niedrige und höchst wahrscheinlich unproblematische Konzentrationen von Amitriptylin nachgewiesen. Werden jedoch höhere Amitriptylinkonzentrationen in einer Umweltprobe detektiert, muss von einem möglichen Effekt auf Fische ausgegangen und Risikominderungsmaßnahmen in Betracht gezogen werden. Zusätzlich sollte ein Beitrag von Amitriptylin zur Mischungstoxizität in Umweltproben berücksichtigt werden, insbesondere wenn mehrere Substanzen mit einem vergleichbaren Wirkmechanismus in einer Probe nachgewiesen werden.**

### 5.5 Fragestellung IV: Moduliert die Co-Exposition von Methiocarb beziehungsweise Amitriptylin mit Polystyrol-Mikroplastik die Wirkung des Arzneimittels oder des Pestizids auf Bachforellen?

Neben der Wirkung der Einzelstoffe Methiocarb und Amitriptylin auf Bachforellen sollte in den durchgeführten Versuchen untersucht werden, ob sich die Effekte einer Co-Exposition mit PS-MP von den alleinigen Auswirkungen der Substanzen unterscheidet. Bei einer Co-Exposition von MP und organischen Schadstoffen in Aquarien stellt sich ein Gleichgewicht der organischen Schadstoffe zwischen der wässrigen Phase und der Sorption an Oberflächen wie die des MP ein. Organische Schadstoffe können dabei sowohl aus der Wasserphase als auch zusammen mit MP in den Organismus aufgenommen werden (HEINRICH *et al.* 2020). In wissenschaftlichen Studien zu MP werden häufig Interaktionen mit anderen Schadstoffen beobachtet, welche sowohl zu einer Verstärkung (z.B. OLIVEIRA *et al.* 2013, NEMATDOOST HAGHI & BANAEI 2017, ZHAO *et al.* 2020) als auch zu einer Reduktion (z.B. CHEN *et al.* 2017, REHSE *et al.* 2018, LI *et al.* 2020b) der Effekte der Einzelsubstanzen führen können.

## Synthese

Die Co-Exposition von Methiocarb und PS-MP verursachte die gleichen Effekte bei juvenilen Bachforellen wie die Exposition ausschließlich gegenüber Methiocarb. In beiden Versuchsgruppen mussten einzelne Tiere auf Grund ihres schlechten Allgemeinzustands euthanisiert werden. Darüber hinaus wurden bei den gegenüber Methiocarb sowie der Mischung aus Methiocarb und PS-MP exponierten Fischen eine Hemmung der AChE- und CbE-Aktivität sowie vergleichbare Reaktionen in Kieme und Leber beobachtet. In keiner Versuchsgruppe traten Auswirkungen auf das Gewicht sowie Effekte auf das oxidative Stresslevel oder auf das Stressproteinlevel auf.

Auch in dem Versuch zu Effekten von PS-MP und Amitriptylin in Bachforellenlarven waren die Effekte der Einzel-Exposition gegenüber Amitriptylin sowie der Co-Exposition beider Stoffe vergleichbar: Es traten keine Effekte auf die Mortalität, die Herzschlagrate oder das oxidative Stresslevel bei alleiniger oder Co-Exposition gegenüber Amitriptylin und PS-MP auf. In den drei Versuchsgruppen (Amitriptylin, Amitriptylin +  $10^5$  Partikel/L PS-MP und Amitriptylin +  $10^6$  Partikel/L PS-MP) schlüpfen die Forellen früher, hatten eine geringere Körpergröße sowie ein geringeres Gewicht und zeigten deutliche Verhaltensveränderungen. Darüber hinaus war in den Tieren der drei Versuchsgruppen im Vergleich zu Forellen der Kontrollgruppe die AChE-Aktivität erhöht und die CbE-Aktivität reduziert. Einzig die Zeit des Körperkontakts als Parameter für das Sozial- und Schwarmverhalten war nur in der Versuchsgruppe mit Amitriptylin +  $10^5$  Partikel/L PS-MP im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, während in den Versuchsgruppen mit nur Amitriptylin und Amitriptylin +  $10^6$  Partikel/L PS-MP nur ein Trend zu vermehrtem Körperkontakt der Tiere beobachtet wurde. Die Werte des Verhaltensparameter waren jedoch insgesamt sehr variabel und die absolute Differenz der Mittelwerte der drei Versuchsgruppen mit Amitriptylin vergleichbar gering. Berücksichtigt man zudem, dass keine Konzentrations-Wirkungsbeziehung in Bezug auf die Partikelanzahl besteht, ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei dem beobachteten Effekt auf das Schwarmverhalten um eine Verstärkung der Wirkung des Amitriptylins durch PS-MP handelt.

Im Gegensatz dazu wurde bei juvenilen Bachforellen die Ausprägung des Effekts des Antidepressivums auf das Schwimmverhalten während des Versuchs durch die Co-Exposition mit  $10^5$  Partikel/L PS-MP deutlich reduziert. Amitriptylin kann bei umweltrelevanten Bedingungen an MP sorbieren (WAGSTAFF *et al.* 2022). Eine mögliche Erklärung für die verringerte Auswirkung auf das Schwimmverhalten während des Versuchs durch die Co-Exposition von Amitriptylin mit einer hohen Konzentration PS-MP ist daher, dass die Bioverfügbarkeit des Antidepressivums durch Sorption an die Partikel reduziert war. Die Effekte auf das Verhalten in einer stressauslösenden Umgebung waren hingegen vergleichbar zwischen der Versuchsgruppe mit ausschließlich Amitriptylin sowie den Mischungen aus Amitriptylin und  $10^4$  Partikel/L PS-MP beziehungsweise  $10^5$  Partikel/L PS-MP. Bei den übrigen untersuchten Parametern trat in keiner Versuchsgruppe

eine Veränderung zur Kontrollgruppe auf. Auch SANTOS *et al.* (2024) und ZHANG *et al.* (2023) zeigten in ihren Studien, dass die Wechselwirkungen von PS-NP beziehungsweise PS-MP und Amitriptylin komplex sind. Gründe für die verschiedenen Interaktionen können die unterschiedlichen Konzentrationen des Antidepressivums und der Partikel, aber beispielsweise auch die Partikelgröße sein.

Im Vergleich zu natürlichen Partikeln ist die Anzahl an NP und MP-Partikeln in Fließgewässern relativ gering. So wurden im Rahmen des MiWa Projekts in der Elbe pro eine Million gefundener Partikel circa 10 aus Kunststoff nachgewiesen. Es ist daher fraglich, wie relevant NP und MP als Expositionspfad für organische Schadstoffe sowie als Sorptionsfläche zur Verringerung der Bioverfügbarkeit in der Umwelt sind (ZARFL & MATTHIES 2010, KOELMANS *et al.* 2013, BAKIR *et al.* 2016, BECKINGHAM & GHOSH 2017, HANSLIK *et al.* 2020).

**Insgesamt betrachtet hatte die Mischung der untersuchten Schadstoffe mit hohen Konzentrationen PS-MP keine Auswirkungen im Vergleich zur Einzelwirkung der Schadstoffe auf Bachforellen. Bei juvenilen Tieren war jedoch bei einer Co-Exposition von Amitriptylin und  $10^5$  Partikel/L PS-MP der Effekt auf das Schwimmverhalten während des Versuchs weniger stark ausgeprägt als in der Versuchsgruppe mit ausschließlich Amitriptylin. Im Vergleich zu den deutlich häufigeren natürlichen Partikeln ist es fraglich, wie relevant die Modulation der Wirkung von Schadstoffen durch MP in der Umwelt ist.**

### 5.6 Fragestellung V: Sind verschiedene Lebensstadien der Bachforelle unterschiedlich empfindlich gegenüber der Belastung mit Mikroplastik und Amitriptylin?

In den Versuchen wurden sowohl frühe Lebensstadien als auch juvenile Bachforellen gegenüber PS-MP und Amitriptylin exponiert. Dies ermöglichte einen Vergleich der Sensitivität der Lebensstadien gegenüber diesen Stoffen.

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung des Chorions zeigte, dass PS-MP ohne eine Verletzung der Eihülle nicht in das Chorion eindringen kann. Dies wurde auch in anderen Studien mit weiteren Fischarten beschrieben (LEMOINE *et al.* 2018, LI *et al.* 2020b, ZHANG *et al.* 2020, CHENG *et al.* 2021, CHEN *et al.* 2023). Es ist also davon auszugehen, dass Embryonen vor dem Schlupf vor mechanischen Auswirkungen durch MP relativ gut geschützt sind. Indirekte Wirkungen wie aus dem MP austretende Chemikalien, welche das Chorion passieren können, oder Effekte durch eine Verringerung des Sauerstoffaustausch bei sehr hohen Partikelkonzentrationen können jedoch auch in diesem Lebensstadium nicht ausgeschlossen werden (DUAN *et al.* 2020). Nach dem Schlupf kommen die Tiere direkt mit den Partikeln in Kontakt und können diese bei Beginn der

Aufnahme exogener Nahrung auch gezielt oder mit der Nahrung verschlucken, was die Wahrscheinlichkeit negativer Auswirkungen erhöht (LEMOINE *et al.* 2018, LI *et al.* 2020b).

In den an der Universität Tübingen durchgeführten Versuchen traten durch die Exposition mit PS-MP keine biologisch relevanten Effekte bei frühen Entwicklungsstadien oder bei juvenilen Forellen auf. Es ließen sich daher keine unterschiedlichen Sensitivitäten der verschiedenen Entwicklungsstadien beobachten. In der Literatur sind Effekte auf Fische sowohl bei frühen Lebensstadien (z. B. LI *et al.* 2020b, ZHANG *et al.* 2020, CHEN *et al.* 2023) als auch bei älteren Tieren beschrieben (z. B. QIAO *et al.* 2019, DING *et al.* 2020, SOLOMANDO *et al.* 2021).

**Zusammenfassend lassen die durchgeführten Versuche keine Rückschlüsse zu, welches Lebensstadium sensitiver gegenüber der Exposition von PS-MP ist, da bei keinem Lebensstadium biologisch relevante Effekte durch PS-MP verursacht wurden. Die Untersuchung des Chorions zeigt, dass Fische vor dem Schlupf vor direkter mechanischer Beeinflussung durch MP geschützt sind und daher vor dem Schlupf vermutlich weniger sensitiv gegenüber der Exposition mit MP sind.**

Der Versuch mit höheren Amitriptylinkonzentrationen von nominal 1000 µg/L und 300 µg/L musste auf Grund des Tierwohls (auffällige Atmung, starke Beeinträchtigung der Schwimmfähigkeit) nach 24 Stunden beziehungsweise nach einer Woche abgebrochen werden. Bei frühen Lebensstadien führte die nominal gleiche Konzentration von 300 µg/L zwar zu auffälligem Schwimmverhalten, jedoch auch bei einer deutlich längeren Expositionszeit von 59 Tagen zu weniger gravierenden Symptomen.

Bei frühen Entwicklungsstadien wurde die Zeit bis zum Schlupf sowie die Körpergröße und das Gewicht durch Amitriptylin beeinflusst. Bei juvenilen Bachforellen wurde hingegen kein Effekt auf das Wachstum durch Amitriptylin beobachtet. Ein direkter Vergleich dieses Endpunkts ist jedoch auf Grund der verschiedenen Wachstumsraten unterschiedlicher Lebensstadien sowie der kürzeren Expositionszeit der juvenilen Forellen schwierig. Sowohl bei Bachforellenlarven als auch bei juvenilen Tieren wurden während der Versuche Verhaltensänderungen beobachtet und auch unter Stress waren die Tiere inaktiver. Gerade die Hypoaktivität unter Stressbedingungen könnte möglicherweise lebensbedrohliche Folgen in freier Wildbahn haben, da die Tiere beispielsweise leichter von Prädatoren gefressen werden können (SCOTT & SLOMAN 2004). Während weder bei frühen Entwicklungsstadien noch bei juvenilen Bachforellen ein Einfluss auf die Aktivität der SOD oder den Grad der Lipidperoxidation auftrat, war der Einfluss von Amitriptylin auf die Aktivität der AChE und der CbEs bei Larven ausgeprägter als bei älteren Tieren. Auch hier ist jedoch keine Aussage möglich, ob der beobachtete Effekt auf die Sensitivität des Lebensstadiums, die Expositionsdauer oder die Amitriptylinkonzentration zurückzuführen ist. Jedoch war auch bei

sieben Monate alten Bachforellen noch ein Einfluss auf die Aktivität der AChE zu beobachten, während die Enzymaktivität bei der nominal gleichen Amitriptylinkonzentration bei neun Monate alten Tieren keine Unterschiede zu der von Kontrolltieren zeigte.

**Die Unterschiede im Versuchsdesign erschweren einen direkten Vergleich der Effekte von Amitriptylin auf verschiedene Lebensstadien. Alle Altersstadien der Bachforellen wurden jedoch sehr stark durch das Antidepressivum beeinträchtigt. Die beobachteten Effekte bei den unterschiedlich alten Tieren waren bei manchen Endpunkten wie dem Verhalten ähnlich, differierten allerdings in anderen Bereichen.**

## 5.7 Generelle Schlussfolgerungen

Es ist unstrittig, dass die Umwelt ubiquitär mit Mikroplastik belastet ist, und dass die Verschmutzung der Umwelt mit Kunststoffen in Zukunft weiter zunehmen wird. Während die Konzentration von größeren MP-Partikeln in der Umwelt vergleichbar gering ist, fehlen für NP und kleines MP valide Umweltdaten. Bei Versuchen mit Bachforellen unterschiedlicher Lebensstadien wurden keine biologisch relevanten Effekte durch PS-MP bis zu einer Konzentration von  $10^6$  Partikel/L beobachtet. Eine Exposition von Bachforellen gegenüber nominal 1 mg/L Methiocarb oder nominal  $\geq 10$  µg/L Amitriptylin verursachten hingegen starke und potenziell populationsrelevante Effekte. Die beobachteten Auswirkungen entsprechen dabei dem bekannten Wirkmechanismus des Carbamat-Pestizids beziehungsweise den bei Menschen und anderen Vertebraten beobachteten Wirkungen und Nebenwirkungen des Antidepressivums. Da die Umweltkonzentration von Methiocarb deutlich unter der bei Bachforellen getesteten Konzentration liegt und die Zulassung des Pestizids in der EU im Jahr 2019 ausgelaufen ist, geht aktuell für Fische in Deutschland kein Risiko von Methiocarb aus. Auch Amitriptylin wird in der Regel in deutlich niedrigeren Konzentrationen in Oberflächengewässern nachgewiesen als solche Konzentrationen, bei welchen Effekte bei Fischen auftreten. Wird eine höhere Amitriptylinkonzentration in einer Umweltprobe detektiert, kann ein Risiko für Fische jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zudem ist eine mögliche additive oder sogar synergistische Wirkung mit anderen Stoffen mit ähnlicher Wirkweise wahrscheinlich. Die Co-Exposition von Amitriptylin oder Methiocarb mit PS-MP beeinflusste bis auf eine Ausnahme die Wirkung der Einzelsubstanzen auf Bachforellen nicht. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche unterstützen daher die Annahme, dass MP zu keinem großflächigen Risiko für Fische führt und auch die Effekte anderer Schadstoffe nicht relevant beeinflusst.

Auf Grund der Vielfältigkeit von MP durch unterschiedliche Polymere, Formen und Additive können Umweltrisiken in bestimmten Fällen jedoch nicht ausgeschlossen werden. Für eine weitergehende Beurteilung der Auswirkung von MP auf die Umwelt sollte die Methodik zur

## Synthese

Probenahme und Analytik von MP und NP weiter optimiert und standardisiert werden. Zudem sollten weitere Studien mögliche Wirkmechanismen beobachteter Effekte von MP auf Biota untersuchen und so weit wie mögliche eine Abgrenzung zu den Auswirkungen natürlicher Partikel treffen. Unabhängig von dem vergleichsweise geringen generellen Risiko durch MP für Fische sollte der Eintrag persistenter Kunststoffe in die Umwelt reduziert werden und es sollte eine wissenschaftlich fundierte Risikokommunikation zum Thema MP und NP stattfinden.

## 6 Referenzen

- ALDRIDGE W. N. (1953). "Serum esterases. I. two types of esterase (A and B) hydrolysing P-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination." Biochem J **53**(1): 110-117.
- ALLEN S., ALLEN D., PHOENIX V. R., LE ROUX G., DURÁNTEZ JIMÉNEZ P., SIMONNEAU A., BINET S. AND GALOP D. (2019). "Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment." Nat. Geosci. **12**(5): 339-344.
- ALTINOK I. AND CAPKIN E. (2007). "Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan." Toxicologic Pathology **35**(3): 405-410.
- ALTINOK I., CAPKIN E., KARAHAN S. AND BORAN M. (2006). "Effects of water quality and fish size on toxicity of methiocarb, a carbamate pesticide, to rainbow trout." Environmental Toxicology and Pharmacology **22**(1): 20-26.
- AMG (2005). "Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 19. Juli 2023 (BGBl. 2023 I Nr. 197) geändert worden ist".
- AMINOT Y., LITRICO X., CHAMBOLLE M., ARNAUD C., PARDON P. AND BUDZINDKI H. (2015). "Development and application of a multi-residue method for the determination of 53 pharmaceuticals in water, sediment, and suspended solids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Analytical and Bioanalytical Chemistry **407**(28): 8585-8604.
- ANDRADY A. L. (2022). "Weathering and fragmentation of plastic debris in the ocean environment." Marine Pollution Bulletin **180**: 113761.
- ATHEY S. N., ALBOTRA S. D., GORDON C. A., MONTELEONE B., SEATON P., ANDRADY A. L., TAYLOR A. R. AND BRANDER S. M. (2020). "Trophic transfer of microplastics in an estuarine food chain and the effects of a sorbed legacy pollutant." Limnology and Oceanography Letters **5**(1): 154-162.
- BAENA-NOGUERAS R. M., GONZÁLEZ-MAZO E. AND LARA-MARTÍN P. A. (2017). "Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: photolysis vs biodegradation." Science of The Total Environment **590-591**: 643-654.
- BAKER D. R. AND KASPRZYK-HORDERN B. (2013). "Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: new developments." Science of The Total Environment **454-455**: 442-456.
- BAKIR A., O'CONNOR I. A., ROWLAND S. J., HENDRIKS A. J. AND THOMPSON R. C. (2016). "Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life." Environmental Pollution **219**: 56-65.
- BAKKER M. H., HUGTENBURG J. G., SMITS M. G., VAN DER HORST H. E. AND SLOTTJE P. (2023). "Off-label low dose amitriptyline for insomnia disorder: patient-reported outcomes." Pharmacoepidemiology and Drug Safety **32**(4): 435-445.
- BARBOZA L. G. A., LOPES C., OLIVEIRA P., BESSA F., OTERO V., HENRIQUES B., RAIMUNDO J., CAETANO M., VALE C. AND GUILHERMINO L. (2020). "Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure." Science of The Total Environment **717**: 134625.
- BARBUI C. AND HOTOPF M. (2001). "Amitriptyline v. the rest: still the leading antidepressant after 40 years of randomised controlled trials." Br J Psychiatry **178**: 129-144.
- BARTON B. A. (2002). "Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids." Integrative and Comparative Biology **42**(3): 517-525.

## Referenzen

- BATEL A., BAUMANN L., CARTENY C. C., CORMIER B., KEITER S. H. AND BRAUNBECK T. (2020). "Histological, enzymatic and chemical analyses of the potential effects of differently sized microplastic particles upon long-term ingestion in zebrafish (*Danio rerio*)."  
Marine Pollution Bulletin **153**: 111022.
- BATEL A., LINTI F., SCHERER M., ERDINGER L. AND BRAUNBECK T. (2016). "Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia* nauplii and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants." Environmental Toxicology and Chemistry **35**(7): 1656-1666.
- BATES D., MÄCHLER M., BOLKER B. AND WALKER S. (2015). "Fitting linear mixed-effects models using lme4." J. Stat. Softw. **67**(1): 1-48.
- BAUMANN L., SCHMIDT-POSTHAUS H., SEGNER H. AND WOLF J. C. (2016). "Comment on "Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver"."  
Environmental Science & Technology **50**(22): 12521-12522.
- BECKINGHAM B. AND GHOSH U. (2017). "Differential bioavailability of polychlorinated biphenyls associated with environmental particles: Microplastic in comparison to wood, coal and biochar." Environmental Pollution **220**: 150-158.
- BENITO-KAESBACH A., AMIGO J. M., IZAGIRRE U., GARCIA-VELASCO N., ARÉVALO L., SEIFERT A. AND CASTRO K. (2023). "Misinterpretation in microplastic detection in biological tissues: when 2D imaging is not enough." Science of The Total Environment **876**: 162810.
- BENJAMINI Y. AND HOCHBERG Y. (1995). "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing." J. R. Stat. Soc., B: Stat. Methodol. **57**(1): 289-300.
- BERG O. K. AND FLEMING I. A. (2018). "Energetic trade-offs faced by brown trout during ontogeny and reproduction." In "Brown Trout: Biology, Ecology and Management.": 179-199. Wiley, Hoboken, NJ, USA.
- BERGMANN M., COLLARD F., FABRES J., GABRIELSEN G. W., PROVENCHER J. F., ROCHMAN C. M., VAN SEBILLE E. AND TEKMAN M. B. (2022). "Plastic pollution in the Arctic." Nat. Rev. Earth Environ. **3**: 323-337.
- BIGINAGWA F. J., MAYOMA B. S., SHASHOUA Y., SYBERG K. AND KHAN F. R. (2016). "First evidence of microplastics in the African Great Lakes: Recovery from Lake Victoria Nile perch and Nile tilapia." Journal of Great Lakes Research **42**(1): 146-149.
- BIRNIE-GAUVIN K., COSTANTINI D., COOKE S. J. AND WILLMORE W. G. (2017). "A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review." Fish and Fisheries **18**(5): 928-942.
- BLANCO-RAYÓN E., ZIARRUSTA H., MIJANGOS L., OLIVARES M., ZULOAGA O., ETXEBARRIA N. AND IZAGIRRE U. (2021). "Integrated biological response to environmentally-relevant concentration of amitriptyline in *Sparus aurata*." Ecological Indicators **130**: 108028.
- BORRELLE S. B., RINGMA J., LAW K. L., MONNAHAN C. C., LEBRETON L., MCGIVERN A., MURPHY E., JAMBECK J., LEONARD G. H., HILLEARY M. A., ERIKSEN M., POSSINGHAM H. P., DE FROND H., GERBER L. R., POLIDORO B., TAHIR A., BERNARD M., MALLOS N., BARNES M. AND ROCHMAN C. M. (2020). "Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution." Science **369**(6510): 1515-1518.
- BOYER E. W. AND SHANNON M. (2005). "The serotonin syndrome." New England Journal of Medicine **352**(11): 1112-1120.
- BRADFORD M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1): 248-254.
- BREYER-PFAFF U. (2004). "The metabolic fate of amitriptyline, nortriptyline and amitriptylinoxide in man." Drug Metabolism Reviews **36**(3-4): 723-746.

## Referenzen

- BROOKS M. E., KRISTENSEN K., BENTHEM K. J. V., MAGNUSSEN A., BERG C. W., NIELSEN A., SKAUG H. J., MÄCHLER M. AND BOLKER B. M. (2017). "glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling." R.J. **9**(2): 378-400.
- BURNS E. E. AND BOXALL A. B. A. (2018). "Microplastics in the aquatic environment: evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps." Environmental Toxicology and Chemistry **37**(11): 2776-2796.
- BURONFOSSE T., MORONI P., BENOÎT E. AND RIVIÈRE J. L. (1995). "Stereoselective sulfoxidation of the pesticide methiocarb by flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450-dependent monooxygenases of rat liver microsomes. Anticholinesterase activity of the two sulfoxide enantiomers." Journal of Biochemical Toxicology **10**(4): 179-189.
- CAESAR L., SAKSCHEWSKI B., ANDERSEN L. S., BERINGER T., BRAUN J., DENNIS D., GERTEN D., HEILEMANN A., KAISER J., KITZMANN N. H., LORIANI S., LUCHT W., LUDESCHER J., MARTIN M., MATHESIUS S., PAOLUCCI A., TE WIERIK S. AND ROCKSTRÖM J. (2024). "Planetary health check report 2024". Potsdam Institute for Climate Impact Research, Potsdam, Germany.
- CARR R. L. AND CHAMBERS J. E. (1991). "Acute effects of the organophosphate paraoxon on schedule-controlled behavior and esterase activity in rats: dose-response relationships." Pharmacology Biochemistry and Behavior **40**(4): 929-936.
- CATARINO A. I., KRAMM J., VÖLKER C., HENRY T. B. AND EVERAERT G. (2021). "Risk posed by microplastics: scientific evidence and public perception." Curr. Opin. Green Sustain. Chem. **29**: 100467.
- CHANDA S. M., MORTENSEN S. R., MOSER V. C. AND PADILLA S. (1997). "Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an *in vitro* and *in vivo* comparison." Fundam Appl Toxicol **38**(2): 148-157.
- CHANG P.-H., JIANG W.-T., LI Z., KUO C.-Y., JEAN J.-S., CHEN W.-R. AND LV G. (2014). "Mechanism of amitriptyline adsorption on Ca-montmorillonite (SAz-2)." Journal of Hazardous Materials **277**: 44-52.
- CHATTERJEE G. AND PRASAD S. (2011). "Polystyrene: properties and it's applications in sensing platforms." In: "Polystyrene: Properties, Performance and Applications.": 124. Nova Science Publishers. New York, USA.
- CHEN Q., GUNDLACH M., YANG S., JIANG J., VELKI M., YIN D. AND HOLLERT H. (2017). "Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity." Science of The Total Environment **584-585**: 1022-1031.
- CHEN Q., LACKMANN C., WANG W., SEILER T.-B., HOLLERT H. AND SHI H. (2020). "Microplastics lead to hyperactive swimming behaviour in adult zebrafish." Aquatic Toxicology **224**: 105521.
- CHEN Y., DUAN M., XU X. AND WU C. (2023). "Multi-biomarkers hazard assessment of microplastics with different polymers by acute embryo test and chronic larvae test with zebrafish (*Danio rerio*)." Aquatic Toxicology **260**: 106595.
- CHENG H., FENG Y., DUAN Z., DUAN X., ZHAO S., WANG Y., GONG Z. AND WANG L. (2021). "Toxicities of microplastic fibers and granules on the development of zebrafish embryos and their combined effects with cadmium." Chemosphere **269**: 128677.
- COLOVIC M. B., KRSTIC D. Z., LAZAREVIC-PASTI T. D., BONDZIC A. M. AND VASIC V. M. (2013). "Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology." Current Neuropharmacology **11**(3): 315-335.
- COOPER J. AND DOBSON H. (2007). "The benefits of pesticides to mankind and the environment." Crop Protection **26**(9): 1337-1348.
- CORCORAN J., WINTER M. J. AND TYLER C. R. (2010). "Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish." Critical Reviews in Toxicology **40**(4): 287-304.
- COUCH J. R. AND GROUP F. T. A. V. P. S. (2011). "Amitriptyline in the prophylactic treatment of migraine and chronic daily headache." Headache: The Journal of Head and Face Pain **51**(1): 33-51.

## Referenzen

- CRISP D. T. (1996). "Environmental requirements of common riverine European salmonid fish species in fresh water with particular reference to physical and chemical aspects." Hydrobiologia **323**(3): 201-221.
- DAVID A., LANGE A., TYLER C. R. AND HILL E. M. (2018). "Concentrating mixtures of neuroactive pharmaceuticals and altered neurotransmitter levels in the brain of fish exposed to a wastewater effluent." Science of The Total Environment **621**: 782-790.
- DE RUIJTER V. N., REDONDO-HASSELERHARM P. E., GOUIN T. AND KOELMANS A. A. (2020). "Quality criteria for microplastic effect studies in the context of risk assessment: a critical review." Environmental Science & Technology **54**(19): 11692-11705.
- DE SALES-RIBEIRO C., BRITO-CASILLAS Y., FERNANDEZ A. AND CABALLERO M. J. (2020). "An end to the controversy over the microscopic detection and effects of pristine microplastics in fish organs." Scientific reports **10**(1): 12434.
- DEMIN K. A., KOLESNIKOVA T. O., KHATSKO S. L., MESHALKINA D. A., EFIMOVA E. V., MORZHERIN Y. Y. AND KALUEFF A. V. (2017). "Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes." Neurotoxicology and Teratology **62**: 27-33.
- DEMIN K. A., LAKSTYGAL A. M., CHERNYSH M. V., KROTOVA N. A., TARANOV A. S., ILYIN N. P., SEREDINSKAYA M. V., TAGAWA N., SAVVA A. K., MOR M. S., VASYUTINA M. L., EFIMOVA E. V., KOLESNIKOVA T. O., GAINETDINOV R. R., STREKALOVA T., AMSTISLAVSKAYA T. G., DE ABREU M. S. AND KALUEFF A. V. (2020). "The zebrafish tail immobilization (ZTI) test as a new tool to assess stress-related behavior and a potential screen for drugs affecting despair-like states." Journal of Neuroscience Methods **337**: 108637.
- DING J., HUANG Y., LIU S., ZHANG S., ZOU H., WANG Z., ZHU W. AND GENG J. (2020). "Toxicological effects of nano- and micro-polystyrene plastics on red tilapia: Are larger plastic particles more harmless?" Journal of Hazardous Materials **396**: 122693.
- DING J., ZHANG S., RAZANAJATOVO R. M., ZOU H. AND ZHU W. (2018). "Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Environmental Pollution **238**: 1-9.
- DOMININGHAUS H. (2012). "Kunststoffe: Eigenschaften und Anwendungen.": 1-12, 369-388. Springer, Heidelberg, Deutschland.
- DRÖGE W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiological Reviews **82**(1): 47-95.
- DUAN Z., DUAN X., ZHAO S., WANG X., WANG J., LIU Y., PENG Y., GONG Z. AND WANG L. (2020). "Barrier function of zebrafish embryonic chorions against microplastics and nanoplastics and its impact on embryo development." Journal of Hazardous Materials **395**: 122621.
- DUARTE I. A., FICK J., CABRAL H. N. AND FONSECA V. F. (2022). "Bioconcentration of neuroactive pharmaceuticals in fish: relation to lipophilicity, experimental design and toxicity in the aquatic environment." Science of The Total Environment **812**: 152543.
- DUBLING U. AND BERG R. (2001). "Fische in Baden-Württemberg.": 50-51. Ministerium für Ernährung und Landlichen Raum Baden-Württemberg. Stuttgart, Deutschland.
- E SILVA P. H. S. AND DE SOUSA F. D. B. (2021). "Microplastic pollution of Patos Lagoon, south of Brazil." Environmental Challenges **4**: 100076.
- EFSA (2006). "Conclusion on the peer review of methiocarb." EFSA Scientific Report **79**:1-82.
- EITZEN L., PAUL S., BRAUN U., ALTMANN K., JEKEL M. AND RUHL A. S. (2019). "The challenge in preparing particle suspensions for aquatic microplastic research." Environmental Research **168**: 490-495.

## Referenzen

- ELIZALDE-VELÁZQUEZ A., CARCANO A. M., CRAGO J., GREEN M. J., SHAH S. A. AND CAÑAS-CARRELL J. E. (2020). "Translocation, trophic transfer, accumulation and depuration of polystyrene microplastics in *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*." Environmental Pollution **259**: 113937.
- ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. AND FEATHERSTONE R. M. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochemical Pharmacology **7**(2): 88-95.
- EMA (2024). "Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use (EMA/CHMP/SWP/4447/00 Rev. 1)", Amsterdam, Netherlands.
- EPA (1994). "R.E.D. facts methiocarb. E. P. Agency. United States." USA.
- ESPINOSA C., ESTEBAN M. Á. AND CUESTA A. (2019). "Dietary administration of PVC and PE microplastics produces histological damage, oxidative stress and immunoregulation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)." Fish & Shellfish Immunology **95**: 574-583.
- EU (2000). "Richtlinie 2000/60/EG des europäischen Parlaments und des Rates." Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften **L 327**: 1-72.
- EU (2001). "Richtlinie 2001/83/EG vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel." Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften **L 311**: 67-128.
- EU (2008). "Richtlinie 2008/105/EG des europäischen Parlaments und des Rates." Amtsblatt der Europäischen Union **L 348**: 84-97.
- EU (2009). "Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des europäischen Parlaments und des Rates." Amtsblatt der Europäischen Union **L 309**: 1-20.
- EU (2013). "Richtlinie 2013/39/EU des europäischen Parlaments und des Rates." Amtsblatt der Europäischen Union **L 226**: 1-17.
- EU (2014). "Durchführungsverordnung (EU) Nr. 187/2014 der Kommission." Amtsblatt der Europäischen Union **L 57**: 24-26.
- EU (2015). "Durchführungsbeschluss (EU) 2015/495 der Kommission." Amtsblatt der Europäischen Union **L 78**: 40-42.
- EU (2018). "Durchführungsbeschluss (EU) 2018/840 der Kommission." Amtsblatt der Europäischen Union **L 141**: 9-12.
- EU (2019). "Durchführungsverordnung (EU) 2019/1606 der Kommission." Amtsblatt der Europäischen Union **L 250**: 53-55.
- EU (2020). "Durchführungsbeschluss (EU) 2020/1161 der Kommission." Amtsblatt der Europäischen Union **L 257**: 32-35.
- EUROPÄISCHE KOMMISSION (2018). "Eine europäische Strategie für Kunststoffe in der Kreislaufwirtschaft". Europäische Kommission, Brüssel, Belgien.
- EUROPÄISCHE UNION (2023). "Zur Änderung von Anhang XVII der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) hinsichtlich synthetischer Polymermikropartikel." Amtsblatt der Europäischen Union **L 238**: 67-88.
- EUROPEAN COMMISSION (DIRECTORATE-GENERAL FOR RESEARCH AND INNOVATION, 2019). "Environmental and health risks of microplastic pollution." Publications Office of the European Union. Luxembourg, Luxembourg.
- EVANS D. H., PIERMARINI P. M. AND CHOE K. P. (2005). "The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste." Physiological Reviews **85**(1): 97-177.
- FAO (1999). "Pesticide residues in food 1999 - Report 1999.", Rome, Italy.

## Referenzen

- FENNER K., CANONICA S., WACKETT L. P. AND ELSNER M. (2013). "Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities." Science **341**(6147): 752-758.
- FENT K., WESTON A. A. AND CAMINADA D. (2006). "Ecotoxicology of human pharmaceuticals." Aquatic Toxicology **76**(2): 122-159.
- FERREY M. L., HEISKARY S., GRACE R., HAMILTON M. C. AND LUECK A. (2015). "Pharmaceuticals and other anthropogenic tracers in surface water: a randomized survey of 50 Minnesota lakes." Environmental Toxicology and Chemistry **34**(11): 2475-2488.
- FORD A. T., ÅGERSTRAND M., BROOKS B. W., ALLEN J., BERTRAM M. G., BRODIN T., DANG Z., DUQUESNE S., SAHM R., HOFFMANN F., HOLLERT H., JACOB S., KLÜVER N., LAZORCHAK J. M., LEDESMA M., MELVIN S. D., MOHR S., PADILLA S., PYLE G. G., SCHOLZ S., SAARISTO M., SMIT E., STEEVENS J. A., VAN DEN BERG S., KLOAS W., WONG B. B. M., ZIEGLER M. AND MAACK G. (2021). "The role of behavioral ecotoxicology in environmental protection." Environmental Science & Technology **55**(9): 5620-5628.
- FREISSMUTH M., OFFERMANN S. AND BÖHM S. (2020). "Pharmakologie und Toxikologie.": 342. Springer, Berlin, Heidelberg, Deutschland.
- FUKUTO T. R. (1990). "Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides." Environmental health perspectives **87**: 245-254.
- FURNES B. AND SCHLENK D. (2005). "Extrahepatic metabolism of carbamate and organophosphate thioether compounds by the flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450 systems." Drug Metabolism and Disposition **33**(2): 214.
- GAO S., ORLOWSKI N., BOPF F. K. AND BREUER L. (2024). "A review on microplastics in major European rivers." WIREs Water **11**(3): e1713.
- GARCÍA DE LLASERA M. P. AND BERNAL-GONZÁLEZ M. (2001). "Presence of carbamate pesticides in environmental waters from the northwest of Mexico: determination by liquid chromatography." Water Research **35**(8): 1933-1940.
- GEA M., ZHANG C., TOTA R., GILARDI G., DI NARDO G. AND SCHILIRÒ T. (2022). "Assessment of five pesticides as endocrine-disrupting chemicals: effects on estrogen receptors and aromatase." International Journal of Environmental Research and Public Health **19**(4): 1959.
- GEYER R. (2020). "Chapter 2 - Production, use, and fate of synthetic polymers." In: "Plastic Waste and Recycling Environmental Impact, Societal Issues, Prevention, and Solutions.": 13-32. Academic Press. London, United Kingdom.
- GEYER R., JAMBECK J. R. AND LAW K. L. (2017). "Production, use, and fate of all plastics ever made." Science Advances **3**(7): e1700782.
- GONZÁLEZ PEÑA O. I., LÓPEZ ZAVALA M. Á. AND CABRAL RUELAS H. (2021). "Pharmaceuticals market, consumption trends and disease incidence are not driving the pharmaceutical research on water and wastewater." International Journal of Environmental Research and Public Health **18**(5): 2532.
- GOULD S. L., WINTER M. J., TRZNADEL M., LANGE A., HAMILTON C. M., BOREHAM R. J., HETHERIDGE M. J., YOUNG A., NORTON W. H. J. AND TYLER C. R. (2024). "Exposure effects of environmentally relevant concentrations of the tricyclic antidepressant amitriptyline in early life stage zebrafish." Environmental Science & Technology **58**(30): 13194-13204.
- GRBIĆ J., HELM P., ATHEY S. AND ROCHMAN C. M. (2020). "Microplastics entering northwestern Lake Ontario are diverse and linked to urban sources." Water Research **174**: 115623.
- GUNNARSSON L., JAUHAINEN A., KRISTIANSSON E., NERMAN O. AND LARSSON D. G. J. (2008). "Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments." Environmental Science & Technology **42**(15): 5807-5813.

## Referenzen

- GUPTA R. C. (2014). "Carbamate pesticides. Encyclopedia of Toxicology (Third Edition).": 661-664. Academic Press. Oxford, United Kingdom.
- HAMDORF K. (1960). "Die Beeinflussung der Embryonal- und Larvalentwicklung der Regenbogenforelle (*Salmo irideus* Gibb.) durch Strahlung im sichtbaren Bereich." Zeitschrift für vergleichende Physiologie **42**(6): 525-565.
- HAMPTON J. A., MCCUSKEY P. A., MCCUSKEY R. S. AND HINTON D. E. (1985). "Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver: I. Arrangement and histochemical properties of hepatocytes." The Anatomical Record **213**(2): 166-175.
- HAN M., NIU X., TANG M., ZHANG B.-T., WANG G., YUE W., KONG X. AND ZHU J. (2020). "Distribution of microplastics in surface water of the lower Yellow River near estuary." Science of The Total Environment **707**: 135601.
- HANSLIK L., SOMMER C., HUPPERTSBERG S., DITTMAR S., KNEPPER T. P. AND BRAUNBECK T. (2020). "Microplastic-associated trophic transfer of benzo(k)fluoranthene in a limnic food web: effects in two freshwater invertebrates (*Daphnia magna*, *Chironomus riparius*) and zebrafish (*Danio rerio*)." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **237**: 108849.
- HARMER C. J., DUMAN R. S. AND COWEN P. J. (2017). "How do antidepressants work? New perspectives for refining future treatment approaches." Lancet Psychiatry **4**(5): 409-418.
- HARTMANN N. B., HÜFFER T., THOMPSON R. C., HASSELLÖV M., VERSCHOOR A., DAUGAARD A. E., RIST S., KARLSSON T., BRENNHOLT N., COLE M., HERRLING M. P., HESS M. C., IVLEVA N. P., LUSHER A. L. AND WAGNER M. (2019). "Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris." Environmental Science & Technology **53**(3): 1039-1047.
- HAUER W. (2007). "Fische, Krebse, Muscheln in heimischen Seen und Flüssen: 115 Arten in über 350 Lebendabbildungen.": 45-48. Leopold Stocker Verlag. Graz, Schweiz.
- HEINRICH P., HANSLIK L., KÄMMER N. AND BRAUNBECK T. (2020). "The tox is in the detail: technical fundamentals for designing, performing, and interpreting experiments on toxicity of microplastics and associated substances." Environmental Science and Pollution Research **27**(18): 22292-22318.
- HERMES-LIMA M., WILLMORE W. G. AND STOREY K. B. (1995). "Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation." Free Radical Biology and Medicine **19**(3): 271-280.
- HERNÁNDEZ A. F., GIL F. AND LACASAÑA M. (2017). "Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update." Archives of Toxicology **91**(10): 3211-3223.
- HERNANDO M. D., MEZCUA M., FERNÁNDEZ-ALBA A. R. AND BARCELÓ D. (2006). "Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments." Talanta **69**(2): 334-342.
- HOLM S. (1979). "A simple sequentially rejective multiple test procedure." Scandinavian Journal of Statistics **6**(2): 65-70.
- HUANG I. J., SIROTKIN H. I. AND MCELROY A. E. (2019). "Varying the exposure period and duration of neuroactive pharmaceuticals and their metabolites modulates effects on the visual motor response in zebrafish (*Danio rerio*) larvae." Neurotoxicology and Teratology **72**: 39-48.
- HUANG Y., DING J., ZHANG G., LIU S., ZOU H., WANG Z., ZHU W. AND GENG J. (2021). "Interactive effects of microplastics and selected pharmaceuticals on red tilapia: role of microplastic aging." Science of The Total Environment **752**: 142256.
- JAIKUMAR I. M., PERIYAKALI S. B., RAJENDRAN U., JOEN-RONG S., THANASEKARAN J. AND TSORNG-HARN F. (2021). "Effects of microplastics, polystyrene, and polyethylene on antioxidants, metabolic enzymes, Hsp-70, and myostatin expressions in the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii*: impact on survival and growth." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **80**(3): 645-658.

## Referenzen

- JAKUBOWSKA M., BIALOWAS M., STANKEVICIUTE M., CHOMICZEWSKA A., JONKO-SOBUS K., PAZUSIENE J., HALLMANN A., BUCAITE A. AND URBAN-MALINGA B. (2022). "Effects of different types of primary microplastics on early life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Science of The Total Environment **808**: 151909.
- JAKUBOWSKA M., BIAŁOWAŚ M., STANKEVIČIŪTĖ M., CHOMICZEWSKA A., PAŽUSIENĖ J., JONKO-SOBUS K., HALLMANN A. AND URBAN-MALINGA B. (2020). "Effects of chronic exposure to microplastics of different polymer types on early life stages of sea trout *Salmo trutta*." Science of The Total Environment **740**: 139922.
- JANG S.-W., LIU X., CHAN C.-B., WEINSHENKER D., HALL R. A., XIAO G. AND YE K. (2009). "Amitriptyline is a TrkA and TrkB receptor agonist that promotes TrkA/TrkB heterodimerization and has potent neurotrophic activity." Chemistry & Biology **16**(6): 644-656.
- JOHNSON W. W. AND FINLEY M. T. (1980). "Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates." U.S. Fish and Wildlife Service, Resource Publication **137**: 84. Washington, USA.
- JURADO A., PUJADES E., WALTHER M. AND DIAZ-CRUZ M. S. (2022). "Occurrence, fate, and risk of the organic pollutants of the surface water watch list in European groundwaters: a review." Environmental Chemistry Letters **20**(5): 3313-3333.
- KABIR A. H. M. E., SEKINE M., IMAI T., YAMAMOTO K., KANNO A. AND HIGUCHI T. (2021). "Assessing small-scale freshwater microplastics pollution, land-use, source-to-sink conduits, and pollution risks: Perspectives from Japanese rivers polluted with microplastics." Science of The Total Environment **768**: 144655.
- KAPP K. J. AND YEATMAN E. (2018). "Microplastic hotspots in the Snake and Lower Columbia rivers: A journey from the Greater Yellowstone Ecosystem to the Pacific Ocean." Environmental Pollution **241**: 1082-1090.
- KARASAKAL O. F., KAYHAN F. E. AND AKGUL O. (2020). "Effects of amitriptyline on oxidative stress parameters in brain tissue of zebrafish, *Danio rerio*." Fresenius Environmental Bulletin **29**(7A): 6022-6027.
- KASPRZYK-HORDERN B., DINSDALE R. M. AND GUWY A. J. (2009). "The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters." Water Research **43**(2): 363-380.
- KEYSOMI E. M., SUDAGAR M. AND ASL N. (2013). "Effect of citalopram on reducing transportation stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." J. Aquac. Res. Dev. **4**(3): 1000171.
- KHETAN S. K. AND COLLINS T. J. (2007). "Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry." Chemical Reviews **107**(6): 2319-2364.
- KILLEEN J., MCLAY H. A. AND JOHNSTON I. A. (1999). "Development in *Salmo trutta* at different temperatures, with a quantitative scoring method for intraspecific comparisons." Journal of Fish Biology **55**(2): 382-404.
- KIM M.-K. AND ZOH K.-D. (2016). "Occurrence and removals of micropollutants in water environment." Environmental Engineering Research **21**(4): 319-332.
- KLEINTEICH J., SEIDENSTICKER S., MARGGRANDER N. AND ZARFL C. (2018). "Microplastics reduce short-term effects of environmental contaminants. Part II: Polyethylene particles decrease the effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on microorganisms." International Journal of Environmental Research and Public Health **15**(2): 287.
- KLEMETSEN A., AMUNDSEN P.-A., DEMPSON J. B., JONSSON N., JONSSON B., O'CONNELL M. AND MORTENSEN E. (2003). "Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories." Ecology of freshwater fish **12**(1): 1-59.
- KOELMANS A. A., BESSELING E., WEGNER A. AND FOEKEMA E. M. (2013). "Plastic as a carrier of POPs to aquatic organisms: a model analysis." Environmental Science & Technology **47**(14): 7812-7820.

## Referenzen

- KÖHLER H.-R., GRÄFF T., SCHWEIZER M., BLUMHARDT J., BURKHARDT J., EHMANN L., HEBEL J., HEID C., KUNDY L., KUTTLER J., MALUSOVA M., MOROFF F.-M., SCHLÖSINGER A.-F., SCHULZE-BERGE P., PANAGOPOULOU E. I., DAMALAS D. E., THOMAIDIS N. S., TRIEBSKORN R., MALETZKI D., KÜHNEN U. AND VON DER OHE P. C. (2023). "LogD-based modelling and  $\Delta\log D$  as a proxy for pH-dependent action of ionizable chemicals reveal the relevance of both neutral and ionic species for fish embryotoxicity and possess great potential for practical application in the regulation of chemicals." Water Research **235**: 119864.
- KÖHLER H.-R. AND TRIEBSKORN R. (2004). "Stress im Boden: Früherkennung ökotoxikologischer Effekte durch Biomarker." Biologie in unserer Zeit **34**(4): 240-248.
- KÖHLER H. R. (2009). "Die Rolle von Stressproteinen bei der Anpassung an Umweltbedingungen: Ökophysiologische, ökotoxikologische und evolutionsbiologische Implikationen." Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung **21**(2): 150-159.
- KOLTZENBURG S., MICHAEL M. AND NUYKEN O. (2014). "Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen.": 413-417. Springer. Berlin, Heidelberg, Deutschland.
- KOOPS M. A., HUTCHINGS J. A. AND MCINTYRE T. M. (2004). "Testing hypotheses about fecundity, body size and maternal condition in fishes." Fish and Fisheries **5**(2): 120-130.
- KRAIS S., ANTHES N., HUPPERTSBERG S., KNEPPER T. P., PESCHKE K., RUHL A. S., SCHMIEG H., SCHWARZ T., KÖHLER H.-R. AND TRIEBSKORN R. (2022). "Polystyrene microplastics modulate the toxicity of the hydrophilic insecticide thiacloprid for chironomid larvae and also influence their burrowing behavior." Microplastics **1**(3): 505-519.
- LAJEUNESSE A., GAGNON C., GAGNÉ F., LOUIS S., ČEJKA P. AND SAUVÉ S. (2011). "Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment – evidence of biological effects." Chemosphere **83**(4): 564-571.
- LAJEUNESSE A., GAGNON C. AND SAUVÉ S. (2008). "Determination of basic antidepressants and their N-Desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry." Analytical Chemistry **80**(14): 5325-5333.
- LALJI H. M., MCGROGAN A. AND BAILEY S. J. (2021). "An analysis of antidepressant prescribing trends in England 2015-2019." J Affect Disord Rep **6**: 100205.
- LEMOINE C. M. R., KELLEHER B. M., LAGARDE R., NORTHAM C., ELEBUTE O. O. AND CASSONE B. J. (2018). "Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing zebrafish (*Danio rerio*)." Environ Pollut **243**(Pt A): 591-600.
- LESLIE H. A., BRANDSMA S. H., VAN VELZEN M. J. M. AND VETHAAK A. D. (2017). "Microplastics en route: field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota." Environment International **101**: 133-142.
- LEU C., SINGER H., STAMM C., MÜLLER S. R. AND SCHWARZENBACH R. P. (2004). "Variability of herbicide losses from 13 fields to surface water within a small catchment after a controlled herbicide application." Environmental Science & Technology **38**(14): 3835-3841.
- LHOTSKÝ O., KRÁKOROVÁ E., MAŠÍN P., ŽEBRÁK R., LINHARTOVÁ L., KŘESINOVÁ Z., KAŠLÍK J., STEINOVÁ J., RØDSAND T., FILIPOVÁ A., PETRŮ K., KROUPOVÁ K. AND CAJTHAML T. (2017). "Pharmaceuticals, benzene, toluene and chlorobenzene removal from contaminated groundwater by combined UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> photo-oxidation and aeration." Water Research **120**: 245-255.
- LI C., BUSQUETS R. AND CAMPOS L. C. (2020a). "Assessment of microplastics in freshwater systems: a review." Science of The Total Environment **707**: 135578.
- LI L. X., DONG K. J., CHEN C., CHEN K., SHI Y. H., QIU X. C., SHIMASAKI Y. AND OSHIMA Y. (2022). "Recovery pattern of behavioral responses in female zebrafish to short-term amitriptyline hydrochloride exposure." Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University **67**(2): 181-187.

## Referenzen

- LI Y., WANG J., YANG G., LU L., ZHENG Y., ZHANG Q., ZHANG X., TIAN H., WANG W. AND RU S. (2020b). "Low level of polystyrene microplastics decreases early developmental toxicity of phenanthrene on marine medaka (*Oryzias melastigma*)." Journal of Hazardous Materials **385**: 121586.
- LIMONTA G., MANCIA A., ABELLI L., FOSSI M. C., CALIANI I. AND PANTI C. (2021). "Effects of microplastics on head kidney gene expression and enzymatic biomarkers in adult zebrafish." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **245**: 109037.
- LIONETTO M. G., CARICATO R., CALISI A., GIORDANO M. E. AND SCETTINO T. (2013). "Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives." Biomed Res Int **2013**: 321213.
- LITHNER D., DAMBERG J., DAVE G. AND LARSSON Å. (2009). "Leachates from plastic consumer products – screening for toxicity with *Daphnia magna*." Chemosphere **74**(9): 1195-1200.
- LIU A., CHEN C., CHEN K., SHI Y., GRABOWSKI R. C. AND QIU X. (2024). "Effects of parental exposure to amitriptyline on the survival, development, behavior, and gene expression in zebrafish offspring." Science of The Total Environment **912**: 169173.
- LIU P., ZHAN X., WU X., LI J., WANG H. AND GAO S. (2020). "Effect of weathering on environmental behavior of microplastics: Properties, sorption and potential risks." Chemosphere **242**: 125193.
- LOOS R., MARINOV D., SANSEVERINO I., NAPIERSKA D. AND LETTIERI T. (2018). "Review of the 1st watch list under the Water Framework Directive and recommendations for the 2nd watch list." Publications Office of the European Union. Luxembourg, Luxembourg.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- LU H.-C., ZIAJAHROMI S., NEALE P. A. AND LEUSCH F. D. L. (2021). "A systematic review of freshwater microplastics in water and sediments: Recommendations for harmonisation to enhance future study comparisons." Science of The Total Environment **781**: 146693.
- LU Y., ZHANG Y., DENG Y., JIANG W., ZHAO Y., GENG J., DING L. AND REN H. (2016). "Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver." Environmental Science & Technology **50**(7): 4054-4060.
- LUSHCHAK V. I. (2011). "Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals." Aquatic Toxicology **101**(1): 13-30.
- LV G., STOCKWELL C., NILES J., MINEGAR S., LI Z. AND JIANG W.-T. (2013). "Uptake and retention of amitriptyline by kaolinite." Journal of Colloid and Interface Science **411**: 198-203.
- MA L.-D., LI J., LI J.-J., LIU M., YAN D.-Z., SHI W.-Y. AND XU G. (2018). "Occurrence and source analysis of selected antidepressants and their metabolites in municipal wastewater and receiving surface water." Environmental Science: Processes & Impacts **20**(7): 1020-1029.
- MACCRIMMON H. R., MARSHALL T. L. AND GOTS B. L. (1970). "World distribution of brown trout, *Salmo trutta*: further observations." Journal of the Fisheries Research Board of Canada **27**(4): 811-818.
- MALAFIA G., DE SOUZA A. M., PEREIRA A. C., GONÇALVES S., DA COSTA ARAÚJO A. P., RIBEIRO R. X. AND ROCHA T. L. (2020). "Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems." Science of The Total Environment **700**: 134867.
- MARKWELL M. A. K., HAAS S. M., BIEBER L. L. AND TOLBERT N. E. (1978). "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples." Analytical Biochemistry **87**(1): 206-210.

## Referenzen

- MASIÁ A., CAMPO J., VÁZQUEZ-ROIG P., BLASCO C. AND PICÓ Y. (2013). "Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain)." Journal of Hazardous Materials **263**: 95-104.
- MATSSON K., JOHNSON E. V., MALMENDAL A., LINSE S., HANSSON L.-A. AND CEDERVALL T. (2017). "Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain." Scientific reports **7**(1): 11452.
- MAXIMINO C., MARQUES DE BRITO T., DIAS C. A. G. D. M., GOUVEIA A. AND MORATO S. (2010). "Scototaxis as anxiety-like behavior in fish." Nature Protocols **5**(2): 209-216.
- MAYMÓ A. C., CERVERA A., DOLORES GARCERÁ M., BIELZA P. AND MARTÍNEZ-PARDO R. (2006). "Relationship between esterase activity and acrinathrin and methiocarb resistance in field populations of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*." Pest Management Science **62**(12): 1129-1137.
- MCKNIGHT U. S., RASMUSSEN J. J., KRONVANG B., BINNING P. J. AND BJERG P. L. (2015). "Sources, occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams." Environmental Pollution **200**: 64-76.
- MESHALKINA D. A., KYSIL E. V., ANTONOVA K. A., DEMIN K. A., KOLESNIKOVA T. O., KHATSKO S. L., GAINETDINOV R. R., ALEKSEEVA P. A. AND KALUEFF A. V. (2018). "The effects of chronic amitriptyline on zebrafish behavior and monoamine neurochemistry." Neurochemical Research **43**(6): 1191-1199.
- MINTZER J. AND BURNS A. (2000). "Anticholinergic side-effects of drugs in elderly people." Journal of the Royal Society of Medicine **93**(9): 457-462.
- MOMMSEN T. P., VIJAYAN M. M. AND MOON T. W. (1999). "Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation." Reviews in Fish Biology and Fisheries **9**(3): 211-268.
- MONSERRAT J. M., GERACITANO L. A., PINHO G. L. L., VINAGRE T. M., FALEIROS M., ALCIATI J. C. AND BIANCHINI A. (2003). "Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **45**(2): 177-183.
- MOORE R. A., DERRY S., ALDINGTON D., COLE P. AND WIFFEN P. J. (2015). "Amitriptyline for neuropathic pain in adults." Cochrane Database of Systematic Reviews (7): CD008242.
- MUIR D., SIMMONS D., WANG X., PEART T., VILLELLA M., MILLER J. AND SHERRY J. (2017). "Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care product chemicals in fish exposed to wastewater effluent in an urban wetland." Scientific reports **7**(1): 16999-16999.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2023). "PubChem Compound Summary for CID 2160, Amitriptyline." Retrieved 04.06, 2023, Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amitriptyline>.
- NEMATDOOST HAGHI B. AND BANAEI M. (2017). "Effects of micro-plastic particles on paraquat toxicity to common carp (*Cyprinus carpio*): biochemical changes." International Journal of Environmental Science and Technology **14**(3): 521-530.
- NGUYEN T., SHAPIRO D. A., GEORGE S. R., SETOLA V., LEE D. K., CHENG R., RAUSER L., LEE S. P., LYNCH K. R., ROTH B. L. AND DOWD B. F. (2001). "Discovery of a novel member of the histamine receptor family." Molecular Pharmacology **59**(3): 427.
- NIESSNER N. AND GAUSEPOHL H. (2003). "Polystyrenes and styrene copolymers – an overview." In: "Modern Styrenic Polymers: Polystyrenes and Styrenic Copolymers.": 25-42. John Wiley & Sons. Ludwigshafen, Germany.
- OECD (1998). "Test no. 212: fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages." OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing. Paris, France.

## Referenzen

- OLIVEIRA M., RIBEIRO A., HYLLAND K. AND GUILHERMINO L. (2013). "Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae)." Ecological Indicators **34**: 641-647.
- ORY N. C., GALLARDO C., LENZ M. AND THIEL M. (2018). "Capture, swallowing, and egestion of microplastics by a planktivorous juvenile fish." Environmental Pollution **240**: 566-573.
- OZDEN S. AND ALPERTUNGA B. (2010). "Effects of methiocarb on lipid peroxidation and glutathione level in rat tissues." Drug and Chemical Toxicology **33**(1): 50-54.
- OZDEN S., CATALGOL B., GEZGINCI-OKTAYOGLU S., ARDA-PIRINCCI P., BOLKENT S. AND ALPERTUNGA B. (2009). "Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats." Food and Chemical Toxicology **47**(7): 1676-1684.
- OZDEN S., CATALGOL B., GEZGINCI-OKTAYOGLU S., KARATUG A., BOLKENT S. AND ALPERTUNGA B. (2012). "Acute effects of methiocarb on oxidative damage and the protective effects of vitamin E and taurine in the liver and kidney of Wistar rats." Toxicology and Industrial Health **29**(1): 60-71.
- PAKKASMAA S. AND PIIRONEN J. (2001). "Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations." Biological Journal of the Linnean Society **72**(2): 231-239.
- PARADIS A. R., PEPIN P. AND BROWN J. A. (1996). "Vulnerability of fish eggs and larvae to predation: review of the influence of the relative size of prey and predator." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **53**(6): 1226-1235.
- PARIS P., BISCEGLIE S., ESPOSITO D., MASCHIO G., PACE E., PACIFICO R., PARISI PRESICCE D., ROMOLI D. AND URSINO S. (2018). "Pesticides in water Italian monitoring 2016". ISPRA Reports **289**. Rome, Italy.
- PARKER B., ANDREOU D., GREEN I. D. AND BRITTON J. R. (2021). "Microplastics in freshwater fishes: occurrence, impacts and future perspectives." Fish and Fisheries **22**(3): 467-488.
- PERSSON L., CARNEY ALMROTH B. M., COLLINS C. D., CORNELL S., DE WIT C. A., DIAMOND M. L., FANTKE P., HASSELLÖV M., MACLEOD M., RYBERG M. W., SØGAARD JØRGENSEN P., VILLARRUBIA-GÓMEZ P., WANG Z. AND HAUSCHILD M. Z. (2022). "Outside the safe operating space of the planetary boundary for novel entities." Environmental Science & Technology **56**(3): 1510-1521.
- PFLSCHG (2012). "Pflanzenschutzgesetz vom 6. Februar 2012 (BGBl. I S. 148, 1281), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 15 des Gesetzes vom 20. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2752) geändert worden ist".
- PIVETTA R. C., RODRIGUES-SILVA C., RIBEIRO A. R. AND RATH S. (2020). "Tracking the occurrence of psychotropic pharmaceuticals in Brazilian wastewater treatment plants and surface water, with assessment of environmental risks." Science of The Total Environment **727**: 138661.
- PLASTICS EUROPE (2022). "Plastics - the facts 2022." Retrieved 01.01.2024, 2024, Available online: <https://plasticseurope.org/de/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>.
- POTTINGER A. S., GEYER R., BIYANI N., MARTINEZ C. C., NATHAN N., MORSE M. R., LIU C., HU S., DE BRUYN M., BOETTIGER C., BAKER E. AND MCCAULEY D. J. (2024). "Pathways to reduce global plastic waste mismanagement and greenhouse gas emissions by 2050." Science **386**(6726): 1168-1173.
- PRAJAPATI A., NARAYAN VAIDYA A. AND KUMAR A. R. (2022). "Microplastic properties and their interaction with hydrophobic organic contaminants: a review." Environmental Science and Pollution Research **29**(33): 49490-49512.
- QIAO R., SHENG C., LU Y., ZHANG Y., REN H. AND LEMOS B. (2019). "Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish." Science of The Total Environment **662**: 246-253.

## Referenzen

- QIU W., WU M., LIU S., CHEN B., PAN C., YANG M. AND WANG K.-J. (2017). "Suppressive immunoregulatory effects of three antidepressants via inhibition of the nuclear factor- $\kappa$ B activation assessed using primary macrophages of carp (*Cyprinus carpio*)." Toxicology and Applied Pharmacology **322**: 1-8.
- QIU X., CHEN C., SHI Y., CHEN K., LI M., XU H., WU X., TAKAI Y., SHIMASAKI Y. AND OSHIMA Y. (2022). "Persistent impact of amitriptyline on the behavior, brain neurotransmitter, and transcriptional profile of zebrafish (*Danio rerio*)." Aquatic Toxicology **245**: 106129.
- R CORE TEAM (2019). "R: a language and environment for statistical computing." R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- RAULT M., COLLANGE B., MAZZIA C. AND CAPOWIEZ Y. (2008). "Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion." Soil Biology and Biochemistry **40**(12): 3086-3091.
- RAUN ANDERSEN H., VINGGAARD A. M., HØJ RASMUSSEN T., GJERMANDSEN I. M. AND CECILIE BONEFELD-JØRGENSEN E. (2002). "Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity *in vitro*." Toxicology and Applied Pharmacology **179**(1): 1-12.
- REGOLI F. AND GIULIANI M. E. (2014). "Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms." Marine Environmental Research **93**: 106-117.
- REHSE S., KLOAS W. AND ZARFL C. (2018). "Microplastics reduce short-term effects of environmental contaminants. Part I: Effects of bisphenol A on freshwater zooplankton are lower in presence of polyamide particles." International Journal of Environmental Research and Public Health **15**(2): 280.
- REIMSCHUESSEL R. AND FERGUSON H. W. (2006). "Kidney." In: "Systemic Pathology of Fish": 91-94. Scotian Press. (Second Edition). London, United Kingdom.
- RICHARDSON K., STEFFEN W., LUCHT W., BENDTSEN J., CORNELL S. E., DONGES J. F., DRÜKE M., FETZER I., BALA G., VON BLOH W., FEULNER G., FIEDLER S., GERTEN D., GLEESON T., HOFMANN M., HUISKAMP W., KUMMU M., MOHAN C., NOGUÉS-BRAVO D., PETRI S., PORKKA M., RAHMSTORF S., SCHAPHOFF S., THONICKE K., TOBIAN A., VIRKKI V., WANG-ERLANDSSON L., WEBER L. AND ROCKSTRÖM J. (2023). "Earth beyond six of nine planetary boundaries." Science Advances **9**(37): eadh2458.
- RIEDELSEIMER B. AND BÜCHL-ZIMMERMANN S. (2015). "Färbungen. Romeis - Mikroskopische Technik": 171-282. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg, Deutschland.
- ROBERTS R. J., BULLOCK A. M., BUDD J., COWEY C. B., ELLIS A. E., LIVERSIDGE J. M., MUNRO A. L. S., NEEDHAM T., POUPARD C. J., RICHARDS R. H., SHEPHERD C. J., TYTLER P., WOOTTEN R., SCHLOTTFELDT H.-J., EVELYN T. P. T., BRESCH H., KÖRTING W., PETERS G., PETERS N. AND ROSENTHAL H. (1985). "Grundlagen der Fischpathologie." Paul Parey. Berlin, Hamburg, Deutschland.
- ROCH S., FRIEDRICH C. AND BRINKER A. (2020). "Uptake routes of microplastics in fishes: practical and theoretical approaches to test existing theories." Scientific reports **10**(1): 3896.
- ROCHA E., MONTEIRO R. A. AND PEREIRA C. A. (1994). "The liver of the brown trout, *Salmo trutta fario*: a light and electron microscope study." J Anat **185** (Pt 2): 241-249.
- ROCKSTRÖM J., STEFFEN W., NOONE K., PERSSON Å., CHAPIN F. S., LAMBIN E. F., LENTON T. M., SCHEFFER M., FOLKE C., SCHELLNHUBER H. J., NYKVIST B., DE WIT C. A., HUGHES T., VAN DER LEEUW S., RODHE H., SÖRLIN S., SNYDER P. K., COSTANZA R., SVEDIN U., FALKENMARK M., KARLBERG L., CORELL R. W., FABRY V. J., HANSEN J., WALKER B., LIVERMAN D., RICHARDSON K., CRUTZEN P. AND FOLEY J. A. (2009). "A safe operating space for humanity." Nature **461**(7263): 472-475.
- ROHANI M. F. (2023). "Pesticides toxicity in fish: histopathological and hemato-biochemical aspects – a review." Emerging Contaminants **9**(3): 100234.

## Referenzen

- ROSMAN Y., MAKAROVSKY I., BENTUR Y., SHROT S., DUSHNISTKY T. AND KRIVVOY A. (2009). "Carbamate poisoning: treatment recommendations in the setting of a mass casualties event." The American Journal of Emergency Medicine **27**(9): 1117-1124.
- RYBERG M. W., HAUSCHILD M. Z., WANG F., AVEROUS-MONNERY S. AND LAURENT A. (2019). "Global environmental losses of plastics across their value chains." Resources, Conservation and Recycling **151**: 104459.
- SANCHEZ-HERNANDEZ J. C., MAZZIA C., CAPOWIEZ Y. AND RAULT M. (2009). "Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: potential (eco)toxicological implications." Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. **150**(4): 503-511.
- SANDERS B. M. (1993). "Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective." Critical Reviews in Toxicology **23**(1): 49-75.
- SANDERSON H., JOHNSON D. J., WILSON C. J., BRAIN R. A. AND SOLOMON K. R. (2003). "Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening." Toxicology Letters **144**(3): 383-395.
- SANTOS J., BARRETO A., COELHO T., CARVALHO E., PEREIRA D., CALISTO V. AND MARIA V. L. (2024). "Amitriptyline ecotoxicity in *Danio rerio* (Hamilton, 1822) embryos – similar toxicity profile in the presence of nanoplastics." Environmental Toxicology and Pharmacology **106**: 104372.
- SCHEIRS J. (2003). "Historical overview of styrenic polymers." In: "Modern Styrenic Polymers: Polystyrenes and Styrenic Copolymers.": 3-24. Jon Wiley & Sons. Edithvale, Australia.
- SCHIAVO S., OLIVIERO M., ROMANO V., DUMONTET S., MANZO S. AND LIU G. (2018). "Ecotoxicological assessment of virgin plastic pellet leachates in freshwater matrices." J. Environ. Account. Manag. **6**: 345-353.
- SCHÜR C., RIST S., BAUN A., MAYER P., HARTMANN N. B. AND WAGNER M. (2019). "When fluorescence is not a particle: the tissue translocation of microplastics in *Daphnia magna* seems an artifact." Environmental Toxicology and Chemistry **38**(7): 1495-1503.
- SCHWAIGER J., WANKE R., ADAM S., PAWERT M., HONNEN W. AND TRIEBSKORN R. (1997). "The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish." Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery **6**(1): 75-86.
- SCHWARZENBACH R. P., ESCHER B. I., FENNER K., HOFSTETTER T. B., JOHNSON C. A., VON GUNTEN U. AND WEHRLI B. (2006). "The challenge of micropollutants in aquatic systems." Science **313**(5790): 1072-1077.
- SCOTT G. R. AND SLOMAN K. A. (2004). "The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity." Aquatic Toxicology **68**(4): 369-392.
- SEHONOVA P., HODKOVICOVA N., URBANOVA M., ÖRN S., BLAHOVA J., SVOBODOVA Z., FALDYNA M., CHLOUPEK P., BRIEDIKOVA K. AND CARLSSON G. (2019a). "Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians." Environmental Pollution **254**: 112999.
- SEHONOVA P., PLHALOVA L., BLAHOVA J., DOUBKOVA V., MARSALEK P., PROKES M., TICHY F., SKLADANA M., FIORINO E., MIKULA P., VECEREK V., FAGGIO C. AND SVOBODOVA Z. (2017). "Effects of selected tricyclic antidepressants on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio*)." Chemosphere **185**: 1072-1080.
- SEHONOVA P., ZIKOVA A., BLAHOVA J., SVOBODOVA Z., CHLOUPEK P. AND KLOAS W. (2019b). "mRNA expression of antioxidant and biotransformation enzymes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to the tricyclic antidepressant amitriptyline." Chemosphere **217**: 516-521.
- SEIFERT J., BLEICH S. AND SEIFERT R. (2022). "Depression, Angststörungen, bipolare Störung, Schizophrenie, Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom." In: "Arzneiverordnungs-Report 2022.": 451-496. Springer. Berlin, Deutschland.
- SIES H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." Experimental Physiology **82**(2): 291-295.

## Referenzen

- SNYDER S. H. AND YAMAMURA H. I. (1977). "Antidepressants and the muscarinic acetylcholine receptor." Archives of General Psychiatry **34**(2): 236-239.
- SOLOMANDO A., CAPÓ X., ALOMAR C., COMPA M., VALENCIA J. M., SUREDA A. AND DEUDERO S. (2021). "Assessment of the effect of long-term exposure to microplastics and depuration period in *Sparus aurata* Linnaeus, 1758: liver and blood biomarkers." Science of The Total Environment **786**: 147479.
- SØRENSEN J. G., KRISTENSEN T. N. AND LOESCHCKE V. (2003). "The evolutionary and ecological role of heat shock proteins." Ecology Letters **6**(11): 1025-1037.
- SPEARE D. AND FRASCA S. J. (2006). "Nervous system." In: "Systemic Pathology of Fish": 218-243. Scotian Press. (Second Edition). London, United Kingdom.
- STEWART A., GAIKWAD S., KYZAR E., GREEN J., ROTH A. AND KALUEFF A. V. (2012). "Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review." Neuropharmacology **62**(1): 135-143.
- STOKSTAD E. AND GRULLÓN G. (2013). "Infographic: pesticide planet." Science **341**(6147): 730-731.
- SUMPTER J. P. AND MARGIOTTA-CASALUCI L. (2022). "Environmental occurrence and predicted pharmacological risk to freshwater fish of over 200 neuroactive pharmaceuticals in widespread use." Toxics **10**(5): 233.
- SUN T., ZHAN J., LI F., JI C. AND WU H. (2021). "Environmentally relevant concentrations of microplastics influence the locomotor activity of aquatic biota." Journal of Hazardous Materials **414**: 125581.
- TAKASHIMA F. AND HIBIYA T. (1995). "An atlas of fish histology: normal and pathological features." Gustav Fischer Verlag (Second Edition). Stuttgart, Germany.
- TALBOT R. AND CHANG H. (2022). "Microplastics in freshwater: a global review of factors affecting spatial and temporal variations." Environmental Pollution **292**: 118393.
- TATSUMI M., GROSHAN K., BLAKELY R. D. AND RICHELSON E. (1997). "Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters." European Journal of Pharmacology **340**(2): 249-258.
- THERNEAU T. M. (2020). "coxme: mixed effects cox models." R package Version: 2.2-16. Retrieved 13 September 2022, Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/coxme/index.html>.
- THOMAS K. V., DA SILVA F. M. A., LANGFORD K. H., DE SOUZA A. D. L., NIZZETO L. AND WAICHMAN A. V. (2014). "Screening for selected human pharmaceuticals and cocaine in the urban streams of Manaus, Amazonas, Brazil." JAWRA **50**(2): 302-308.
- THOMPSON R. C., COURTENE-JONES W., BOUCHER J., PAHL S., RAUBENHEIMER K. AND KOELMANS A. A. (2024). "Twenty years of microplastic pollution research—what have we learned?" Science **386**(6720): ead12746.
- TIAN Z., ZHAO H., PETER K. T., GONZALEZ M., WETZEL J., WU C., HU X., PRAT J., MUDROCK E., HETTINGER R., CORTINA A. E., BISWAS R. G., KOCK F. V. C., SOONG R., JENNE A., DU B., HOU F., HE H., LUNDEEN R., GILBREATH A., SUTTON R., SCHOLZ N. L., DAVIS J. W., DODD M. C., SIMPSON A., MCINTYRE J. K. AND KOLODZIEJ E. P. (2021). "A ubiquitous tire rubber-derived chemical induces acute mortality in coho salmon." Science **371**(6525): 185-189.
- TOGOLA A. AND BUDZINSKI H. (2008). "Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples." Journal of Chromatography A **1177**(1): 150-158.
- TORRES-RUIZ M., DE ALBA GONZÁLEZ M., MORALES M., MARTIN-FOLGAR R., GONZÁLEZ M. C., CAÑAS-PORTILLA A. I. AND DE LA VIEJA A. (2023). "Neurotoxicity and endocrine disruption caused by polystyrene nanoparticles in zebrafish embryo." Science of The Total Environment **874**: 162406.
- TOSETTO L., WILLIAMSON J. E. AND BROWN C. (2017). "Trophic transfer of microplastics does not affect fish personality." Animal Behaviour **123**: 159-167.

## Referenzen

- TRIEBSKORN R., TELCEAN I., CASPER H., FARKAS A., SANDU C., STAN G., COLĂRESCU O., DORI T. AND KÖHLER H.-R. (2008). "Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: Metal accumulation and histopathology in fish." Environmental Monitoring and Assessment **141**(1): 177-188.
- TUMWESIGYE E., FELICITAS NNADOZIE C., C AKAMAGWUNA F., SIWE NOUNDOU X., WILLIAM NYAKAIRU G. AND ODUME O. N. (2023). "Microplastics as vectors of chemical contaminants and biological agents in freshwater ecosystems: current knowledge status and future perspectives." Environmental Pollution **330**: 121829.
- ULLAH S. AND ZORRIEHZAHRA M. J. (2015). "Ecotoxicology: a review of pesticides induced toxicity in fish." Advances in Animal and Veterinary Sciences **3**(1): 40-57.
- USMAN S., ABDULL RAZIS A. F., SHAARI K., AMAL M. N. A., SAAD M. Z., MAT ISA N. AND NAZARUDIN M. F. (2021). "Polystyrene microplastics exposure: an insight into multiple organ histological alterations, oxidative stress and neurotoxicity in Javanese medaka fish (*Oryzias javanicus* Bleeker, 1854)." International Journal of Environmental Research and Public Health **18**(18): 9449.
- USMANI K. A., KAROLY E. D., HODGSON E. AND ROSE R. L. (2004). "In vitro sulfoxidation of thioether compounds by human cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase isoforms with particular reference to the CYP2C subfamily." Drug Metabolism and Disposition **32**(3): 333.
- VALAVANIDIS A., VLAHOGIANNI T., DASSENAKIS M. AND SCULLOS M. (2006). "Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants." Ecotoxicology and Environmental Safety **64**(2): 178-189.
- VAN POMEREN M., BRUN N. R., PEIJNENBURG W. J. G. M. AND VIJVER M. G. (2017). "Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages." Aquatic Toxicology **190**: 40-45.
- VELZEBOER I., KWADIJK C. J. A. F. AND KOELMANS A. A. (2014). "Strong sorption of PCBs to nanoplastics, microplastics, carbon nanotubes, and fullerenes." Environmental Science & Technology **48**(9): 4869-4876.
- VERBRUGGEN B., GUNNARSSON L., KRISTIANSOON E., ÖSTERLUND T., OWEN S. F., SNAPE J. R. AND TYLER C. R. (2017). "ECOdrug: a database connecting drugs and conservation of their targets across species." Nucleic Acids Research **46**(D1): D930-D936.
- VÖLKER C., KRAMM J. AND WAGNER M. (2020). "On the creation of risk: framing of microplastics risks in science and media." Global Challenges **4**(6): 1900010.
- VYSTAVNA Y., HUNEAU F., GRYNENKO V., VERGELES Y., CELLE-JEANTON H., TAPIE N., BUDZINSKI H. AND LE COUSTOMER P. (2012). "Pharmaceuticals in rivers of two regions with contrasted socio-economic conditions: occurrence, accumulation, and comparison for Ukraine and France." Water, Air, & Soil Pollution **223**(5): 2111-2124.
- WAGNER M., SCHERER C., ALVAREZ-MUÑOZ D., BRENNHOLT N., BOURRAIN X., BUCHINGER S., FRIES E., GROSBOIS C., KLASMEIER J., MARTI T., RODRIGUEZ-MOZAZ S., URBATZKA R., VETHAAK A. D., WINTHER-NIELSEN M. AND REIFFERSCHIED G. (2014). "Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know." Environmental Sciences Europe **26**(1): 12.
- WAGSTAFF A., LAWTON L. A. AND PETRIE B. (2022). "Polyamide microplastics in wastewater as vectors of cationic pharmaceutical drugs." Chemosphere **288**: 132578.
- WANG F., WONG C. S., CHEN D., LU X., WANG F. AND ZENG E. Y. (2018). "Interaction of toxic chemicals with microplastics: a critical review." Water Research **139**: 208-219.
- WANG W., NDUNGU A. W., LI Z. AND WANG J. (2017). "Microplastics pollution in inland freshwaters of China: a case study in urban surface waters of Wuhan, China." Science of The Total Environment **575**: 1369-1374.
- WARDMAN T., KOELMANS A. A., WHYTE J. AND PAHL S. (2021). "Communicating the absence of evidence for microplastics risk: balancing sensation and reflection." Environment International **150**: 106116.

## Referenzen

- WEHNER R. AND GEHRING W. (2007). "Zoologie.": 332, 471-480. Georg Thieme Verlag KG (24. Auflage). Stuttgart, Deutschland.
- WEN B., ZHANG N., JIN S.-R., CHEN Z.-Z., GAO J.-Z., LIU Y., LIU H.-P. AND XU Z. (2018). "Microplastics have a more profound impact than elevated temperatures on the predatory performance, digestion and energy metabolism of an Amazonian cichlid." Aquatic Toxicology **195**: 67-76.
- WENDELAAR BONGA S. E. (1997). "The stress response in fish." Physiological Reviews **77**(3): 591-625.
- WHEELLOCK C. E., SHAN G. AND OTTEA J. (2005). "Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides." Journal of Pesticide Science **30**(2): 75-83.
- WHO COLLABORATING CENTRE FOR DRUG STATISTICS METHODOLOGY (2023). "ATC/DDD Index 2023." Accessed at 01.06.2023. Available online: [https://atcddd.fhi.no/atc\\_ddd\\_index/?code=N06AA09](https://atcddd.fhi.no/atc_ddd_index/?code=N06AA09).
- WORM B., LOTZE H. K., JUBINVILLE I., WILCOX C. AND JAMBECK J. (2017). "Plastic as a persistent marine pollutant." Annual Review of Environment and Resources **42**(1): 1-26.
- WORTHING C. R., HANCE R. J. AND BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (1991). "The pesticide manual a world compendium.": 569. British Crop Protection Council (Ninth edition). Farnham, United Kingdom.
- WU M., LIU S., HU L., QU H., PAN C., LEI P., SHEN Y. AND YANG M. (2017a). "Global transcriptomic analysis of zebrafish in response to embryonic exposure to three antidepressants, amitriptyline, fluoxetine and mianserin." Aquatic Toxicology **192**: 274-283.
- WU M., XIANG J., CHEN F., FU C. AND XU G. (2017b). "Occurrence and risk assessment of antidepressants in Huangpu River of Shanghai, China." Environmental Science and Pollution Research **24**(25): 20291-20299.
- XIANG C., CHEN H., LIU X., DANG Y., LI X., YU Y., LI B., LI X., SUN Y., DING P. AND HU G. (2023). "UV-aged microplastics induces neurotoxicity by affecting the neurotransmission in larval zebrafish." Chemosphere **324**: 138252.
- XIANG J., WU M., LEI J., FU C., GU J. AND XU G. (2018). "The fate and risk assessment of psychiatric pharmaceuticals from psychiatric hospital effluent." Ecotoxicology and Environmental Safety **150**: 289-296.
- XIONG F., LIU J., XU K., HUANG J., WANG D., LI F., WANG S., ZHANG J., PU Y. AND SUN R. (2023). "Microplastics induce neurotoxicity in aquatic animals at environmentally realistic concentrations: a meta-analysis." Environmental Pollution **318**: 120939.
- YAMAMOTO N. (2009). "Studies on the teleost brain morphology in search of the origin of cognition." Japanese Psychological Research **51**(3): 154-167.
- YANG H., XIONG H., MI K., XUE W., WEI W. AND ZHANG Y. (2020). "Toxicity comparison of nano-sized and micron-sized microplastics to goldfish *Carassius auratus* larvae." Journal of Hazardous Materials **388**: 122058.
- YANG M., QIU W., CHEN J., ZHAN J., PAN C., LEI X. AND WU M. (2014). "Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline." Aquatic Toxicology **151**: 68-76.
- YANG Y., BAZHIN A. V., WERNER J. AND KARAKHANOVA S. (2013). "Reactive oxygen species in the immune system." International Reviews of Immunology **32**(3): 249-270.
- YIN L., LIU H., CUI H., CHEN B., LI L. AND WU F. (2019). "Impacts of polystyrene microplastics on the behavior and metabolism in a marine demersal teleost, black rockfish (*Sebastes schlegelii*)." Journal of Hazardous Materials **380**: 120861.
- ZARFL C. AND MATTHIES M. (2010). "Are marine plastic particles transport vectors for organic pollutants to the Arctic?" Marine Pollution Bulletin **60**(10): 1810-1814.

## Referenzen

- ZHANG R., WANG M., CHEN X., YANG C. AND WU L. (2020). "Combined toxicity of microplastics and cadmium on the zebrafish embryos (*Danio rerio*)."  
Science of The Total Environment **743**: 140638.
- ZHANG Y., CHEN C. AND CHEN K. (2023). "Combined exposure to microplastics and amitriptyline induced abnormal behavioral responses and oxidative stress in the eyes of zebrafish (*Danio rerio*)."  
Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **273**: 109717.
- ZHAO H.-J., XU J.-K., YAN Z.-H., REN H.-Q. AND ZHANG Y. (2020). "Microplastics enhance the developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants by disturbing the thyroid function and metabolism in developing zebrafish."  
Environment International **140**: 105750.
- ZHOU S., DI PAOLO C., WU X., SHAO Y., SEILER T.-B. AND HOLLERT H. (2019). "Optimization of screening-level risk assessment and priority selection of emerging pollutants – The case of pharmaceuticals in European surface waters."  
Environment International **128**: 1-10.
- ZHU M., NIE G., MENG H., XIA T., NEL A. AND ZHAO Y. (2013). "Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate."  
Accounts of Chemical Research **46**(3): 622-631.
- ZIAJAHROMI S., KUMAR A., NEALE P. A. AND LEUSCH F. D. L. (2018). "Environmentally relevant concentrations of polyethylene microplastics negatively impact the survival, growth and emergence of sediment-dwelling invertebrates."  
Environmental Pollution **236**: 425-431.
- ZIARRUSTA H., MIJANGOS L., IZAGIRRE U., PLASSMANN M. M., BENSKIN J. P., ANAKABE E., OLIVARES M. AND ZULOAGA O. (2017). "Bioconcentration and biotransformation of amitriptyline in gilt-head bream."  
Environmental Science & Technology **51**(4): 2464-2471.

## Teil 2: Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zu Dissertation eingereichten Publikationen und Manuskripten

### **Kapitel I: Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review**

R. TRIEBSKORN, T. BRAUNBECK, T. GRUMMT, L. HANSLIK, S. HUPPERTSBERG, M. JEKEL, T. P. KNEPPER, S. KRAIS, Y. K. MÜLLER, M. PITTROFF, A. S. RUHL, H. SCHMIEG, C. SCHÜR, C. STROBEL, M. WAGNER, N. ZUMBÜLTE, H.- R. KÖHLER

Trends in Analytical Chemistry (2019) **110**: 375-392, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.023>

- 70 % der Literaturrecherche und Datenaufbereitung zu Tabelle 3 des Manuskripts
- 20 % der Literaturrecherche und Datenaufbereitung zu Tabelle 4 des Manuskripts
- 30 % Beitrag zu Kapitel 4.1 des Manuskripts
- Korrektur der Manuskriptentwürfe, Bestätigung des finalen Manuskriptentwurfs

Prof. Dr. R. Triebkorn initiierte die Literaturstudie, schrieb die Zusammenfassung, die Einleitung und das Fazit der Studie. M. Pittroff und Y. K. Müller erstellten mit Beitrag von Dr. N. Zumbülte, Dr. S. Huppertsberg, Prof. Dr. T. P. Knepper, Dr. A. S. Ruhl und Prof. Dr. M. Jekel, Kapitel 2 des Manuskripts. Dr. C. Schür und Prof. Dr. M. Wagner schrieben mit der Unterstützung durch Dr. C. Strobel und Dr. T. Grummt das Kapitel 3 zur Gewebetranslokation von Mikroplastik. Prof. Dr. R. Triebkorn, S. Kraus und ich erstellten Kapitel 4.1 während Prof. Dr. T. Braunbeck, Prof. Dr. H.-R. Köhler und Dr. L. Hanslik, Kapitel 4.2 des Manuskripts schrieben.

**Kapitel II-IV:** Der Projekt- sowie Tierversuchsantrag wurde von Prof. Dr. Rita Triebkorn formuliert und eingereicht. Prof. Dr. Rita Triebkorn betreute die durchgeführten Arbeiten und korrigierte zusammen mit Prof. Dr. Heinz-R. Köhler die Erstversionen aller Publikationen. Das verwendete Mikroplastik wurde als Suspension mit der benötigten Partikelzahl von Dr. Aki S. Ruhl (TU Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Probenahmen erfolgten in Zusammenarbeit mit Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Physiologische Ökologie der Tiere.

**Kapitel II: Polystyrene microplastics do not affect juvenile brown trout (*Salmo trutta f. fario*) or modulate effects of the pesticide methiocarb**

H. SCHMIEG, S. HUPPERTSBERG, T. P. KNEPPER, S. KRAIS, K. REITTER, F. REZBACH, A. S. RUHL, H.-R. KÖHLER, R. TRIEBSKORN

Environmental Sciences Europe (2020) **32**: 49, doi: <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00327-4>

- 90 % der Planung und des experimentellen Designs
- 90 % der Versuchsdurchführung
- 50 % der biochemischen Analysen
- 20 % der histologischen Auswertung
- 100 % der statistischen Auswertung
- 90 % des finalen Manuskripts

Die Analyse der Methiocarb Konzentrationen der Wasserproben wurde von Dr. Sven Huppertsberg unter Betreuung von Prof. Dr. T. P. Knepper durchgeführt sowie das Kapitel des Manuskripts zu Methoden der Analyse erstellt. Katharina Reitter unterstützte im Rahmen ihrer Masterarbeit die Analyse der SOD-Aktivität und führte unter der Anleitung von Prof. Dr. Rita Triebkorn und mir die histopathologischen Analysen durch. Felizitas Rezbach analysierte für ihre Abschlussarbeit die Aktivität der B-Esterasen sowie den Grad der Lipidperoxidation.

**Kapitel III: Interacting Effects of Polystyrene Microplastics and the Antidepressant Amitriptyline on Early Life Stages of Brown Trout (*Salmo trutta f. fario*)**

H. SCHMIEG, J. K. Y. BURMESTER, S. KRAIS, A. S. RUHL, S. TISLER, C. ZWIENER, H.-R. KÖHLER, R. TRIEBSKORN

Water (2020) **12** (9): 2361, doi: <https://doi.org/10.3390/w12092361>

- 90 % der Planung und des experimentellen Designs
- 80 % der Versuchsdurchführung
- 80 % der biochemischen Analysen
- 90 % der Verhaltensanalysen
- 100 % der statistischen Auswertung
- 90 % des finalen Manuskripts

Dr. Selina Tisler analysierte unter der Betreuung von Prof. Dr. Christian Zwiener die Konzentration des Amitriptylins im Wasser und schrieb das Kapitel des Manuskripts zu den Methoden der Analyse. Die rasterelektronischen Bilder des Chorions wurden von Monika Meinert und Prof. Dr. Oliver Betz erstellt. Im Rahmen ihrer Masterarbeit analysierte Janne Burmester die Aktivität der B-Esterasen.

**Kapitel IV: Effects of the Antidepressant Amitriptyline on Juvenile Brown Trout and their Modulation by Microplastics**

H. SCHMIEG, S. KRAIS, K. KÜBLER, A. S. RUHL, I. M. SCHMIDGALL, C. ZWIENER, H.-R. KÖHLER, R. TRIEBSKORN

Toxics (2022) **10**(12): 763, doi: <https://doi.org/10.3390/toxics10120763>

- 90 % der Planung und des experimentellen Designs
- 90 % der Versuchsdurchführungen
- 70 % der biochemischen Analysen
- 70 % der Verhaltensanalysen
- 100 % der statistischen Auswertung
- 90 % des finalen Manuskripts

Prof. Dr. Christian Zwiener analysierte die Konzentration des Amitriptylins in den Wasserproben und erstellte das dazugehörige Kapitel des Methodenteils des Manuskripts. Kathrin Kübler analysierte für ihre Masterarbeit die Aktivität der SOD der juvenilen Bachforellen aus Versuch 5. Isabelle M. Schmidgall untersuchte im Rahmen ihrer Bachelorarbeit die Position der Bachforellen im Aquarium sowie die Aktivität der B-Esterasen der juvenilen Bachforellen aus Versuch 5.

## Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten

### Kapitel I: Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review

RITA TRIEBSKORN<sup>a,b</sup>, THOMAS BRAUNBECK<sup>c</sup>, TAMARA GRUMMT<sup>d</sup>, LISA HANSLIK<sup>c</sup>, SVEN HUPPERTSBERG<sup>e</sup>, MARTIN JEKEL<sup>f</sup>, THOMAS P. KNEPPER<sup>e</sup>, STEFANIE KRAIS<sup>a</sup>, YANINA K. MÜLLER<sup>g</sup>, MARCO PITTRROFF<sup>g</sup>, AKI S. RUHIF<sup>f,h</sup>, HANNAH SCHMIEG<sup>a</sup>, CHRISTOPH SCHÜR<sup>i</sup>, CLAUDIA STROBEL<sup>d</sup>, MARTIN WAGNER<sup>j</sup>, NICOLE ZUMBÜLTE<sup>g</sup> and HEINZ- R. KÖHLER<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, D-72076 Tübingen, Germany

<sup>b</sup> Steinbeis Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, D-72108 Rottenburg, Germany

<sup>c</sup> Aquatic Ecology and Toxicology Group, Center for Organismal Studies, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 230, D-69120, Heidelberg, Germany

<sup>d</sup> German Environment Agency (UBA), Section II 3.6 (Drinking Water and Swimming Pool Water Toxicology), Heinrich-Heine-Str. 12, D-08645 Bad Elster, Germany

<sup>e</sup> Hochschule Fresenius, University of Applied Sciences, Institute for Analytical Research (IFAR), Limburger Str. 2, D-65510 Idstein, Germany

<sup>f</sup> Chair of Water Quality Control, Technische Universität Berlin, Sekr. KF 4, Str. des 17. Juni 135, D-10623 Berlin, Germany <sup>g</sup> TZW: DVGW-Technologiezentrum Wasser - the German Water Centre, Karlsruher Str. 84, D-76139 Karlsruhe, Germany

<sup>h</sup> German Environment Agency (UBA), Section II 3.1 (National and International Development of Drinking Water Quality and Resource Protection), Schichauweg 58, D-12307 Berlin, Germany

<sup>i</sup> Department Aquatic Ecotoxicology, University of Frankfurt am Main, Max-von-Laue-Str. 13, D-60438 Frankfurt, Germany

<sup>j</sup> Department of Biology, Norwegian University of Science and Technology (NTNU), NO-7491 Trondheim, Norway

Published in: *Trends in Analytical Chemistry* (2019) **110**: 375-392,

doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.023>

#### **Keywords**

Review, Microplastics, Nanoplastics, Cellular uptake, Tissue translocation, Effect, Fish, Invertebrate

## **Abstract**

The current paper critically reviews the state-of-the-science on (1) microplastics (MP) types and particle concentrations in freshwater ecosystems, (2) MP and nanoplastics (NP) uptake and tissue translocation, (3) MP/NP-induced effects in freshwater organisms, and (4) capabilities of MP/NP to modulate the toxicity of environmental chemicals. The reviewed literature as well as new data on MP and NP concentrations in the river Elbe and on particle uptake into human cells indicate an environmental relevance of small particles in the low nano- and micrometer range higher than that of larger MP.

## **1 Introduction**

Plastic pollution is an issue of environmental concern that has intensively been discussed in the scientific literature and public media in recent years. Against this background, problems related to the abundance of plastic waste in aquatic ecosystems have been communicated and transported into society by means of – quite often very emotional – reports supplemented by photographs displaying, e.g., birds and turtles either getting entangled in plastic waste or suffering from its ingestion.

Subsequently, microplastics (MP) emerged as a “novel” topic and attracted considerable attention in the scientific community during the last decade. Comprehensive research projects have been initiated, resulting in a massive increase in scientific output. Meanwhile, the topic of MP pollution has also reached the public as well as policy-makers *via* public and social media. However, in these media, the MP topic has often been reported in a less accurate way and has been intermingled with more general environmental problems associated with (macro)plastic waste.

Particularly with respect to consequences of MP for exposed organisms, a clear distinction between different types of plastics is essential. This differentiation is not only necessary for pointing out the differences between macro- and microplastics, but it is also key for the discrimination among effects caused by different types of MP depending on their size, shape and chemical composition.

Most commonly, MP are defined as synthetic polymer particles or fibers with a diameter of 1-5000  $\mu\text{m}$  (Hidalgo-Ruz *et al.* 2012), even though the lower limit has been extended down to 100 nm by the European Food and Safety Authority (EFSA 2016). This extension, however, interferes with the term 'nanoplastics' (NP) which is still under debate, because different studies have set the upper size limit at either 1000 nm or 100 nm. A recent opinion paper by Gigault *et al.* (2018) has defined NP as colloidal plastics within the size range from 1 to 1000 nm. With respect to MP, primary and secondary MP have to be distinguished. Primary MP, e.g. pellets,

granules or microbeads, are produced for distinct purposes, while secondary MP arises from fragmentation of larger plastic items during use or in the environment (Wagner *et al.* 2014).

MP can be found worldwide in the water and sediment phases of aquatic (marine and freshwater) ecosystems (EERKES-MEDRANO *ET AL.* 2015, PEEKEN *ET AL.* 2018) even in the most remote areas of the world, including the deep sea (WOODALL *ET AL.* 2014), the Arctic (LUSHER *ET AL.* 2015), mountain lakes (FREE *ET AL.* 2014) and in atmospheric fallout (GASPERI *ET AL.* 2018). Usually, the major sources or pathways of MP to ecosystems are *via* rivers, drainage systems, abrasion from car tires (WAGNER *ET AL.* 2018), runoff from agricultural land (NIZZETTO *et al.* 2016), effluent of wastewater treatment plants (MURPHY *et al.* 2016) and erosion by wind and currents (ZALASIEWICZ *et al.* 2016).

As of today, many studies on effects in biota were conducted with MP particle concentrations exceeding those measured in or (for particles < 10 µm) extrapolated for the environment by a factor of 10<sup>2</sup>-10<sup>7</sup> (LENZ *et al.* 2016). Furthermore, there is still a striking discrepancy between high concentrations of smaller particles tested for toxicity and low concentrations of rather large particles analyzed in the environment. Only little information is available on the abundance and distribution as well as on biological effects of NP particles with a diameter <1 µm, even though exactly this fraction is supposed to be of notable biological and environmental relevance (IVLEVA *et al.* 2017, SCHYMANSKI *et al.* 2018), particularly with respect to toxic and ecotoxic effects (REHSE *et al.* 2016, REZANIA *et al.* 2018).

In the present paper, the state-of-the science is critically reviewed with regard to toxicity studies with MP and NP focusing on (1) an evaluation of environmental relevance, (2) an assessment of their potential to transfer to tissues and (3) modulation capacities reported for MP and NP for the toxicity of other chemicals.

## **2 Environmental concentrations of MP and NP as prerequisites for the assessment of effect data**

(References cited in Table 1 are numbered as T1/1-16. Full citations are provided in the supplement).

In this chapter, data for MP/NP concentrations in freshwater ecosystems including effluent, surface water and sediment concentrations are reviewed as a basis for the assessment of the environmental relevance of the reviewed ecotoxicological studies. In addition, previously unpublished data for MP concentrations in the German River Elbe generated within the German research project MiWa are provided, which also serve as a basis for this assessment. The concentrations of MP > 300 µm, e.g., have been reported to vary between 0.027 particles/m<sup>3</sup> in Laurentian Great Lakes (T1/7) or 0.12 particles/m<sup>3</sup> in Lake Hovsgol, Mongolia (T1/8), and up to

387 particles/m<sup>3</sup> in the Rhine River (MANI *et al.* 2015). Studies that investigated smaller particles, however, revealed very high particle concentrations especially for MP with a diameter < 20 µm (IVLEVA *et al.* 2017, SCHYMANSKI *et al.* 2018). Around 10<sup>5</sup> particles/m<sup>3</sup> were detected in urban Amsterdam canal water (T1/6); 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> particles/m<sup>3</sup> were documented for the Three Gorges Reservoir, China (DI & WANG 2018). Further studies on MP levels in freshwater systems are listed in Table 1.

Within the scope of the project “MiWa – Microplastics in the Water Cycle”, six sites along the German 538.5 km long stretch of the Elbe River were sampled with a micro-sieve filter cascade (5, 20, 100 µm mesh sizes) coupled to a submersible pump positioned in 0.5 m water depth (ELBSCHWIMMSTAFFEL 2017). Sample volumes between 250 L and 450 L were filtered for each site. The filter cakes were extracted in an ultrasonic bath, treated with ozone to reduce fluorescence, centrifuged and density-separated in a sodium polytungstate solution. MP particles down to diameters of 4 µm were analyzed on polytetrafluoroethylene (PTFE) filter membranes with micro-Raman spectroscopy (µ-RM). Additionally, total numbers of both inorganic and organic particles (1-200 µm) were quantified with a laser light extinction particle counter. The total particle concentration was in the magnitude of 10<sup>11</sup> particles/m<sup>3</sup>. The MP particle numbers for each sampling site varied between 10<sup>5</sup> particles/m<sup>3</sup> and 9 x 10<sup>5</sup> particles/m<sup>3</sup> (overall 96.5% polyethylene (PE), 1.8% polystyrene (PS), 0.7% polypropylene (PP), 0.5% polyamide (PA) and 0.5% polyoxymethylene). Thus, not more than 10 out of 10<sup>6</sup> particles consisted of plastic. The estimated MP loads were 4-30 kg/d (1.5-3.7 t/a).

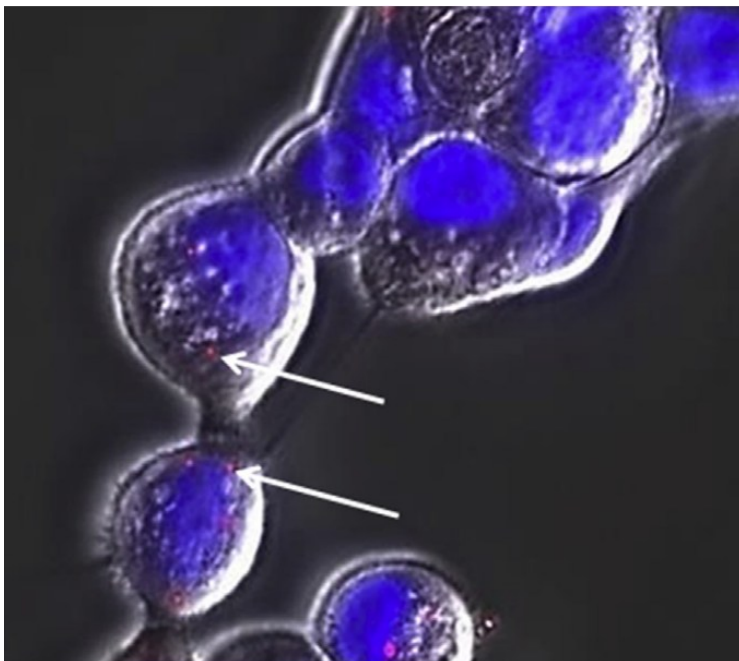
Remarkably, 96% of the MP had diameters below 20 µm, and no MP particles larger than 100 µm were found. The largest particle diameter was 97 µm, and the smallest diameter was 4 µm. The high number of small particles (< 20 µm) accounts for more than 90% of the overall particle number, but results in a very small particle mass (ng mass range). This supports findings from previous studies (Table 1) and highlights the need to take the high number of small MP particles specifically into consideration for MP/NP research, in particular due to their probably higher relevance for biota and the environment.

Even though the knowledge on the impact of MP on aquatic ecosystems and human health is still limited, there is concern about the translocation of NP and MP to tissues (addressed in chapter 3), their toxicity in freshwater biota (chapter 4.1), and its possible interaction with environmental chemicals (4.2). In the following chapter, we therefore review the existing literature on this topic.

### 3 Tissue translocation of NP and MP in aquatic invertebrates and fish

(References cited in Table 2 are numbered as T2/1-31. Full citations are provided in the supplement).

Besides the chemical toxicity of NP and MP as well as their potential to mechanically cause injuries (e.g., at the epithelia of gills or of the digestive tract), the translocation of plastic particles from the external medium into tissues is a prerequisite for plastic-mediated adverse effects such as inflammation or necrosis. Already abundant membrane injuries can facilitate this passage. The terminology in the literature related to cellular uptake and tissue translocation of NP and MP, however, is often ambiguous or imprecise. From a biological point of view, the transfer of particles into the lumen of the gastrointestinal tract or an attachment to other external surfaces (e.g., gills) has to be regarded as external to the body. Nonetheless, some researchers use the term 'uptake' when describing microplastics adhering to gills or other soft tissues like the intestinal epithelium (T2/23). To clarify, we use the terms 'uptake' and 'translocation' only when particles have penetrated into either cells or tissues beyond the epithelial surface. This, for example, was shown in the project MiWa for polystyrene particles of  $0,25 \pm 0,06 \mu\text{m}$ , which were taken up by human keratinocytes (Fig. 1).



**Fig. 1.** Human keratinocytes, which have taken up red fluorescent polystyrene particles of  $0.25 \pm 0.06 \mu\text{m}$ . Nuclei of the cells are stained in blue by Hoechst 33342. By courtesy of Tamara Grummt and Claudia Strobel, UBA Bad Elster.

**Table 1.** Selected literature data for MP types, and particle concentrations in freshwater ecosystems. Detailed citations are provided in supplementary material (T1/1-16).

Matrix	Location	MP type	Particle size	Particle number	Sampling method	Detection method	Reference
<b>WWTP effluent</b>	Scotland	Flakes, fibers, film, beads, foam	> 65 µm	250-15 700/m <sup>3</sup>	Steel buckets and sieve	Microscope + FTIR	T1/1: MURPHY <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 50: 5800-5808.
	Australia	Fragments, flakes, films, spheres	> 25 µm	280-1 540/m <sup>3</sup>	Fractionated filtering	FTIR	T1/2: ZIAJAHROMI <i>et al.</i> (2017) <u>Water Res.</u> 112: 93-99.
	Los Angeles, USA	Irregularly shaped fragments	> 20-400 µm	0.002/m <sup>3</sup>	Sieving and filtering method	Microscope + FTIR	T1/3: CARR <i>et al.</i> (2016) <u>Water Res.</u> 91: 174-182.
	Oldenburg, Germany	Particles, fibers	> 20 µm	10-9 000/m <sup>3</sup>	Custom made pump + stainless steel cartridge filter	ATR- and µ-FTIR	T1/4: MINTENIG <i>et al.</i> (2017) <u>Water Res.</u> 108: 365-372.
	Helsinki, Finland	Fragments, flakes, films, spheres	> 20 µm	5-2 000/m <sup>3</sup>	Pump + custom made filter	Microscope + µ- FTIR	T1/5: TALVITIE <i>et al.</i> (2017) <u>Water Res.</u> 123: 401-407.
	Amsterdam, Netherland	Spheres, foils, fibers	> 10 µm	9,000-142 000/m <sup>3</sup>	Effluent: grab samples	FTIR	T1/6: LESLIE <i>et al.</i> (2017) <u>Environ. Int.</u> 101: 133-142.
<b>Surface water</b>	Laurentian Great Lakes	Microbeads	> 355 µm	0.027/m <sup>3</sup>	Manta trawl (333 µm)	SEM/EDS	T1/7: ERIKSEN <i>et al.</i> (2013) <u>Mar. Poll. Bull.</u> 77 177-182.
	Lake Hovsgol, Mongolia	Fragments, foam, fibers, pellets, films	> 355 µm	0.012/m <sup>3</sup>	Manta trawl (333 µm)	Microscope	T1/8: FREE <i>et al.</i> (2014) <u>Mar. Pollut. Bull.</u> 85 156-163.
	Rivers Germany	Fragments, foam, fibers, pellets, films	> 300 µm (> 20 µm)	2.9-214/m <sup>3</sup>	Manta trawl (300 µm)	ATR- and µ-FTIR	T1/9: HEB <i>et al.</i> (2018) LANUV, LFU, HLNUG, LUBW.
	Tamar Estuary, UK	Floating plastic debris	> 270 µm	0.028/m <sup>3</sup>	Manta trawl (300 µm)	FTIR	T1/10: SADRI AND THOMPSON (2014) <u>Mar. Pollut. Bull.</u> 81 55-60.
	Urban lakes, Hanjiang and Wuhan rivers, China	Colored granule, films, pellets, fibers	> 50 µm	1 660-8 925/m <sup>3</sup>	Sieving	Microscope + SEM + FTIR	T1/11: WANG <i>et al.</i> (2017) <u>Sci. Tot. Environ.</u> 575 (Supplement C) 1369-1374.
	North Sea coast, Netherlands		> 30 µm	27 000/m <sup>3</sup>	1 L glass jar	Microscope + RM	T1/12: KARLSSON <i>et al.</i> (2017) <u>Mar. Poll. Bull.</u> 122 403-408.

**Table 1.** Continued.

Matrix	Location	MP type	Particle size	Particle number	Sampling method	Detection method	Reference
<b>Sediments</b>	Middle-Lower Yangtze River, China	Pellets, films, fragments, fibers	>20 $\mu\text{m}$	500-3 100/m <sup>3</sup>	Bucket and Peterson sampler	$\mu$ -FTIR	T1/13: SU <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 234: 347-355.
	Amsterdam, Netherlands	Spheres, foils, fibers	> 10 $\mu\text{m}$	48 000-18 7000/m <sup>3</sup>	2 L glass bottles	FTIR	T1/6: LESLIE <i>et al.</i> (2017) <u>Environ. Int.</u> 101: 133-142.
	River Thames basin, UK	Fragments, fibers, films	> 1 mm	66/100 g	Stainless steel scoop + glass jar	Microscope + RM	T1/14: HORTON <i>et al.</i> (2017) <u>Mar. Poll. Bull.</u> 114: 218-226.
	North Sea coast, Netherlands		> 30 $\mu\text{m}$	48/kg	Metal spoon	Microscope + RM	T1/12: KARLSSON <i>et al.</i> (2017) <u>Mar. Poll. Bull.</u> 122: 403-408.
	Middle-Lower Yangtze River, China	Pellets, films, fragments, fibers	> 20 $\mu\text{m}$	15-1 600/L	Bucket and Peterson sampler	$\mu$ -FTIR	T1/13: SU <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 234 347-355.
	Qinghai Lake, China	Sheets, fibers, fragments, foam	>112 $\mu\text{m}$	50-1 292/m <sup>2</sup>	Shoveled	RM	T1/15: XIONG <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 235: 899-906.
	Rivers in Shanghai, China	Fragments, spheres, fibers	>1 $\mu\text{m}$	410-1 600/kg	Shoveled	$\mu$ -FTIR	T1/16: PENG <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 234: 448-456.

**Table 2.** Overview of the available studies on the tissue translocation of NP and MP; translocation reported by the authors. Detailed citations are provided in supplementary material (T2/1-31).

Species	Polymer type (size/size range; $\mu\text{m}$ )				Trans- location	Reference
	PMMA	PS	PET	PE		
<i>Caenorhabditis elegans</i>		0.1			+	T2/1: ZHAO <i>et al.</i> (2017). <u>Env. Sci. Nano.</u>
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	< 0.2				+	T2/2: BHARGAVA <i>et al.</i> (2018) <u>Chem. Eng.</u>
<i>Carcinus maenas</i>		500			+	T2/3: FARRELL AND NELSON (2013) <u>Environ. Pollut.</u> 177: 1-3.
		10			-	T2/4: WATTS <i>et al.</i> (2014) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 48: 8823-8830.
		8			-	T2/5: WATTS <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 50: 5364-5369.
<i>Uca rapax</i>		180-150			-	T2/6: BRENNECKE <i>et al.</i> (2015) <u>Mar. Pollut. Bull.</u> 96: 491-495.
<i>Daphnia galeata</i>		0.052			+	T2/7: CUI <i>et al.</i> (2017) <u>Sci. Rep. UK</u> 7.
<i>Daphnia magna</i>		0.025			+	T2/8: BRUN <i>et al.</i> (2017) <u>Nanotoxicol.</u> 11: 1059-1069.
		0.06039; 0.05745; 0.05729			+	T2/9: CHAE <i>et al.</i> (2018) <u>Sci. Rep.</u> 8: 284.
		0.02; 1	60-1400		-	T2/10: JEMEC <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Pollut.</u> 219: 201-209.
					+	T2/11: ROSENKRANZ <i>et al.</i> (2009) <u>Toxicol. Chem.</u> 28: 2142-2149.
<i>Scrobicularia plana</i>		20			+	T2/12: RIBEIRO <i>et al.</i> (2017) <u>Mar. Pollut. Bull.</u>
<i>Dreissena polymorpha</i>		1; 10			+	T2/13: MAGNI <i>et al.</i> (2018) <u>Sci. Total Environ.</u> 631-632: 778-788.
<i>Mytilus edulis</i>		0.0096; 3			+	T2/14: BROWNE <i>et al.</i> (2008) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 42: 5026-5031.
				< 80	+	T2/15: VON MOOS <i>et al.</i> (2012) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 46: 11327-11335.
					-	[a] T2/16: KOLANDHASAMY <i>et al.</i> (2018) <u>Sci. Tot. Environ.</u> 610/611: 635-640.
<i>Mytilus galloprovincialis</i>				1-50	-	T2/17: DÉTRÉE AND GALLARDO-ESCÁRATE (2017) <u>Mollus. Stud.</u> 83: 220-225.
<i>Paracentrotus lividus</i>		0.04; 0.05			-	T2/18: DELLA TORRE <i>et al.</i> (2014) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 48: 12302-12311.

Table 2. Continued.

Species	Polymer type (size/size range; $\mu\text{m}$ )				Trans- location	Reference
	PMMA	PS	PET	PE		
<i>Carassius carassius</i>		0.040; 0.050; 0.052; 0.053; 0.057; 0.120; 0.180; 0.33			+	T2/19: MATTSSON <i>et al.</i> (2017) <u>Sci. Rep.</u> UK 7.
<i>Carassius auratus</i>			50-500	> 63	-	T2/20: GRIGORAKIS <i>et al.</i> (2017) <u>Chemosphere</u> 169: 233-238.
<i>Danio rerio</i>		0.025 0.05 0.07; 5; 20 0.02-0.1 0.042 0.02 0.025-0.05 0.25; 0.7			- + + + + +	T2/21: BRUN <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Sci. Nano.</u> T2/22: CHEN <i>et al.</i> (2017) <u>Sci. Total Environ.</u> 609: 1312-1321. T2/23: LU <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 50: 4054-4060. T2/24: PITT <i>et al.</i> (2017) <u>Aquat. Toxicol.</u> T2/25: PITT <i>et al.</i> (2018) <u>Sci. Total Environ.</u> 643: 324-334. T2/26: SKJOLDING <i>et al.</i> (2017) <u>Nanotoxicol.</u> 11: 351-359. T2/27: VAN POMEREN <i>et al.</i> (2017) <u>Aquat. Toxicol.</u> 190: 40-45. T2/27: VAN POMEREN <i>et al.</i> (2017) <u>Aquat. Toxicol.</u> 190: 40-45.
<i>Engraulis encrasicolus</i>				124-438	+	T2/28: COLLARD <i>et al.</i> (2017) <u>Environ. Pollut.</u> 229: 1000-1005.
<i>Mugil cephalus</i>		10-5000		10-5000	+	T2/29: AVIO <i>et al.</i> (2015) <u>Mar. Environ. Res.</u> 111: 18-26.
<i>Oreochromis niloticus</i>		0.1			+	T2/30: DING <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 238: 1-9.
<i>Oryzias latipes</i>		0.0394; 0.474; 0.932; 18.6; 42.0			+	T2/31: KASHIWADA (2006) <u>Environ. Health Perspect.</u>
<i>Oryzias sinensis</i>		0.06039; 0.05745; 0.05729			+	T2/9: CHAE <i>et al.</i> (2018) <u>Sci. Rep.</u> 8: 284.

[a] Particles > 100  $\mu\text{m}$  tested, particle type unknown.

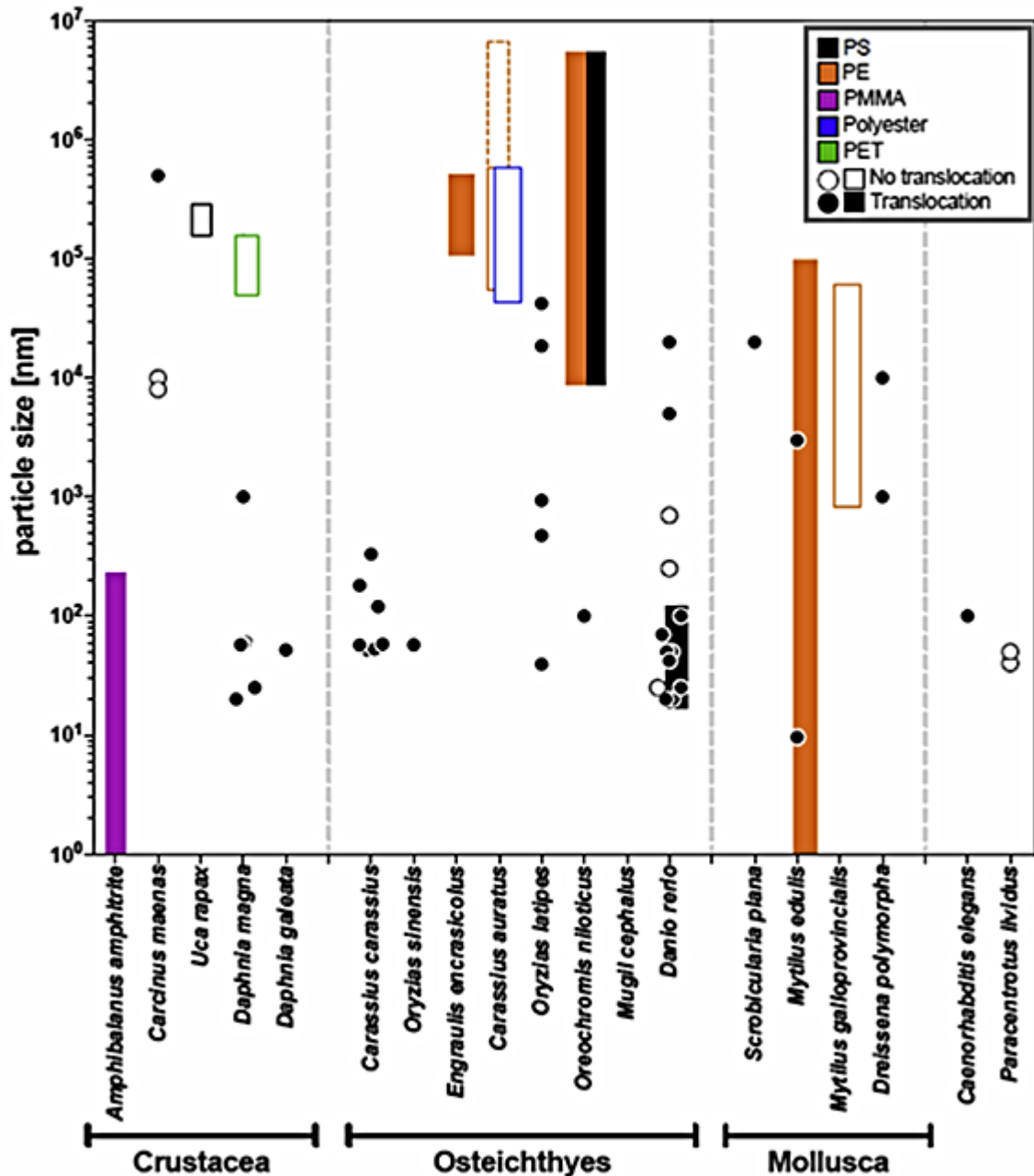
### 3.1 Available data on tissue translocation

Overall, 31 studies were identified investigating the translocation of plastic particles (Fig. 2 and Table 2), covering 18 different species from the taxa Mollusca (3 species), Crustacea (5), Osteichthyes (8), Echinodermata (1), and Nematoda (1). Among the five polymer types used in the majority were polystyrene (PS, 24 studies) and polyethylene (PE, 5 studies). Polyethylene terephthalate (PET), polymethylmethacrylate (PMMA) and polyester were used in one study each. Particle types (62 types tested) included mainly spheres (46 types, 74%), shredded or commercially available irregular particles (13 types) and fibers (3 types). The majority of the particles were fluorescent, as fluorescence microscopy was the main detection method.

Most data are available for zebrafish (*Danio rerio*; 7 studies). Exposures to particle sizes between 20 and 20 000 nm have led to partially conflicting results: BRUN *et al.* (T2/21) found inflammatory responses associated with 25 nm PS particles, but no tissue translocation. In contrast, VAN POMEREN *et al.* (T2/27) used the same particle size and material and reported an uptake into tissues (primarily in the eye), which is in line with various studies on nanoparticles (T2/22, T2/24-26). There is also disagreement regarding the sizes of particles that can be taken up by cells and translocated among tissues. While in one study 0.25 and 0.7  $\mu\text{m}$  particles did not translocate (T2/27), another study reported the uptake of 5 and 20  $\mu\text{m}$  particles into liver tissue (T2/23). AVIÒ *et al.* (T2/29) described large particles up to the mm range into liver tissue of *Mugil cephalus*, and several studies in fish reported the accumulation of NP and MP in fatty tissues, such as the yolk of fish larvae (T2/24, T2/31) and brain (T2/19, T2/22).

Four studies on crab species exposed to PS cover *Carcinus maenas* and *Uca rapax* (T2/3-6). Here, only FARRELL AND NELSON (T2/3) found the translocation of very large particles to the hemolymph and a number of organs. All studies on *Daphnia* species and PS found translocation to either lipid droplets (T2/9, T2/11), or embryos (T2/7-8). Translocation of PET fibers between 62 and 1400  $\mu\text{m}$  length was not observed by JEMEC *et al.* (T2/10). BHARGAVA *et al.* exposed barnacles (*Amphibalanus amphitrite*) to PMMA particles < 200 nm and found distribution throughout the animals (T2/2).

Out of the six studies on mollusks, four focused on *Mytilus edulis* or *M. galloprovincialis* and one each on *Dreissena polymorpha* and *Scrobicularia plana*. All studies with PS found translocation to tissues or the hemolymph (T2/12-14). While VON MOOS *et al.* (T2/15) reported a translocation for PE of up to 80  $\mu\text{m}$  in *M. edulis*, DÉTRÉE AND GALLARDO-ESCÁRATE (T2/17) did not observe this for particles between 1 and 50  $\mu\text{m}$  in *M. galloprovincialis*. In addition to fish, crustaceans and mollusks, ZHAO *et al.* (T2/1) reported distribution of 100 nm PS particles throughout the nematode *Caenorhabditis elegans*, while sea urchin embryos did not show any tissue translocation of 40 and 50 nm PS particles (T2/18).



**Fig. 2.** Overview of the data available on tissue translocation of nano- and microplastics in aquatic invertebrates and fish according to species, sizes and polymer types. The figure exclusively shows data from the studies discussed in chapter 3 of this publication.

### 3.2 Approaches to investigate tissue translocation

Methodologically, most studies rely on fluorescence-labeled particles to investigate tissue translocation. These can be tracked in intact specimens or histological slides using advanced fluorescence microscopy, such as confocal laser scanning microscopy (CLSM) or hyperspectral microscopy (T2/19). Alternatively, fluorescence was measured after digestion of tissues. Some studies used optical projections (T2/7) to locate particles. Electron microscopy (EM) was usually used as a supporting method, but not as the main means of investigation.

Apparently, fluorescence-based measures have certain limitations. Importantly, the fluorescent dye is often not covalently bound to the particle and subsequently may leach out. As the dyes are lipophilic, they may accumulate in lipid-rich tissues of animals under investigation. Sample treatment using detergents and solvents may further facilitate leaching. Although this issue is hardly addressed in the published literature, it is often unclear whether a fluorescence signal actually originates from particles or free dye (KETTIGER *et al.* 2013, ROTHEN-RUTISHAUSER *et al.* 2014). For instance, this might be the case in the study by ROSENKRANZ *et al.* (T2/11), where it could not be concluded that the observed fluorescence was particle-related. Particulate structures inside the lipid droplet visible under the electron microscope were considered translocated particles but were also present in control animals. Therefore, adequate controls are needed to ensure that the observed fluorescence actually represents translocated particles. Other possible sources of artefacts are discussed in JENSEN *et al.* (2017).

Leaching of fluorescence may also occur during histological procedures, when solvents etc. are applied. In addition, histological approaches can be prone to contamination of slides by air-borne particles or unintended relocation of particles through the cutting process, particularly when using high particle concentrations.

Along the same line, the tracking of NP within biota remains challenging. The resolution of fluorescence microscopes does usually not allow for the detection of individual nanosized particles and, therefore, may underestimate the frequency of translocation events. For example, for gold nanoparticles, ROTHEN-RUTISHAUSER *et al.* (2014) concluded that transmission electron microscopy (TEM) revealed 150-times more NP events per cell than CLSM. However, the low-density plastics are not readily detected using TEM. Alternative techniques, such as RM or coherent anti-Stokes Raman scattering, are limited in resolution by the optical diffraction to the micrometer range (IVLEVA *et al.* 2017). Accordingly, adequate methods to detect NP in tissues are missing.

### *3.3 Mechanisms of tissue translocation*

Particle properties play a major role in mediating cellular uptake (KETTIGER *et al.* 2013, ZHU *et al.* 2013). Therefore, insights gained for one polymer type with specific properties are hardly transferable to other ones (OGONOWSKI *et al.* 2018). Size and surface charge are important factors for uptake. Particles in the low nanometer range may passively cross membranes, whereas larger ones require active transport. Cationic particles more readily attach to cell surfaces than neutral or anionic particles and are, therefore, more likely to be taken up by active transport mechanisms (ZHU *et al.* 2013). In principle, higher particle concentrations should increase the chance of an interaction with epithelia, thus, enabling translocation in the first place.

Additionally, weathering and the formation of an eco-corona (i.e., attachment of biomolecules) likely influence the interaction of particles with biota (ZHU *et al.* 2013). However, factors other than size have so far hardly been considered when studying tissue translocation.

Plastic particles can cross intact biological barriers by endocytotic processes such as phagocytosis and persorption (WRIGHT *et al.* 2013, WRIGHT & KELLY 2017). The former is an active vesicle-mediated process (ECKERT *et al.* 2002) involving a number of sub-mechanisms (KETTIGER *et al.* 2013). Persorption is a paracellular mechanical process driven by the kneading of particles through an epithelial layer into underlying tissues (WRIGHT & KELLY 2017), potentially facilitated by the weakening of gap junctions (CARR *et al.* 2012). Under normal conditions, persorption is restricted by junctional complexes (POWELL *et al.* 2010). They can be weakened by chemicals, disease, irradiation (CARR *et al.* 2012), tissue damage or the loss of cells (POWELL *et al.* 2010). This may promote translocation. The majority of these findings stem from cell culture experiments or mammals and cannot easily be extrapolated to invertebrates; thus, the relevance of persorption is currently not clear (POWELL *et al.* 2010).

Size is a crucial factor for uptake, with very small particles being able to passively cross membranes while larger ones require active endocytosis (KETTIGER *et al.* 2013). Generally, processes facilitating active uptake into tissues appear to work on particles up to 1  $\mu\text{m}$  (ZHU *et al.* 2013). VOLKHEIMER (1974) reported the persorption of silicate particles of up to 150  $\mu\text{m}$  in dog tissues, however, as a rare occurrence.

In this context, it needs to be considered that even macrophages, i.e., cells with the highest capacity for phagocytosis, at best incorporate 1-3  $\mu\text{m}$  particles (TABATA & IKADA 1988, CHAMPION *et al.* 2008). In rare cases, macrophages ingest latex beads > 20  $\mu\text{m}$  (CANNON & SWANSON 1992), but such phagocytic potential is likely restricted to certain cell types. For mammals, FLORENCE (1997) discusses M-cells of the intestinal Peyer's patches as an additional route of entry into the lymphatic system or blood supply. This process was later deemphasized by CARR *et al.* (2012) and is not applicable to invertebrates, which lack Peyer's patches. Obviously, our limited knowledge of these processes in mammalian cells and organisms leaves even bigger gaps regarding insight into invertebrates; therefore, we can only assume similarities.

Invertebrates have additional means to protect the integrity of their tissues. Most arthropods, for example, produce a peritrophic membrane, a chitinous layer enveloping the gut contents. This physical barrier prevents direct interaction of epithelial cells and particles (LEHANE 1997). In that case, penetration or destruction of the peritrophic membrane is another obligate requirement for particles to get in contact with the gut epithelium. In *Daphnia magna*, the peritrophic membrane is permeable for 130 nm, but not for 327 nm latex beads (HANSEN & PETERS

1998). In contrast, LEHANE (1997) suggests pore sizes between 2 and 650 nm diameter in a number of different arthropod species. Shedding of the peritrophic membrane during ecdysis has been shown to be a significant mechanism for the depuration of CeO<sub>2</sub> nanoparticles in *Daphnia* (AUFFAN *et al.* 2013).

Overall, 62 particle sizes or size fractions were investigated in the 31 studies reviewed. Here, tissue translocation was observed in 49 cases. While this implies that a tissue translocation of NP and MP is common, methodological limitations may cause false negative and false-positive results that need to be addressed using more stringent quality controls, particularly in studies using rather large MP that cannot be taken up by phagocytosis. As many of these issues have already been faced by researchers investigating engineered nanoparticles, we can learn from other fields, accordingly (KETTIGER *et al.* 2013, RIST & HARTMANN 2018). In addition, a broader range of taxa needs to be considered to widen the scope and to potentially gain insight into prerequisites, mechanisms, and conditions of tissue translocation. Importantly, translocation events need to be linked with adverse impacts to evaluate their biological relevance.

In summary, the potential translocation of NP and MP to tissues is of major toxicological concern. The biological mechanisms by which small plastic particles may enter cells and tissues include passive diffusion, endocytosis and persorption. At the same time, animals have evolved mechanisms preventing particles from entering tissues, such as peritrophic membranes in a range of invertebrate taxa. Out of the 31 available experimental studies, 22 report an uptake of NP or MP into the tissues of several species. While this is biologically plausible for very small plastic particles, some studies claim a tissue transfer of very large MP (Table 2). Since mechanisms facilitating the passage of such large particles are unknown, their tissue translocation is questionable. There is a number of factors that may result in false positive results, including leaching of the fluorescent dye, dislocation of particles during histological processing and general sample contamination. This highlights the need to apply rigorous quality assurance and controls in tissue translocation experiments.

#### **4 Effects of MP and NP in freshwater invertebrates and fish**

##### *4.1 Effects of particles alone*

(References cited in Tables 3 and 4 are numbered as T3/1-34 and T4/1-33. Full citations are provided in the supplement).

In parallel to the development of sampling and detection methods for MP and NP, in recent years numerous studies have been published aiming at shedding light on potential effects of MP and NP in freshwater invertebrates and fish. In fact, two recent reviews on environmental issues of

MP (ANBUMANI & KAKKAR 2018, LI *et al.* 2018) summarize the state-of-the-science for the toxicity of MP in freshwater biota, however, without critical assessment of their environmental relevance and validity. It is, therefore, one major aim of this communication to evaluate existing toxicity data in such respect and to identify methodological limitations.

When reviewing the toxicity data published until August 2018 (Tables 3 and 4), a multifaceted image becomes obvious with a wide range of particle types, particle sizes and plastic amounts tested in a variety of different species. Most frequently, PE and PS particles in a size range from 0.05 to > 700  $\mu\text{m}$  were tested. PA, PP, PMMA, PVC, PET and other polymers were only used in a few studies. Only few papers also addressed effects of mixtures of different plastic types (T4/21, T4/33). With respect to test organisms, more than half of the studies use a variety of fish species (including some brackish water species). NP or MP effects in invertebrates were mainly studied in crustaceans (mainly water fleas and gammarids) and, to a minor extent, in mollusks (snails and bivalves), sediment-dwelling organisms such as chironomid larvae, nematodes and annelids. With respect to the investigated effects, a wide range of different toxicological endpoints was addressed. These include studies on mortality, morphological alterations, growth, reproduction, behavior, different cellular, immunological, and metabolic parameters as well as a series of stress indicators including e.g., microbial dysbiosis in the gut.

Likewise, information on exposure conditions in general remains highly inconsistent. Only 27 studies could be identified which either directly provided information on the particle concentrations used or allowed calculation of this parameter. Out of these, 17 studies exclusively used concentrations  $\geq 10^4$  particles/L, eight studies (T3/6, T3/11, T3/13, T3/20, T3/30, T4/22, T4/24, T4/28) included  $< 10^4$  particles/L, mainly in addition to higher concentrations. Two studies tested MP in sediments (T4/1, T4/29).

In general, there was a trend to test larger particles in lower concentrations and smaller particles (NP) in higher concentrations. The lowest water concentration tested was 50 particles with a size of 420-500  $\mu\text{m}$ /L by DE SÁ and colleagues (T3/30), and the maximum concentration was  $1.1 \times 10^{13}$  particles per liter with a size of 70 nm in the study by LU *et al.* (T3/8). Another study of SJOLLEMA *et al.* (T4/6) who also tested concentrations in the  $10^{12}$  particles/L range used 50 nm NP particles. Despite their small size, however, such extraordinarily high concentrations result in high ratios of plastics in the medium (calculated for the LU *et al.* study about 0.15% of the medium with a rather large surface of about 0.15  $\text{m}^2$ , assuming spherical particles). The study with the lowest proportion of plastics in the medium was conducted by GUVEN *et al.* (T3/20), who tested 97  $\mu\text{m}$  MP at a concentration of 100 particles per liter.

The studies providing information on particle concentrations were assessed with respect to the environmental relevance of at least one of the conditions tested. For that purpose, exposure concentrations were compared to environmental concentrations of MP of the respective size shown either in Table 1 or in chapter 2 (data for the river Elbe, Germany). However, since no exposure data for particles < 5 µm were available, seven studies which used such small particles could not be assessed for their environmental relevance (T2/13, T3/24, T4/15, T4/18, T4/22, T4/26, T4/31). Two further papers (T3/6, T3/11) could also not be assessed, since no exact particle size was given. Out of 18 papers assessed, only three studies tested environmentally relevant concentrations (T3/20, T4/ 28, T4/29). Only in one (T4/29) of these three studies, in which PE particles (1-126 µm) were added to sediment, an MP-induced impact on mortality, growth and emergence of chironomids was found. The two other studies (T3/20, T4/28) did not report any adverse effect of PS or PET particles in fish or in gammarids after exposure to environmentally relevant concentrations of these polymers. In addition, it has to be considered that, most probably, negative results are not fully represented in the published literature.

In 11 out of the remaining 15 studies, which often used very high particle concentrations, MP negatively affected at least a single one – though not always the same – of the endpoints investigated (T2/10, T2/23, T3/10, T3/13, T3/16, T3/30, T4/1, T4/21, T4/24, T4/25, T4/27). For fish, histopathological effects in the intestine and the gills, inflammation in the liver, negative impact on the immune system and on blood parameters, alterations of metabolic profiles indicating disturbed lipid and energy metabolism, increased activity of biotransformation enzymes, decreased activity of acetylcholinesterase, significantly increased oxidative stress parameters, alterations in the composition of the gut microbiome, and changes in feeding/predatory behavior were reported. In invertebrates, mainly influences on mortality, growth, reproduction and stress responses were described. One paper has reported an impact of MP on bacterial richness in sediments (T4/1).

For 36 studies, we could not evaluate their environmental relevance due to either lacking information on particle concentrations or since solely mass concentrations were provided. Among these, 21 studies addressed effects of MP, ten studies those of NP (T2/7, T2/19, T3/3, T3/4, T3/22, T3/27, T3/28, T4/3, T4/5, T4/7) and four studies covered sizes in both the micro and the nano ranges (T4/2, T4/11, T4/12, T4/20). In a single study, no information on particle size was given (T3/7). In 16 of the MP studies, adverse effects were reported for at least one of the endpoints investigated in either fish, invertebrates or algae. All ten studies investigating NP found effects of NP particles, as did the four studies on both NP and MP.

In summary, although there is a considerable number of toxicity studies, a conclusive assessment of the risk posed by NP and MP for aquatic organisms is hardly possible up to now. This is due to the fact that, for larger particles, most MP concentrations tested were orders of magnitude higher than environmental concentrations, thus only allowing conclusions on potential hazard. In addition, for smaller MP and NP, environmental exposure data are still scarce due to still existing restrictions of analytical methods. Lacking information on the exact particle qualities and quantities in some of the studies poses a further drawback in this context. Despite these shortcomings and based on (limited) tissue translocation, toxicity and exposure data, the risk for freshwater organisms exposed to MP or NP seems to increase with decreasing particle size. However, to distinguish plastic effects from general particle effects possibly exerted by, e.g., diatom shells or zeolites, non-plastic micro- or nanoparticles of natural origin are recommended as additional 'control treatments' within the experimental designs of future studies.

#### *4.2 Modulation of bioavailability and toxicity of chemicals by NP and MP*

Recently, a review paper by WANG *et al.* (2018) on the interaction of toxic chemicals with MP summarized existing knowledge on environmental partitioning of compounds, focusing on the occurrence of chemicals in and absorbed to MP, their distribution patterns and the mechanisms of interference between chemicals and plastics, as modulated by extrinsic factors such as pH, salinity and temperature. However, this work largely focuses on the marine environment and summarizes effects on organisms only briefly. Nevertheless, it seems common sense to assume processes to be similar in freshwater and marine systems and that MP can sorb and concentrate a vast number of environmental toxicants and may thus transfer these into organisms (MATO *et al.* 2001, LEÓN *et al.* 2018). Upon desorption of such compounds, or release of plasticizers and additives from the plastic itself, these chemicals may exert toxic effects to exposed organisms (T2/4, COLE *et al.* 2011, NEVES *et al.* 2015). Despite existing reports on biological effects of chemicals that have desorbed from MP, it is still under debate whether exposure to dietary MP-sorbed compounds really plays a biologically relevant role, if compared to the high number of other routes of exposure (GOUIN *et al.* 2011, BECKINGHAM & GHOSH 2017). In a study on the sorption of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to plastic debris, thermodynamics revealed the role of plastics as a vector to transfer PAHs to living organisms to be minimal (LEE *et al.* 2017). Similar conclusions were drawn by REHSE *et al.* (T4/19) based on a study with bisphenol A in daphnids. Nonetheless, MP undoubtedly represent a novel matrix that provides an alternative surface not only for pollutants, but also for bacteria. MP, at least potentially, act as a vector for sorbed organic matter and, therefore, pose a challenge to our society to react before they cause irreversible harm (GALLOWAY *et al.* 2017). Such contradictory

views call for a closer look into toxicity-modulating properties of MP, at least based on what we know today.

About ten years ago, TEUTEN *et al.* (TEUTEN *et al.* 2007, TEUTEN *et al.* 2009) described the sorption and subsequent release of phenanthrene by three types of MP (PE > PP > PVC), and, in 2014, BAKIR *et al.* (2014) confirmed the conclusion that transfer of sorbed contaminants to organisms is possible under physiological conditions such as in the presence of gut surfactants and at varying pH and temperature. In a thermodynamic approach, GOUIN *et al.* (2011) used a food-web model and calculated that chemicals with  $\log K_{OW} > 5$  had the potential to partition at > 1% to PE, and that reductions in body burden concentrations for nonpolar organic chemicals were likely to occur for chemicals with a  $\log K_{OW}$  between 5.5 and 6.5. Thus, the relative importance of MP as a vector of persistent, bioaccumulative, and toxic substances (PBT) to biological organisms would be of limited importance, relative to other exposure pathways. However, these predictions are based on purely theoretical approaches. In contrast, experimental data from studies on biota are rather scarce, which caused WAGNER *et al.* (2014) in their review to deplore a serious lack of knowledge on biological effects exerted by contaminants associated with MP. Whereas the overall number of data on the impact of MP on vertebrates in field studies has increased in the last years (WRIGHT *et al.* 2013, TOSETTO *et al.* 2017), the number of controlled laboratory studies that address the transfer of contaminants to biota *via* MP particles have remained insufficient (EERKES-MEDRANO *et al.* 2015, KARAMI 2017). The absence of standardized laboratory bioassays is one of the major reasons for the ever-increasing controversy over the fate and biological impact of MP.

In addition to effects in fish by virgin MP (T2/23, T3/6, T3/10, T3/13, T3/15, T3/16, T3/18, LUSHER *et al.* 2013, ESPINOSA *et al.* 2017, SILVA-CAVALCANTI *et al.* 2017, TOSETTO *et al.* 2017) there is increasing concern about its potential carrier function for inorganic (KHAN *et al.* 2015, KHAN *et al.* 2017, LU *et al.* 2018) and organic chemicals (T3/9, T3/10, T3/12, T3/14, T3/25, T3/29, T3/33, ROCHMAN 2013, SLEIGHT *et al.* 2017). KHAN *et al.* (2015) investigated the uptake and localization of PE beads ranging from 10  $\mu\text{m}$  to 100  $\mu\text{m}$  and radiolabeled silver in zebrafish gills, intestine and body tissue over 24 h and did not observe an impact of these MP beads. In contrast, Ag-coated MP beads lead to a significantly reduced uptake rate. However, after 24 h, silver levels were similar in all treatment groups, leading to the conclusion that MP may alter bioavailability and uptake routes of contaminants. However, due to treatment-unrelated mortalities the sample size had to be reduced to facilitate a valid statistical analysis. Nevertheless, this observation supports the idea of equilibrium partitioning as suggested by KOELMANS *et al.* (2016).

In a recent study, LU *et al.* (2018) exposed adult zebrafish to virgin 5 µm PS particles and to a mixture of particles and cadmium (10 µg/L) over 3 weeks to study effects of chronic cadmium toxicity *via* histopathology as well as oxidative stress and functional gene analyses. According to LU *et al.* (2018), the presence of MP increased the accumulation and toxicity of Cd in zebrafish liver, gut and gills. However, the histological analysis may be questioned for technical reasons, and it is hard to conceive why inorganic materials such as cadmium should adsorb so strongly to MP. In another study, mercury was shown to sorb to MP, and MP altered the bioaccumulation of Hg in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (T3/19). Another study (T3/ 31) reported 1-5 µm MP to enhance the neurotoxicity (AChE inhibition) of chromium (VI) in common goby (*Pomatoschistus microps*), which made the authors claim 'toxicological interactions' between MP and Cr, even though they do not provide a mechanistic explanation for such an interaction. Particular care seems appropriate in the interpretation of some recent studies on the effects of MP, since part of the studies applied extraordinarily high concentrations without any relevance for the environment (see chapter 3.1) and/or used technically questionable data for their conclusions (BAUMANN *et al.* 2016).

In a preliminary descriptive study on the impact of virgin and polluted MP, PEDÀ *et al.* (T3/18) documented histopathological lesions in the distal part of the intestine of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) not only for virgin particles, but even more conspicuously for polluted MP. In a study with common goby (*Pomatoschistus microps*), OLIVEIRA *et al.* (T3/29) observed that MP particles modulated either the bioavailability or biotransformation of pyrene. Here, simultaneous exposure to MP and pyrene decreased the energy available through the aerobic pathway of energy production, and MP inhibited AChE activity. A similar study with MP and pyrene, however, failed to show modulations of acute pyrene toxicity to the predatory performance of barramundi (*Lates calcarifer*) and revealed, at best, a slight decrease in swimming speed when applied together (T3/20).

**Table 3.** Vertebrate studies on MP/NP effects without additional stressor. In those cases in which information on particle concentrations was provided, the environmental relevance of the effects was assessed in column 6. (acc.: according to; n.d.: Study could not be assessed due to tested particle sizes < 5 µm). References in bold: environmentally relevant concentration tested. Detailed citations are provided in supplementary material (T3/1-34).

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Reference	Short-comings
<i>Acipenser transmontanus</i>	PET	12-704 (Ø 198) µm	1.5% of body weight with food containing exposed clams where fed (food chain experiment)	Mortality, feeding behavior, condition factor, histopathology (intestine, liver), Immune-histochemistry (Vtg, CYP450)	n. d. (food chain experiment)		T3/1: ROCHMAN <i>et al.</i> (2017) <u>PLOS ONE</u> 12.	
	PE	14-704 (Ø 209) µm						
	PVC	80-704 (Ø 169) µm						
	PS	68-704 (Ø 169) µm						
<i>Barbodes gonionnotus</i>	PVC	40-310 µm (10% < 40 µm; 90% < 310 µm)	0.2; 0.5; 1.0 mg/L	Mortality, digestive enzyme activity, histopathology (whole body)	0.5 mg/L		T3/2: ROMANO <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 237: 1106-1111.	
<i>Carassius carassius</i>	PS	24 nm	0.01% (w/v) NP fed to algae <i>Scenedesmus</i> sp. which was fed to <i>Daphnia magna</i> , which were fed to <i>Carassius carassius</i>	Feeding time, fat metabolism, weight	n. d. (food chain experiment)		T3/3: CEDERVALL <i>et al.</i> (2012) <u>PLOS ONE</u> 7.	
	PS (sulfonated)	24 nm; 27 nm	130 mg particles per feeding, approximately 1 x 10 <sup>13</sup> particles (foodchain experiment)	Feeding behavior, metabolomes (liver, muscle), brain status	130 mg (1 x 10 <sup>13</sup> ) particles per feeding		T3/4: MATTSON <i>et al.</i> (2015) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 49: 553-561.	
	PS-NH <sub>2</sub> (positively charged)	53 nm; 180 nm	29 mg/L; 100 mg/L and <i>via</i> food chain experiment	Feeding behavior, brain effect	100 mg/L (for toxicity test); n. d. (food chain experiment)		T3/5: MATTSON <i>et al.</i> (2017) <u>Sci. Rep. UK</u> 7.	

Table 3. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Reference	Short-comings
<i>Clarias gariepinus</i>	LDPE	< 60 µm	1.4 x 10 <sup>3</sup> ; 1.4 x 10 <sup>4</sup> particles/L	Blood parameters, histopathology (liver, gill)	1400 particles/L	n. d.	T3/6: KARAMI <i>et al.</i> (2016) <u>Environ Res.</u> 151: 58-70.	
<i>Cyprinus carpio</i>	Presumably PE	?	1; 2 mg/L	Blood biochemical parameters	1 mg/L		T3/7: NEMATDOOST HAGHI AND BANAEI (2017) <u>Int. J. Environ. Sci. Technol.</u> 14: 521-530.	No information on polymer type – (isolated from exfoliation product)
<i>Danio rerio</i>	PS	70 nm; 5 µm	1.1 x 10 <sup>11</sup> ; 1.1 x 10 <sup>12</sup> ; 1.1 x 10 <sup>13</sup> ; 2.9 x 10 <sup>5</sup> ; 2.9 x 10 <sup>6</sup> ; 2.9 x 10 <sup>7</sup> particles/L	Oxidative stress, histopathology, metabolomics (liver)	2.9 x 10 <sup>5</sup> particles/L	n. d.; No [1]	T3/8: LU <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 50: 4054-4060.	No controls, inadequate technique
	?	1-5 µm	60 particles/nauplii (food chain experiment)	Histopathology (intestine), EROD (liver)	No effect		T3/9: BATEL <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Toxicol. Chem.</u> 35: 1656-1666.	No information on polymer type
	PE	10-20 µm	60 particles/nauplii (food chain experiment)	Histopathology (intestine), EROD (liver)	No effect			
	PS	50 nm; 45 µm	1.5 x 10 <sup>13</sup> ; 2 x 10 <sup>4</sup> particles/L	Larval locomotion, neurotoxicity, gene expression (neurotoxicity), oxidative stress, body length	2 x 10 <sup>4</sup> particles/L	n. d.; No [1-8]	T3/10: CHEN <i>et al.</i> (2017) <u>Sci. Tot. Environ.</u> 584-585: 1022-1031.	
	LDPE	< 17.6 µm	1.04 x 10 <sup>3</sup> ; 1.04 x 10 <sup>4</sup> ; 1.04 x 10 <sup>5</sup> particles/L	Length, weight, condition factor, transcriptomics, histopathology (gill, liver, brain, kidney, intestine)	No effect		T3/11: KARAMI <i>et al.</i> (2017) <u>Environ. Pollut.</u> 223: 466-475.	

Table 3. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Reference	Short-comings
<i>Danio rerio</i>	?	1-5 µm	5 x 10 <sup>6</sup> ; 2 x 10 <sup>7</sup> particles/L	Acute toxicity (FET), EROD (gill)	No effect		T3/12: BATEL <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 235: 918-930.	No information on polymer type
	PE	10-20 µm	1.2 x 10 <sup>6</sup> ; 3,2 x 10 <sup>7</sup> particles/L	Acute toxicity (FET), EROD (gill)	No effect			
	PS	0.5; 50 µm	1.456 x 10 <sup>9</sup> ; 1.456 x 10 <sup>10</sup> ; 1.456 x 10 <sup>3</sup> ; 1.456 x 10 <sup>4</sup> particles/L	Composition of gut microbiome, histopathology (intestine), functional gene analysis	1.456 x 10 <sup>3</sup> particles/L	n. d.; No [1-8]	T3/13: JIN <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 235: 322-329.	
	LDPE	125-250 µm	2%-4% of daily feed	Histopathological alterations, gene expression (liver, intestine, muscular tissue, brain)	No effect		T3/14: RAINIERI <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Res.</u> 162: 135-143.	
	PA; PE; PP; PVC	~70 µm	0.001; 0.01; 0.1; 1.0; 10.0 mg/L	Mortality, histopathology (gill, liver, kidney, intestine)	1 mg/L		T3/15: LEI <i>et al.</i> (2018) <u>Sci. Tot. Environ.</u> 619-620: 1-8.	
	PS	0.1; 1.0; 5.0 µm			No effect			
	PS	0.2; 1; 20; 40; 90 µm	2 x 10 <sup>5</sup> particles/L	Gene expression (immune status)	2 x 10 <sup>5</sup> particles/L	n. d.; No [1-10]	T3/16: LU <i>et al.</i> (2018) <u>Aquaculture</u> 484: 98-104.	Particle counts on gills not associated with gene upregulation

Table 3. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Reference	Short-comings
<i>Dicentrarchus labrax</i>	PE	10-45 µm	10 <sup>4</sup> ;10 <sup>5</sup> per g diet	Mortality, growth, gene expression	1 x 10 <sup>5</sup> particles per g diet		T3/17: MAZURAS <i>et al.</i> (2015) <u>Mar. Environ. Res.</u> 112: 78-85.	
	PVC	< 0.3 µm	0.1% (w/w) of food	Mortality, histopathology (intestine)	0.1% (w/w) of food		T3/18: PEDÀ <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Pollut.</u> 212: 251-256.	
	?	1-5 µm	0.25; 0.69 mg/L	Neurotoxicity (AChE), oxidative stress (LPO), activities of energy-related enzymes	0.69 mg/L		T3/19: BARBOZA <i>et al.</i> (2018) <u>Aquat. Toxicol.</u> 195: 49-57.	No information on polymer type
<i>Lates calcarifer</i>	PSD	97 µm	100 particles/L	Feeding rate, foraging activity	No effect		T3/20: GUVEN <i>et al.</i> (2018) <u>Aquat. Toxicol.</u> 198: 287-293.	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	PS	0.2; 1; 20; 40; 90 µm	2 x 10 <sup>5</sup> particles/L	Gene expression (immune status)	2 x 10 <sup>5</sup> particles/L	n. d.; No [1-10]	T3/16: LU <i>et al.</i> (2018) <u>Aquaculture</u> 484: 98-104.	Particle counts on gills not associated with gene upregulation
	PE	212-250 µm	40% PE by weight of food	Growth, lipid content	No effect		T3/21: RUMMEL <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. ScieProc. Imp.</u> 18: 788 -795.	

Table 3. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Reference	Short-comings
	PS-PEI	55 nm; 110 nm	up to 200 mg/L	Cytotoxicity ( <i>in vitro</i> ; gonadal cell line)	EC50 60.32 mg/LEC50 31.39 mg/L		T3/22: CASADO <i>et al.</i> (2013) <u>Environ. Int.</u> 51: 97-105.	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	PNIPAM (Poly N-isopropylacrylamide), NIPAM/BAM (N-isopropylacrylamide/N-tertbutylacrylamide) 85:15	98-102 nm 58-69 nm	25-1000 mg/L	Cytotoxicity ( <i>in vitro</i> ; gonadal cell line)	No effect		T3/23: NAHA <i>et al.</i> (2009) <u>Aquat. Toxicol.</u> 92: 146-154.	
<i>Oreochromis niloticus</i>	PS	0.1 µm	1.8 x 10 <sup>9</sup> ; 1.8 x 10 <sup>10</sup> ; 1.8 x 10 <sup>11</sup> particles/L	ACHe, EROD, BFCOD, SOD, MDA	1.8 x 10 <sup>9</sup> particles/L	n. d.	T3/24: DING <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 238: 1-9.	
<i>Oryzias latipes</i>	PE	< 0.5 µm	10% plastic by weight mixed into diet	Mortality, gene expression (CYP1A, Chg H, Vtg, Erα), histopathology (liver, gonad)	10% plastic by weight mixed into diet		T3/25: ROCHMAN <i>et al.</i> (2013) <u>Sci. Rep. UK</u> 3: 3263. T3/26: ROCHMAN <i>et al.</i> (2014) <u>Sci. Tot. Environ.</u> 493: 656-661.	
	Latex Latex (carboxylgroup surface coating)	50 nm, 500 nm	1 mg/L	Survival in container	No effect No effect		T3/27: MANABE <i>et al.</i> (2011) <u>Aquat. Toxicol.</u> 105: 576-581.	Insufficient discussion of results
	Latex Latex (carboxylgroup surface coating)			Survival in plastic cup	1 mg/L 1 mg/L			

Table 3. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Reference	Short-comings
<i>Pimephales promelas</i>	PS	41 nm forming aggregates of	25; 50; 100; 200 mg/L	<i>In vitro</i> neutrophil assays	25 mg/L		T3/28: GREVEN <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Toxicol. Chem.</u> 35: 3093-3100.	
	PC	1007 nm 158.7 nm forming aggregates of 1710 nm		<i>In vitro</i> neutrophil assays	25 mg/L			
<i>Pomatoschistus microps</i>	PE	1-5 µm	0.0184; 0.184 mg/L	Neurotoxicity (AChE), oxidative stress (GST, LPO), isocitrate dehydrogenase (IDH)	0.0184 mg/L		T3/29: OLIVEIRA <i>et al.</i> (2013) <u>Ecol. Indic.</u> 34: 641-647.	
		420-500 µm	50; 100 particles/L	Mortality, length, weight, predatory performance	50 particles/L	No [1;4-14]	T3/30: DE SÁ <i>et al.</i> (2015) <u>Environ. Pollut.</u> 196: 359-362.	
		1-5 µm	0.216 mg/L	Mortality, predatory performance, neurotoxicity (AChE), oxidative stress (GST, LPO), EROD	0.216 mg/L		T3/31: LUÍS <i>et al.</i> (2015) <u>Aquat. Toxicol.</u> 164: 163-174.	
		1-5 µm	0.184 mg/L	Predatory performance, neurotoxicity (AChE), oxidative stress (GST, LPO), EROD	0.184 mg/L		T3/32: FERREIRA <i>et al.</i> (2016) <u>Aquat. Toxicol.</u> 170: 89-103.	
		1-5 µm	0.184 mg/L	Mortality, predatory performance, neurotoxicity (AChE), oxidative stress (LPO)	No effect		T3/33: FONTE <i>et al.</i> (2016) <u>Aquat. Toxicol.</u> 180: 173-185.	

**Table 3.** Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Reference	Short-comings
<i>Symphysodon aequifasciatus</i>	PE	70-88 µm	0.2 mg/L	Mortality, growth, postexposure predation, neurotoxicity (AChE), digestive enzymes, energy metabolism (ETS, LDH, CS, COX)	0.2 mg/L		T3/34: WEN <i>et al.</i> (2018) <u>Aquat. Toxicol.</u> 195: 67-76.	

[1] Chapter 2 Elbe survey; [2] MANI *et al.* 2015; [3] DI & WANG 2018; [4] ZIAJAHROMI *et al.* 2017; [5] CARR *et al.* 2016; [6] MINTENIG *et al.* 2017; [7] WANG *et al.* 2017; [8] KARLSSON *et al.* 2017; [9] MURPHY *et al.* 2016; [10] SADRI & THOMPSON 2014; [11] FREE *et al.* 2014; [12] EUROPEAN COMMISSION 2013; [13] TALVITIE *et al.* 2017; [14] HEB *et al.* 2018

**Table 4:** Prokaryote, plant and invertebrate studies on MP/NP effects without additional stressor. In those cases in which information on particle concentrations was provided, the environmental relevance of the effects was assessed in column 6. (acc.: according to; n.d.: Study could not be assessed due to tested particle sizes < 5 µm). References in bold: environmentally relevant concentration tested. Detailed citations are provided in supplementary material (T4/1-33).

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	End-points	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Author	Short-comings
Sediment bacterial community	PE	212-250 µm	257; 2570 particles/g sediment	Number of bacterial species	257 particles/g sediment	No [1]	T4/1: KLEINTEICH <i>et al.</i> (2018) <u>Int. J. Env. Res. Pub. He.</u> 15: 287.	
<i>Vibrio fischeri</i>	PNIPAM	98 nm	3.5-900 mg/L	Inhibition of bioluminescence	No effect		T4/2: NAHA <i>et al.</i> (2009) <u>Aquat. Toxicol.</u> 92: 146-154	
	NIPAM/BAM 85:15	69 nm			900 mg/L			
	NIPAM/BAM 65:35	42 nm			14.06 mg/L			
	NIPAM/BAM 50:50	2131 nm			28.3 mg/L			
	PMMA (medium or hydrophobic surface chemistry)	~86 nm (hydrophobic surface chemistry) ~125 nm (medium surface chemistry)	0.01; 0.1; 1.0; 1000 mg/L		No effect		T4/3: BOOTH <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Toxicol. Chem.</u> 35: 1641-1649.	

Table 4. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Author	Short-comings
<i>Vibrio fischeri</i>	PS-PEI	55;110 nm	dilution series from 1000 to 3 mg/L		EC50 > 1000 mg/L		T4/4: CASADO <i>et al.</i> (2013) <u>Environ. Int.</u> 51: 97-105.	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	PS	70 nm	44; 99; 22 x 10 <sup>2</sup> ; 4.9 x 10 <sup>2</sup> ; 1.1 x 10 <sup>3</sup> mg/L.	Growth, changes in chlorophyll-a concentration	1100 mg/L		T4/5: BESSELING <i>et al.</i> (2014) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 48: 12336-12343.	
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	PNIPAM	105 nm	10-1000 mg/L	Algal growth inhibition	10 mg/L		T4/2: NAHA <i>et al.</i> (2009) <u>Aquat. Toxicol.</u> 92: 146 -154.	
	NIPAM/BAM 85:15	60 nm			10 mg/L			
	NIPAM/BAM 65:35	61 nm			10 mg/L			
	NIPAM/BAM 50:50	5765 nm			50 mg/L			
	PS-PEI	55 nm	5 different concentrations from 0.1 to 1 mg/L	Average specific growth rate	EC50 0.58 mg/LEC50 0.54 mg/L		T4/4: CASADO <i>et al.</i> (2013) <u>Environ. Int.</u> 51: 97-105.	
		110 nm	5 different concentrations from 0.1 to 0.8 mg/L					
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	PS	0.05 µm	3.64 x 10 <sup>11</sup> ; 3.64 x 10 <sup>12</sup>	Growth, photosynthesis	3.64 x 10 <sup>11</sup> particles/L	n. d.	T4/6: SJOLLEMA <i>et al.</i> (2016) <u>Aquat. Toxicol.</u> 170: 259-261.	No statistics
		0.5 µm	3.64 x 10 <sup>8</sup> ; 3.64 x 10 <sup>9</sup>					
		6 µm	2.1 x 10 <sup>5</sup> ; 2.1 x 10 <sup>6</sup> particles/L					

Table 4. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Author	Short-comings
<i>Chlorella sp.</i> <i>Scenedesmus sp.</i>	PS (charged positively and negatively)	20 nm	1.8, 2.6, 4, 6.5 mg/L	Photosynthesis, ROS production	1.8 mg/L		T4/7: BHATTACHARYA <i>et al.</i> (2010) <u>J. Phys. Chem. C</u> 114: 16556-16561.	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	PP	400-1000 µm	1000 mg/L; every 15 d medium diluted with 50 mL fresh medium	Growth, gene expression (photosynthesis, oxidative stress, caspase), biosynthetic pathway of sugars	400 mg/L		T4/8: LAGARDE <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Pollut.</u> 215: 331-339.	
<i>Lemna minor</i>	HDPE	30-600 µm 40-400 µm	10; 50; 100 mg/L	Growth, chlorophyll <i>a</i> and <i>b</i> content in leaves, root status	10 mg/L		T4/9: KALČÍKOVÁ <i>et al.</i> (2017) <u>Environ. Pollut.</u> 230: 1108-1115.	
<i>Hydra attenuata</i>	PE (extracted of exfoliating product)	< 400 µm	1 x 10 <sup>4</sup> ; 2 x 10 <sup>4</sup> ; 4 x 10 <sup>4</sup> ; 8 x 10 <sup>4</sup>	Feeding rate, morphology score, reproduction	20000 mg/L		T4/10: MURPHY AND QUINN (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 234: 487-494.	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	PA; PE; PP  PVC PS	~ 70 µm  ~ 70 µm 0.1; 1.0; 5.0 µm	0.5; 1.0; 5.0; 10.0 mg/m <sup>2</sup> (surface of agar plate)	Mortality, growth, reproduction, changes in intestinal calcium levels, oxidative stress	0.5 mg/m <sup>2</sup> 1 mg/m <sup>2</sup> 0.5 mg/m <sup>2</sup>		T4/11: LEI <i>et al.</i> (2018) <u>Sci. Tot. Environ.</u> 619-620: 1-8.	
<i>Brachionus koreanus</i>	PS	0.05; 0.5; 6 µm	0.1; 1; 10; 20 mg/L	Growth, fecundity, lifespan, oxidative stress (GSH, GPx, GR, GST, SOD, ROS)	0.1 mg/L		T4/12: JEONG <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 50: 8849-8857.	

Table 4. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Author	Short-comings
<i>Tubifex</i> sp.	PS	20-500 µm	0.1; 1; 5; 10; 20; 30; 40% plastic weight in total sediment mixture	Mortality, growth	No effect		T4/13: REDONDO-HASELERHARM <i>et al.</i> (2018) <i>Environ. Sci. Technol.</i> 52: 2278-2286.	
<i>Lumbriculus variegatus</i>				Growth, reproduction	No effect		T4/13: REDONDO-HASELERHARM <i>et al.</i> (2018) <i>Environ. Sci. Technol.</i> 52: 2278-2286.	
<i>Daphnia magna</i>	PS-PEI	55; 110 nm	0.33; 1.0; 1.5; 2.0; 3.3 mg/L	Immobilization	EC <sub>50</sub> 0.77 mg/L EC <sub>50</sub> 0.66 mg/L		T4/4: CASADO <i>et al.</i> (2013) <i>Environ. Int.</i> 51: 97-105.	
	HDPE	1-4 µm	3.9 x 10 <sup>8</sup> -2.5 x 10 <sup>10</sup> ; 7.8 x 10 <sup>8</sup> -5.0 x 10 <sup>10</sup> ; 1.6 x 10 <sup>9</sup> -1.0 x 10 <sup>11</sup> ; 3.1 x 10 <sup>9</sup> -2.0 x 10 <sup>11</sup> ; 6.2 x 10 <sup>9</sup> -4.0 x 10 <sup>11</sup> ; 1.2 x 10 <sup>10</sup> -8.0 x 10 <sup>11</sup> particles/L	Immobilization	3.9 x 10 <sup>8</sup> particles/L		T4/14: REHSE <i>et al.</i> (2016) <i>Chemosphere</i> 153: 91-99.	
	HDPE	90-106 µm	2.1 x 10 <sup>4</sup> -3.4 x 10 <sup>4</sup> ; 4.3 x 10 <sup>4</sup> -6.8 x 10 <sup>4</sup> ; 8.5 x 10 <sup>4</sup> -1.3 x 10 <sup>5</sup> ; 1.7 x 10 <sup>5</sup> -2.7 x 10 <sup>5</sup> ; 3.4 x 10 <sup>5</sup> -5.4 x 10 <sup>5</sup> ; 6.8 x 10 <sup>5</sup> -1.1 x 10 <sup>6</sup> particles/L	Immobilization	No effect		T4/14: REHSE <i>et al.</i> (2016) <i>Chemosphere</i> 153: 91-99.	
	?	4.1 µm	10 <sup>5</sup> ;10 <sup>6</sup> ;10 <sup>7</sup> ;10 <sup>8</sup> ; 3 x 10 <sup>7</sup> particles/L	Immobilization, growth, reproductive output	3 x 10 <sup>7</sup> particles/L	n. d.	T4/15: OGOŃOWSKI <i>et al.</i> (2016) <i>PLOS ONE</i> 11: e0155063.	
	PE	2.6 µm				3 x 10 <sup>7</sup> particles/L	n. d.	

Table 4. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Author	Short-comings
<i>Daphnia magna</i>	PET	(60-1400 µm) x (30 -530 µm) x (2-21.5 µm)	6.64 x 10 <sup>4</sup> ; 1.328 x 10 <sup>5</sup> ; 2.656 x 10 <sup>5</sup> ; 5.313 x 10 <sup>5</sup> particles/L		6.6 x 10 <sup>4</sup> fibers/L	No [2-4]	T4/16: CANNIFF <i>et al.</i> (2018) <u>Sci. Tot. Environ.</u> 633: 500-507.	
	PE	63-75 µm	1.905 x 10 <sup>6</sup> ; 3.811 x 10 <sup>6</sup> ; 7.621 x 10 <sup>6</sup> particles/L	Immobilization, reproduction	No effect		T4/17: JEMEC <i>et al.</i> (2016) <u>Pollut.</u> 219 201e209.	
	PS	0.1; 2 µm	3.1 x 10 <sup>10</sup> ; 1.6 x 10 <sup>11</sup> ; 3.1 x 10 <sup>11</sup> ; 1.4 x 10 <sup>7</sup> ; 7 x 10 <sup>7</sup> ; 1.4 x 10 <sup>8</sup> particles/L	Immobilization, growth, feeding rate, reproduction	3.1 x 10 <sup>11</sup> particles/L	n. d.	T4/18: RIST <i>et al.</i> (2017) <u>Environ. Pollut.</u> 228: 398-407.	
	PA	5-50 µm (Ø 15-20 µm)	200 mg/L	Immobilization	No effect		T4/19: REHSE <i>et al.</i> (2018) <u>Int. J. Env. Res. Pub. He.</u> 15: 280.	
	PS	~70 nm	0.22, 0.44, 0.88, 1.8, 3.5, 7.0, 14, 32, 70, 150 mg/L	Immobilization, growth, reproduction, malformation	150 mg/L		T4/5: BESSELING <i>et al.</i> (2014) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 48: 12336-12343.	
	PMMA (medium or hydrophobic surface chemistry)	~86 nm (hydrophobic surface chemistry) ~125 nm (medium surface chemistry)	0.01; 0.1; 1.0; 1000 mg/L	Immobilization	EC <sub>50</sub> 879 mg/L		T4/3: BOOTH <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Toxicol. Chem.</u> 35: 1641-1649.	

Table 4. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Author	Short-comings
<i>Daphnia magna</i>	PS	50; 500 nm; 5; 10; 15 µm	2.5; 5; 8.5; 10; 11; 14.5; 50 mg/L	Immobilization, physical damage	10 mg/L	No effect	T4/20: MA <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Pollut.</u> 219: 166-173.	
	Mixture: PA; PC; PET; PVC  Mixture: ABS; PVC; POM; SAN	40 µm	2.9 x 10 <sup>5</sup> particles/L	Transcriptomics, metal detoxification, endocytosis, toxin uptake, oogenesis, juvenile development	2.9 x 10 <sup>5</sup> particles/L	No [3-10]	T4/21: IMHOF <i>et al.</i> (2017) <u>PLOS ONE</u> 12: e0187590.	
	?	1-5 µm	3.672 x 10 <sup>3</sup> ; 3.672 x 10 <sup>4</sup> particles/L	Immobilization, growth, reproduction	3.672 x 10 <sup>3</sup> particles/L	n. d.	T4/22: PACHECO <i>et al.</i> (2018) <u>Sci. Tot. Environ.</u> 628- 629: 474-483	No informati on on polymer type
	PNIPAM NIPAM/BAM 85:15	102 nm 58 nm	250-1250 mg/L	Immobilization	250 mg/L 250 mg/L		T4/2: NAHA <i>et al.</i> (2009) <u>Aquat. Toxicol.</u> 92: 146-154.	
	NIPAM/BAM 65:35 NIPAM/BAM 50:50	200 nm 2789 nm			100 mg/L 50 mg/L			

Table 4. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference)	Author	Short-comings
<i>Daphnia galeata</i>	PS	52 nm	5 mg/L	Immobilization, pregnancy rate, embryo toxicity, lipid storage	5 mg/L		T4/23: CUI <i>et al.</i> (2017) <u>Sci. Rep. UK</u> 7.	
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	PNIPAM	98-102 nm	500-1500 mg/L	Mortality	500 mg/L		T4/2: NAHA <i>et al.</i> (2009) <u>Aquat. Toxicol.</u> 92: 146-154.	
	NIPAM/BAM 85:15	58-69 nm			500 mg/L			
	NIPAM/BAM 65:35	42-200 nm			200 mg/L			
	NIPAM/BAM 50:50	2131-5765 nm			200 mg/L			
	PS-PEI	55 nm	5 different concentrations from 3 to 20 mg/L	Mortality	EC <sub>50</sub> 5.20 mg/L;			T4/4: CASADO <i>et al.</i> (2013) <u>Environ. Int.</u> 51: 97-105.
		110 nm	5 different concentrations from 2 to 15 mg/L		EC <sub>50</sub> 4.03 mg/L			
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	PE	1-4 µm	1.7 x 10 <sup>4</sup> -5.4 x 10 <sup>5</sup> ; 2.1 x 10 <sup>3</sup> -6.7 x 10 <sup>4</sup> particles/L	Mortality, behavior, growth, reproduction, morphology	EC <sub>50</sub> 3.2 x 10 <sup>4</sup> particles/L	n. d.	T4/24: ZIAJAHROMI <i>et al.</i> (2017) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 51: 13397-13406.	
	PET	25.7-1150 µm (Ø 280 ± 50 µm)	1.1 x 10 <sup>3</sup> -3.4 x 10 <sup>4</sup> ; 2.7 x 10 <sup>2</sup> -8.6 x 10 <sup>3</sup> particles/L		EC <sub>50</sub> 3.5 x 10 <sup>3</sup> fibers/L	No [2-4;10-13]		

Table 4. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Author	Short-comings
<i>Hyalella azteca</i>	PE	10-27 µm	5 x 10 <sup>6</sup> ; 1 x 10 <sup>7</sup> ; 2 x 10 <sup>7</sup> particles/L	Mortality, growth, reproduction	5 x 10 <sup>6</sup> particles/L	No [3-8;10]	T4/25: AU <i>et al.</i> (2015) <u>Environ. Toxicol. Chem.</u> 34: 2564-2572.	
	PP	20-75 µm x 20 µm	2.25 x 10 <sup>4</sup> ; 4.5 x 10 <sup>4</sup> ; 9 x 10 <sup>4</sup> particles/L		4.5 x 10 <sup>4</sup> fibers/L			
	PS	20-500 µm	0.1; 1; 5; 10; 20; 30; 40% plastic weight in total sediment mixture	Mortality, growth, feeding activity	No effect	No [2-4;10;13]		T4/13: REDONDO-HASSELERHARM <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 52: 2278-2286.
<i>Gammarus fossarum</i>	PS	1.6 µm	1.25 x 10 <sup>7</sup> particles/L	Feeding rate, assimilation efficiency, wet weight change	No effect		T4/26: BLARER AND BURKHARDT-HOLM (2016) <u>Environ. Sci. Pollut. Res.</u> 23: 23522-23532.	
	PA	500 x 20 µm	2680 fibers/cm <sup>2</sup>		2680 fibers/cm <sup>2</sup>			
	PHB; PMMA	32-63 µm	3.3 x 10 <sup>5</sup> particles/L	Feeding rate, assimilation efficiency, weight	3.3 x 10 <sup>5</sup> particles/L	No [3-10;13]		T4/27: STRAUB <i>et al.</i> (2017) <u>Int. J. Env. Res. Pub. He.</u> 14: 774.
<i>Gammarus pulex</i>	PET	10-150 µm	8 x 10 <sup>2</sup> ; 7 x 10 <sup>3</sup> ; 4 x 10 <sup>4</sup> ; 4 x 10 <sup>5</sup> ; 4 x 10 <sup>6</sup> particles/L	Feeding activity, energy reserves, molting, mortality	No effect		T4/28: WEBER <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 234: 181-189.	
	PS	20-500 µm	0.1; 1; 5; 10; 20; 30; 40% plastic weight in total sediment mixture	Mortality, growth, feeding activity	10% (w) in total sediment			T4/13: REDONDO-HASSELERHARM <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 52: 2278-2286.

Table 4. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Author	Short-comings
<i>Corophium volutator</i>	PMMA (medium or hydrophobic surface chemistry)	~86 nm (hydrophobic surface chemistry) ~125 nm (medium surface chemistry)	0.01; 0.1; 1.0; 500 mg/L	Mortality, sediment reburial	No effect		T4/3: BOOTH <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Toxicol. Chem.</u> 35: 1641-1649.	
<i>Asellus aquaticus</i>	PS	20-500 µm	0.1; 1; 5; 10; 20; 30; 40% plastic weight in total sediment mixture	Mortality, growth	No effect		T4/13: REDONDO-HASSELERHARM <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 52: 2278-2286.	
<i>Chironomus tepperi</i>	PE	1-4 µm; 10-27 µm; 43-54 µm; 100-126 µm	500 particles/kg sediment	Mortality, growth, emergence	500 particles/kg sediment	Yes [1]	T4/29: ZIAJAHROMI <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Pollut.</u> 236: 425-431.	
<i>Sphaerium corneum</i>	PS	20-500 µm	0.1; 1; 5; 10; 20; 30; 40% plastic weight in total sediment mixture	Mortality, growth	No effect		T4/13: REDONDO-HASSELERHARM <i>et al.</i> (2018) <u>Environ. Sci. Technol.</u> 52: 2278-2286.	
<i>Dreissena polymorpha</i>	PS	Mixture: 1 µm; 10 µm	MIX 1: 5 x 10 <sup>5</sup> particles/L of 1 µm size + 5 x 10 <sup>5</sup> particles/L of 10 µm size; MIX 2: 2 x 10 <sup>6</sup> particles/L of 1 µm size + 2 x 10 <sup>6</sup> particles/L of 10 µm size	Oxidative stress, neurotoxicity, genotoxicity (micronuclei)	5 x 10 <sup>5</sup> particles/L (1 µm) + 5 x 10 <sup>5</sup> particles/L (10 µm)	n. d.	T4/30: MAGNI <i>et al.</i> (2018) <u>Sci. Total Environ.</u> 631-632: 778-788.	

Table 4. Continued.

Species	Polymer	Particle size	Test concentration	Endpoints	Effect threshold (LOEC, EC)	Are effects environmentally relevant? [acc. to reference]	Author	Shortcomings
<i>Corbicula fluminea</i>	?	1-5 µm	3.672 x 10 <sup>4</sup> ; 1.2852 x 10 <sup>5</sup> particles/L	Food uptake, neurotoxicity, IDH, GST, oxidative stress	3.672 x 10 <sup>4</sup> particles/L	n. d.	T4/31: GUILHERMINO <i>et al.</i> (2018) <u>Sci. Tot. Environ.</u> 622-623: 1131-1142.	No information on polymer type
	PET	12-704 (Ø 198) µm	4.1 mg/L (0.0003% by volume of water)	Mortality, feeding behavior,	No effect		T4/32: ROCHMAN <i>et al.</i> (2017) PLOS ONE 12: e0187664.	
	PE	14-704 (Ø 209) µm	2.8 mg/L (0.0003% by volume of water)	histopathology (whole body),				
	PVC	80-704 (Ø 169) µm	4.2 mg/L (0.0003% by volume of water)	immunohistochemistry (Vtg, CYP450)				
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Mixture: PA; PC; PS; PVC; PET	4.64-602 µm; (41% < 50 µm)	particles added in addition to food in concentrations of 30%, 70%	Mortality, morphology, fecundity, juvenile development	Particles added to food: 70%		T4/33: IMHOF <i>et al.</i> (2016) <u>Environ. Pollut.</u> 218: 383-391.	Authors relativise their own results

[1] XIONG *et al.* 2018; [2] MURPHY *et al.* 2016; [3] MANI *et al.* 2015; [4] CARR *et al.* 2016; [5] Chapter 2 Elbe survey; [6] DI & WANG 2018; [7] ZIAJAHROMI *et al.* 2017; [8] MINTENIG *et al.* 2017 ; [9] WANG *et al.* 2017; [10] KARLSSON *et al.* 2017; [11] FREE *et al.* 2014; [12] TALVITIE *et al.* 2017; [13] SADRI & THOMPSON 2014

Effects of endocrine disrupting chemicals on fish can be diverse after sorption to MP, including changes in sexual maturation, in gonadal development or in behavioral patterns. CHEN *et al.* (T3/10) described effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE<sub>2</sub>) associated to 45  $\mu$ m PS spheres on zebrafish larval locomotion and gene expression patterns as well as oxidative stress. However, the authors could not distinguish between the portion of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol taken up directly from the water and the portion that had been taken up *via* adsorption to MP. Most likely, in this study, alleviation of effects by EE<sub>2</sub> was simply due to the availability of freely dissolved 17 $\alpha$ -ethinylestradiol.

Likewise, reduced availability of EE<sub>2</sub> and phenanthrene due to binding to PVC particles (200-250  $\mu$ m) was investigated by SLEIGHT *et al.* (2017). The authors observed that gene expression patterns of cytochrome P4501A and vitellogenin were significantly reduced upon the presence of MP. However, it should be noted that the exposure scenario actually excluded the transfer of contaminants into zebrafish *via* MP, since 200-250  $\mu$ m particles are definitely too large to be taken up by larval zebrafish. However, the authors observed that phenanthrene was 48% more bioavailable than predicted by a linear sorption model, thus indicating potential interference of MP with the transfer of the compound into biota.

RAINIERI and colleagues (T3/14) investigated the effect of low-density PE-MP of 125-250  $\mu$ m after sorption of a mixture of perfluorinated flame retardants, polychlorinated biphenyls and methylmercury in adult zebrafish over 3 weeks. Particularly in the liver, the diet supplemented with 2% MP and the contaminant mixture produced strong effects, whereas MP alone did not produce any relevant effects. However, again, important information on the amounts of MP applied, density of the polymer type and concentration of single substances of the contaminant mixture are missing, which makes it difficult to agree with the authors' conclusions that contaminants have been transferred from the plastic particles to zebrafish tissues. In another study, however, NEMATDOOST HAGHI AND BANAEI (T3/7) argued in similar directions. According to the authors, their results indicate that increasing concentrations of MP increased toxic effects of paraquat on biochemical blood parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). Likewise, GUILHERMINO and colleagues (T4/31) found MP to increase florfenicol-elicited oxidative stress and anti-oxidant defenses in the freshwater clam *Corbicula fluminea*.

Similar results were reported for the marine microalga *Tetraselmis chuii* which had been exposed to MP of small size (1-5  $\mu$ m in diameter), pharmaceuticals (procainamide or doxycycline), or mixtures of MP with one of the pharmaceuticals (PRATA *et al.* 2018). Whereas MP alone had no significant effect on the growth rate of the algae, the toxicity of both pharmaceuticals was enhanced in combination with MP. However, concentrations of both MP particles and

pharmaceuticals were probably orders of magnitude higher than what may be expected for field situations. In another study, PE beads increased triclosan toxicity in *Acartia tonsa*, a marine copepod (SYBERG *et al.* 2017), which speaks in favor of the role of MP to potentially act as a vector for toxicants.

In a mechanistic study on the potential transfer of benzo[a]pyrene *via* PE along a laboratory model aquatic food chain comprising *Artemia* and zebrafish, BATEL *et al.* (T3/9) were able to track the uptake of benzo[a]pyrene into *Artemia* and the subsequent transmission into zebrafish. In contrast, virgin particles that were not loaded with polar organic pollutants (POPs) did not cause any observable physical harm in the intestinal tracts, although parts of the particles were retained within the mucus of intestinal villi and might even have been taken up by epithelial cells (at low rates, however). The transfer of associated benzo[a]pyrene could be documented by both an ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) assay for CYP1A induction in zebrafish gastrointestinal tract and *via* fluorescence analyses (autofluorescence of benzo[a]pyrene). Thus, BATEL *et al.* (T3/9) were the first to document in an experimental approach that contaminants adsorbed to MP may desorb upon contact with the intestinal milieu and can be taken up across the intestinal epithelium. Yet, although MP could thus be shown to function as vectors, benzo[a]pyrene accumulation was not high enough to induce adverse effects in zebrafish.

In a follow-up study on MP accumulation patterns and transfer of benzo[a]pyrene to adult zebrafish as well as to zebrafish embryos, BATEL *et al.* (T3/12) demonstrated that these do not permanently accumulate at high amounts on adult zebrafish gills: Most particles only superficially adhered to the mucus layer on the filaments, which is constantly renewed. In contrast, especially small MP (10 µm) accumulated at significant rates on the surface of zebrafish egg chorions. Most importantly, in either exposure scenario, a transfer of benzo[a]pyrene from adhering MP to biota could clearly be visualized by means of fluorescence tracking and EROD induction. Yet, again, benzo[a]pyrene from spiked MP did not reach concentrations sufficient to induce morphological effects in both adult and embryonic fish.

The key to understand the potential of MP to act as vectors of toxicants likely lies in experiments that consider different particle sizes of MP. In a comprehensive study on both MP and NP, which were tested for their joint toxicity with phenanthrene to *Daphnia magna*, MA *et al.* (T4/20) showed 50 nm NP to significantly enhance bioaccumulation of phenanthrene-derived residues in the daphnids and to inhibit dissipation and transformation of phenanthrene in the medium, while MP of 10 µm size did not exert any effects. Likewise, NP have been reported to enhance uptake and neurotoxicity of bisphenol A in adult zebrafish (T2/22). In contrast, larger PA particles failed to increase and even lowered the toxicity of bisphenol A in *Daphnia magna* (T4/19). Thus, it

seems reasonable to assume that NP are generally more relevant as vectors for toxicants, not only because of their relatively higher surface ratios (VELZEBOER *et al.* 2014), but – more importantly – because their low size allows them to be subject to cellular phagocytosis (see chapter 3). In addition, the role of surface-sorbed proteins or mucopolysaccharides, which are released by the intestinal epithelium and bound to nanoplastic particles (eco-corona) needs to be considered. Such an eco-corona has been shown to be responsible for an increased uptake of NP and a less efficient removal of these particles in the gut of *Daphnia magna*, which affects the rate of subsequent feeding (NASSER & LYNCH 2016). Indeed, the accumulation of particles in the intestinal lumen and insufficient clearing seem to affect feeding and absorption of substances mechanically. MP were shown to reduce predatory performance in the common goby (T3/34), and PA fibers reduced the assimilation efficiency in *Gammarus fossarum* (T4/26). In consequence, the toxicity of toxicants, even pesticides, can be reduced in the presence of high particle concentrations, although sorption processes were shown to be excluded (LORENZ *et al.* 2017).

For the potential transfer of contaminants *via* MP particles, several conclusions can be drawn: (1) Sorption of substances to the surfaces of MP and NP seems to be a prerequisite for the particles' role as vectors, but the crucial parameter for toxicity is the desorption in the vicinity of cells and tissues, particularly in complex media secreted by, e.g., intestinal epithelia. Without desorption of contaminants from MP, even bacterial communities remain unaffected in the presence of high concentrations of PAHs loaded to MP (T4/1). (2) Probably simply due to their smaller size, NP seem to be more relevant in modulating the toxicity of chemicals than MP. Several mechanistic explanations appear likely for this, such as a possible interaction with secreted biomolecules/mucus, mechanical constraints to chemical diffusion or a more efficient cellular uptake and tissue translocation (chapter 2). However, none of these has been proven so far. (3) There is increasing evidence for the potential of a trophic transfer of MP-associated contaminants (JOVANOVIĆ 2017), but this also holds true for chemicals adsorbed to natural micro-sized particles. In fact, under field conditions, plastic particles compete with both natural particles (e.g., suspended matters) and a vast variety of dissolved organic matters for binding of contaminants. As of today, however, controls with both suspended and dissolved natural materials have never been considered in laboratory experiments. Whether and to what extent the observations made under controlled laboratory conditions so far are relevant for the situation in the field therefore still remains to be clarified. Given the low abundance of plastic particles relative to natural particles present in freshwater and marine systems, exposure to contaminants *via* plastics is most probably of far less importance than exposure *via* 'natural' particles taken up by filter or sediment feeding or predation (COLE *et al.* 2011, VELZEBOER *et al.* 2014, KOELMANS

*et al.* 2016). Finally, effects of polymer composition and morphology, particle fouling and degradation as well as more realistic exposure scenarios and particle concentrations need to be considered in future laboratory studies (WAGNER *et al.* 2014, KARAMI 2017).

## 5 Conclusions

The present review provides a multifaceted, but fragmentary image of MP- and NP-induced effects in freshwater fish and invertebrates. It documents the use of numerous different particle qualities and quantities under numerous different exposure conditions (MP applied as particles/L; mg/L; mg/kg; % of diet etc.) in a wide range of species. Studies using high particle concentrations –even though these presumably occur in the environment only for small MP or NP – are overrepresented in number. In addition, shortcomings exist in sampling and detection of NP/MP (KOELMANS *et al.* 2015), which is especially true for small MP or NP, both preventing a solid risk evaluation to date. This is even more important, when considering that, in addition to plastic particles, water bodies contain large quantities of natural particles in comparable size ranges competing with plastics as possible stressors for aquatic organisms. In this context, the concentration data collected for the river Elbe by the MiWa consortium are important, because these demonstrate that less than 10 out of  $10^6$  particles in a surface water sample consist of plastics.

On the basis of existing data for MP concentrations in freshwater ecosystems and the results obtained by MiWa, part of the reviewed effect-related publications was evaluated with respect to their environmental relevance. It becomes obvious that only in very few cases environmentally realistic MP concentrations were tested, out of which two observed adverse effects.

Capacities of MP/NP for modulation of adverse effects exerted by other chemicals were reported by a series of papers, and most of them showed the toxicity of chemicals to be reduced by MP. It has to be considered, however, that, also here, relatively high particle concentrations have been tested.

Furthermore, it should be noted that MP uptake by organisms needs a differentiated view considering particle sizes and surface charges. It is necessary to distinguish between particle passage through the intestinal tract and a translocation into cells and tissues. Whereas only very small NP particles are able to passively pass membranes, processes like phagocytosis or persorption also allow uptake of larger particles into cells and tissues. Importantly, quality assurance needs to be improved to avoid false-positive results for tissue translocation.

Based on available environmental concentration and existing toxicity data the risk posed by larger MP to cause harm to biota may be rather low. Much higher putative risk has to be allocated

to small MP with a diameter of just few micrometers and NP, because (1) their environmental concentrations are expected to be much higher than currently known and (2) smaller particles run a higher risk of uptake into cells and tissues. In addition, NP have a much higher surface area ready to sorb and desorb a range of chemicals, and thus, as they can more easily enter cells, adverse effects in organisms by NP are more likely. For these small particles, however, scientific knowledge is fragmentary at best. In this context, comparing the toxicity of plastic and naturally occurring particles is recommended as a key to better understand the hazard posed by MP and NP to freshwater organisms.

### **Author contributions**

RT initiated this paper and wrote the abstract, introduction and conclusions. MP and YM wrote chapter 2 and NZ, SH, TPK, ASR and MJ contributed to it. ChS and MW wrote chapter 3 and TG and CS provided Fig. 1. RT, SK and HS wrote chapter 4.1. TB, H-RK and LH wrote chapter 4.2. RT wrote chapter. ASR, H-RK, MW, RT, TB and TK revised the whole manuscript.

### **Acknowledgements**

We thank all MiWa partners for valuable discussions. The investigations within the MiWa project (funding number 02WRS1378) are financed by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) as part of the funding measure RiSKWa."

### **Appendix A. Supplementary data**

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org//10.1016/j.trac.2018.11.023>.

### **References**

- ANBUMANI S. AND KAKKAR P. (2018). "Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review." Environmental Science and Pollution Research **25**(15): 14373-14396.
- AUFFAN M., BERTIN D., CHAURAND P., PAILLES C., DOMINICI C., ROSE J., BOTTERO J.-Y. AND THIERY A. (2013). "Role of molting on the biodistribution of CeO<sub>2</sub> nanoparticles within *Daphnia pulex*." Water Research **47**(12): 3921-3930.
- BAKIR A., ROWLAND S. J. AND THOMPSON R. C. (2014). "Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions." Environmental Pollution **185**: 16-23.
- BAUMANN L., SCHMIDT-POSTHAUS H., SEGNER H. AND WOLF J. C. (2016). "Comment on "Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver"." Environmental Science & Technology **50**(22): 12521-12522.
- BECKINGHAM B. AND GHOSH U. (2017). "Differential bioavailability of polychlorinated biphenyls associated with environmental particles: Microplastic in comparison to wood, coal and biochar." Environmental Pollution **220**: 150-158.
- CANNON G. J. AND SWANSON J. A. (1992). "The macrophage capacity for phagocytosis." Journal of Cell Science **101**(4): 907-913.

- CARR K. E., SMYTH S. H., MCCULLOUGH M. T., MORRIS J. F. AND MOYES S. M. (2012). "Morphological aspects of interactions between microparticles and mammalian cells: intestinal uptake and onward movement." Progress in Histochemistry and Cytochemistry **46**(4): 185-252.
- CARR S. A., LIU J. AND TESORO A. G. (2016). "Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants." Water Research **91**: 174-182.
- CHAMPION J. A., WALKER A. AND MITRAGOTRI S. (2008). "Role of Particle Size in Phagocytosis of Polymeric Microspheres." Pharmaceutical Research **25**(8): 1815-1821.
- COLE M., LINDEQUE P., HALSBAND C. AND GALLOWAY T. S. (2011). "Microplastics as contaminants in the marine environment: A review." Marine Pollution Bulletin **62**(12): 2588-2597.
- DI M. AND WANG J. (2018). "Microplastics in surface waters and sediments of the Three Gorges Reservoir, China." Science of The Total Environment **616-617**: 1620-1627.
- ECKERT R., RANDALL D. J., APFELBACH R. AND GANSLOEBER U. (2002). Tierphysiologie. Stuttgart, Thieme.
- EERKES-MEDRANO D., THOMPSON R. C. AND ALDRIDGE D. C. (2015). "Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs." Water Research **75**: 63-82.
- EFSA (2016). "Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood: panel on Contaminants in the Food Chain." EFSA J. **14**: 1-30.
- ELBSCHWIMMSTAFFEL (2017). "<https://www.wissenschaftsjahr.de/2016-17/aktuelles/alle-aktuellen-meldungen/juli-2017/ein-neues-bakterium-und-mikroplastik-in-der-elbe.html>."
- ESPINOSA C., CUESTA A. AND ESTEBAN M. Á. (2017). "Effects of dietary polyvinylchloride microparticles on general health, immune status and expression of several genes related to stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)." Fish & Shellfish Immunology **68**: 251-259.
- EUROPEAN COMMISSION (2013). Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas: a Guidance Document within the Common Implementation Strategy for the Marine Strategy Framework Directive. Luxembourg, Publications Office of the European Union.
- FLORENCE A. T. (1997). "The Oral Absorption of Micro- and Nanoparticulates: Neither Exceptional Nor Unusual." Pharmaceutical Research **14**(3): 259-266.
- FREE C. M., JENSEN O. P., MASON S. A., ERIKSEN M., WILLIAMSON N. J. AND BOLDGIV B. (2014). "High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake." Marine Pollution Bulletin **85**(1): 156-163.
- GALLOWAY T. S., COLE M. AND LEWIS C. (2017). "Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem." Nature Ecology & Evolution **1**(5): 0116.
- GASPERI J., WRIGHT S. L., DRIS R., COLLARD F., MANDIN C., GUERROUACHE M., LANGLOIS V., KELLY F. J. AND TASSIN B. (2018). "Microplastics in air: Are we breathing it in?" Current Opinion in Environmental Science & Health **1**: 1-5.
- GIGAULT J., HALLE A. T., BAUDRIMONT M., PASCAL P.-Y., GAUFFRE F., PHI T.-L., EL HADRI H., GRASSL B. AND REYNAUD S. (2018). "Current opinion: What is a nanoplastic?" Environmental Pollution **235**: 1030-1034.
- GOUIN T., ROCHE N., LOHMANN R. AND HODGES G. (2011). "A Thermodynamic Approach for Assessing the Environmental Exposure of Chemicals Absorbed to Microplastic." Environmental Science & Technology **45**(4): 1466-1472.
- HANSEN U. AND PETERS W. (1998). "Structure and permeability of the peritrophic membranes of some small crustaceans." Zoologischer Anzeiger **236**(2-3): 103-108.
- HEB M., DIEHL P., MAYER J., RAHM H., REIFENHÄUSER W., STARK J. AND SCHWAIGER J. (2018). "Mikroplastik in Binnengewässern Süd- und Westdeutschlands." Bundesländerübergreifende Untersuchungen in Baden-Württemberg, Bayern, Hessen, Nordrhein-Westfalen und Rheinland-Pfalz. Teil 1: Kunststoffpartikel in der oberflächennahen Wasserphase **1**: 1e84.

- HIDALGO-RUZ V., GUTOW L., THOMPSON R. C. AND THIEL M. (2012). "Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification." Environmental Science & Technology **46**(6): 3060-3075.
- IVLEVA N. P., WIESHEU A. C. AND NIESSNER R. (2017). "Microplastic in Aquatic Ecosystems." Angewandte Chemie International Edition **56**(7): 1720-1739.
- JENSEN L. H. S., SKJOLDING L. M., THIT A., SØRENSEN S. N., KØBLER C., MØLHAVE K. AND BAUN A. (2017). "Not all that glitters is gold—Electron microscopy study on uptake of gold nanoparticles in *Daphnia magna* and related artifacts." Environmental Toxicology and Chemistry **36**(6): 1503-1509.
- JOVANOVIĆ B. (2017). "Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective." Integrated Environmental Assessment and Management **13**(3): 510-515.
- KARAMI A. (2017). "Gaps in aquatic toxicological studies of microplastics." Chemosphere **184**: 841-848.
- KARLSSON T. M., VETHAAK A. D., ALMROTH B. C., ARIESE F., VAN VELZEN M., HASSELLÖV M. AND LESLIE H. A. (2017). "Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastic accumulation." Marine Pollution Bulletin **122**(1): 403-408.
- KETTIGER H., SCHIPANSKI A., WICK P. AND HUWYLER J. (2013). "Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism." International Journal of Nanomedicine **8**(1): 3255-3269.
- KHAN F. R., BOYLE D., CHANG E. AND BURY N. R. (2017). "Do polyethylene microplastic beads alter the intestinal uptake of Ag in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)? Analysis of the MP vector effect using *in vitro* gut sacs." Environmental Pollution **231**: 200-206.
- KHAN F. R., SYBERG K., SHASHOUA Y. AND BURY N. R. (2015). "Influence of polyethylene microplastic beads on the uptake and localization of silver in zebrafish (*Danio rerio*)." Environmental Pollution **206**: 73-79.
- KOELMANS A. A., BAKIR A., BURTON G. A. AND JANSSEN C. R. (2016). "Microplastic as a Vector for Chemicals in the Aquatic Environment: Critical Review and Model-Supported Reinterpretation of Empirical Studies." Environmental Science & Technology **50**(7): 3315-3326.
- KOELMANS A. A., BESSELING E. AND SHIM W. J. (2015). Nanoplastics in the Aquatic Environment. Critical Review. Marine Anthropogenic Litter. M. BERGMANN, L. GUTOW AND M. KLAGES. Cham, Springer International Publishing: 325-340.
- LEE H., CHANG S., KIM S.-K. AND KWON J.-H. (2017). "Fugacity analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons between microplastics and seawater." Ocean Science Journal **52**(1): 43-55.
- LEHANE M. J. (1997). "PERITROPHIC MATRIX STRUCTURE AND FUNCTION." Annual Review of Entomology **42**(Volume 42, 1997): 525-550.
- LENZ R., ENDERS K. AND NIELSEN T. G. (2016). "Microplastic exposure studies should be environmentally realistic." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(29): E4121-E4122.
- LEÓN V. M., GARCÍA I., GONZÁLEZ E., SAMPER R., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ V. AND MUNIATEGUI-LORENZO S. (2018). "Potential transfer of organic pollutants from littoral plastics debris to the marine environment." Environmental Pollution **236**: 442-453.
- LI J., LIU H. AND PAUL CHEN J. (2018). "Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection." Water Research **137**: 362-374.
- LORENZ C. S., WICHT A.-J., GULUZADA L., LUO L., JÄGER L., CRONE B., KARST U., TRIEBSKORN R., LIANG Y., ANWANDER R., HADERLEIN S. B., HUHN C. AND KÖHLER H.-R. (2017). "Nano-sized Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> reduces acute toxic effects of thiacloprid on the non-biting midge *Chironomus riparius*." PLOS ONE **12**(5): e0176356.
- LU K., QIAO R., AN H. AND ZHANG Y. (2018). "Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*)." Chemosphere **202**: 514-520.
- LUSHER A. L., MCHUGH M. AND THOMPSON R. C. (2013). "Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel." Marine Pollution Bulletin **67**(1): 94-99.

- LUSHER A. L., TIRELLI V., O'CONNOR I. AND OFFICER R. (2015). "Microplastics in Arctic polar waters: the first reported values of particles in surface and sub-surface samples." Scientific Reports **5**(1): 14947.
- MANI T., HAUKE A., WALTER U. AND BURKHARDT-HOLM P. (2015). "Microplastics profile along the Rhine River." Scientific Reports **5**(1): 17988.
- MATO Y., ISOBE T., TAKADA H., KANEHIRO H., OHTAKE C. AND KAMINUMA T. (2001). "Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment." Environmental Science & Technology **35**(2): 318-324.
- MINTENIG S. M., INT-VEEN I., LÖDER M. G. J., PRIMPKE S. AND GERDTS G. (2017). "Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging." Water Research **108**: 365-372.
- MURPHY F., EWINS C., CARBONNIER F. AND QUINN B. (2016). "Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment." Environmental Science & Technology **50**(11): 5800-5808.
- NASSER F. AND LYNCH I. (2016). "Secreted protein eco-corona mediates uptake and impacts of polystyrene nanoparticles on *Daphnia magna*." Journal of Proteomics **137**: 45-51.
- NEVES D., SOBRAL P., FERREIRA J. L. AND PEREIRA T. (2015). "Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast." Marine Pollution Bulletin **101**(1): 119-126.
- NIZZETTO L., FUTTER M. AND LANGAAS S. (2016). "Are Agricultural Soils Dumps for Microplastics of Urban Origin?" Environmental Science & Technology **50**(20): 10777-10779.
- OGONOWSKI M., GERDES Z. AND GOROKHOVA E. (2018). "What we know and what we think we know about microplastic effects – A critical perspective." Current Opinion in Environmental Science & Health **1**: 41-46.
- PEEKEN I., PRIMPKE S., BEYER B., GÜTERMANN J., KATLEIN C., KRUMPEN T., BERGMANN M., HEHEMANN L. AND GERDTS G. (2018). "Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic." Nature Communications **9**(1): 1505.
- POWELL J. J., FARIA N., THOMAS-MCKAY E. AND PELE L. C. (2010). "Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract." Journal of Autoimmunity **34**(3): J226-J233.
- PRATA J. C., LAVORANTE B. R. B. O., B.S.M. MONTENEGRO M. D. C. AND GUILHERMINO L. (2018). "Influence of microplastics on the toxicity of the pharmaceuticals procainamide and doxycycline on the marine microalgae *Tetraselmis chuii*." Aquatic Toxicology **197**: 143-152.
- REHSE S., KLOAS W. AND ZARFL C. (2016). "Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*." Chemosphere **153**: 91-99.
- REZANIA S., PARK J., MD DIN M. F., MAT TAIB S., TALAIEKHOZANI A., KUMAR YADAV K. AND KAMYAB H. (2018). "Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies." Marine Pollution Bulletin **133**: 191-208.
- RIST S. AND HARTMANN N. B. (2018). Aquatic Ecotoxicity of Microplastics and Nanoplastics: Lessons Learned from Engineered Nanomaterials. Freshwater Microplastics: Emerging Environmental Contaminants? M. WAGNER AND S. LAMBERT. Cham, Springer International Publishing: 25-49.
- ROCHMAN C. M. (2013). "Plastics and Priority Pollutants: A Multiple Stressor in Aquatic Habitats." Environmental Science & Technology **47**(6): 2439-2440.
- ROTHEN-RUTISHAUSER B., KUHN D. A., ALI Z., GASSER M., AMIN F., PARAK W. J., VANHECKE D., FINK A., GEHR P. AND BRANDENBERGER C. (2014). "Quantification of Gold Nanoparticle Cell Uptake Under Controlled Biological Conditions and Adequate Resolution." Nanomedicine **9**(5): 607-621.
- SADRI S. S. AND THOMPSON R. C. (2014). "On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England." Marine Pollution Bulletin **81**(1): 55-60.
- SCHYMANSKI D., GOLDBECK C., HUMPF H.-U. AND FÜRST P. (2018). "Analysis of microplastics in water by micro-Raman spectroscopy: Release of plastic particles from different packaging into mineral water." Water Research **129**: 154-162.

- SILVA-CAVALCANTI J. S., SILVA J. D. B., FRANÇA E. J. D., ARAÚJO M. C. B. D. AND GUSMÃO F. (2017). "Microplastics ingestion by a common tropical freshwater fishing resource." Environmental Pollution **221**: 218-226.
- SLEIGHT V. A., BAKIR A., THOMPSON R. C. AND HENRY T. B. (2017). "Assessment of microplastic-sorbed contaminant bioavailability through analysis of biomarker gene expression in larval zebrafish." Marine Pollution Bulletin **116**(1): 291-297.
- SYBERG K., NIELSEN A., KHAN F. R., BANTA G. T., PALMQVIST A. AND JEPSEN P. M. (2017). "Microplastic potentiates triclosan toxicity to the marine copepod *Acartia tonsa* (Dana)." Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A **80**(23-24): 1369-1371.
- TABATA Y. AND IKADA Y. (1988). "Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage." Biomaterials **9**(4): 356-362.
- TALVITIE J., MIKOLA A., KOISTINEN A. AND SETÄLÄ O. (2017). "Solutions to microplastic pollution – Removal of microplastics from wastewater effluent with advanced wastewater treatment technologies." Water Research **123**: 401-407.
- TEUTEN E. L., ROWLAND S. J., GALLOWAY T. S. AND THOMPSON R. C. (2007). "Potential for Plastics to Transport Hydrophobic Contaminants." Environmental Science & Technology **41**(22): 7759-7764.
- TEUTEN E. L., SAQUING J. M., KNAPPE D. R. U., BARLAZ M. A., JONSSON S., BJÖRN A., ROWLAND S. J., THOMPSON R. C., GALLOWAY T. S., YAMASHITA R., OCHI D., WATANUKI Y., MOORE C., VIET P. H., TANA T. S., PRUDENTE M., BOONYATUMANOND R., ZAKARIA M. P., AKKHAVONG K., OGATA Y., HIRAI H., IWASA S., MIZUKAWA K., HAGINO Y., IMAMURA A., SAHA M. AND TAKADA H. (2009). "Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **364**(1526): 2027-2045.
- TOSETTO L., WILLIAMSON J. E. AND BROWN C. (2017). "Trophic transfer of microplastics does not affect fish personality." Animal Behaviour **123**: 159-167.
- VELZEBOER I., KWADIJK C. J. A. F. AND KOELMANS A. A. (2014). "Strong Sorption of PCBs to Nanoplastics, Microplastics, Carbon Nanotubes, and Fullerenes." Environmental Science & Technology **48**(9): 4869-4876.
- VOLKHEIMER G. (1974). "Passage of particles through the wall of the gastrointestinal tract." Environmental Health Perspectives **9**: 215-225.
- WAGNER M., SCHERER C., ALVAREZ-MUÑOZ D., BRENNHOLT N., BOURRAIN X., BUCHINGER S., FRIES E., GROSBOIS C., KLASMEIER J., MARTI T., RODRIGUEZ-MOZAZ S., URBATZKA R., VETHAAK A. D., WINTHER-NIELSEN M. AND REIFFERSCHIED G. (2014). "Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know." Environmental Sciences Europe **26**(1): 12.
- WAGNER S., HÜFFER T., KLÖCKNER P., WEHRHAHN M., HOFMANN T. AND REEMTSMA T. (2018). "Tire wear particles in the aquatic environment – A review on generation, analysis, occurrence, fate and effects." Water Research **139**: 83-100.
- WANG F., WONG C. S., CHEN D., LU X., WANG F. AND ZENG E. Y. (2018). "Interaction of toxic chemicals with microplastics: A critical review." Water Research **139**: 208-219.
- WANG W., NDUNGU A. W., LI Z. AND WANG J. (2017). "Microplastics pollution in inland freshwaters of China: A case study in urban surface waters of Wuhan, China." Science of The Total Environment **575**: 1369-1374.
- WOODALL L. C., SANCHEZ-VIDAL A., CANALS M., PATERSON G. L. J., COPPOCK R., SLEIGHT V., CALAFAT A., ROGERS A. D., NARAYANASWAMY B. E. AND THOMPSON R. C. (2014). "The deep sea is a major sink for microplastic debris." Royal Society Open Science **1**(4): 140317.
- WRIGHT S. L. AND KELLY F. J. (2017). "Plastic and Human Health: A Micro Issue?" Environmental Science & Technology **51**(12): 6634-6647.
- WRIGHT S. L., THOMPSON R. C. AND GALLOWAY T. S. (2013). "The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review." Environmental Pollution **178**: 483-492.
- XIONG X., ZHANG K., CHEN X., SHI H., LUO Z. AND WU C. (2018). "Sources and distribution of microplastics in China's largest inland lake – Qinghai Lake." Environmental Pollution **235**: 899-906.

ZALASIEWICZ J., WATERS C. N., IVAR DO SUL J. A., CORCORAN P. L., BARNOSKY A. D., CEARRETA A., EDGEWORTH M., GAŁUSZKA A., JEANDEL C., LEINFELDER R., MCNEILL J. R., STEFFEN W., SUMMERHAYES C., WAGREICH M., WILLIAMS M., WOLFE A. P. AND YONAN Y. (2016). "The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene." Anthropocene **13**: 4-17.

ZHU M., NIE G., MENG H., XIA T., NEL A. AND ZHAO Y. (2013). "Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate." Accounts of Chemical Research **46**(3): 622-631.

ZIAJAHROMI S., NEALE P. A., RINTOUL L. AND LEUSCH F. D. L. (2017). "Wastewater treatment plants as a pathway for microplastics: Development of a new approach to sample wastewater-based microplastics." Water Research **112**: 93-99

# Kapitel II: Polystyrene microplastics do not affect juvenile brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) or modulate effects of the pesticide methiocarb

HANNAH SCHMIEG<sup>a</sup>, SVEN HUPPERTSBERG<sup>b</sup>, THOMAS P. KNEPPER<sup>b</sup>, STEFANIE KRAIS<sup>a</sup>, KATHARINA REITTER<sup>a</sup>, FELIZITAS REZBACH<sup>a</sup>, AKI S. RUHL<sup>c,d</sup>, HEINZ-R. KÖHLER<sup>a</sup> and RITA TRIEBSKORN<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, 72076 Tübingen, Germany

<sup>b</sup> Hochschule Fresenius, University of Applied Sciences, Institute for Analytical Research (IFAR), Limburger Str. 2, 65510 Idstein, Germany

<sup>c</sup> Chair of Water Quality Control, Technische Universität Berlin, Sekr. KF 4, Str. des 17. Juni 135, 10623 Berlin, Germany

<sup>d</sup> German Environment Agency (UBA), Section II 3.1 (National and International Development of Drinking Water Quality and Resource Protection), Schichauweg 58, 12307 Berlin, Germany

<sup>e</sup> Steinbeis Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, 72108 Rottenburg, Germany

Published in: Environmental Sciences Europe (2020) **32**: 49,

doi: <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00327-4>

## Keywords

Microplastics, Pesticide, Methiocarb, Brown trout, Oxidative stress, Acetylcholinesterase, Histopathology

## Abstract

**Background:** There has been a rising interest within the scientific community and the public about the environmental risk related to the abundance of microplastics in aquatic environments. Up to now, however, scientific knowledge in this context has been scarce and insufficient for a reliable risk assessment. To remedy this scarcity of data, we investigated possible adverse effects of polystyrene particles ( $10^4$  particles/L) and the pesticide methiocarb (1 mg/L) in juvenile brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) both by themselves as well as in combination after a 96 h laboratory exposure. PS beads (density 1.05 g/mL) were cryogenically milled and fractionated resulting in irregular shaped particles ( $< 50 \mu\text{m}$ ). Besides body weight of the animals, biomarkers for proteotoxicity (stress protein family Hsp70), oxidative stress (superoxide dismutase, lipid peroxidation), and neurotoxicity (acetylcholinesterase, carboxylesterases) were analyzed. As an indicator of overall health, histopathological effects were studied in liver and gills of exposed fish.

*Results:* Polystyrene particles by themselves did not influence any of the investigated biomarkers. In contrast, the exposure to methiocarb led to a significant reduction of the activity of acetylcholinesterase and the two carboxylesterases. Moreover, the tissue integrity of liver and gills was impaired by the pesticide. Body weight, the oxidative stress and the stress protein levels were not influenced by methiocarb. Effects caused by co-exposure of polystyrene microplastics and methiocarb were the same as those caused by methiocarb alone.

*Conclusions:* Overall, methiocarb led to negative effects in juvenile brown trout. In contrast, polystyrene microplastics in the tested concentration did not affect the health of juvenile brown trout and did not modulate the toxicity of methiocarb in this fish species.

## **1 Background**

Public and scientific awareness for the problem of environmental pollution with microplastics (MP) has increased considerably over the last years. MP can be found ubiquitously in marine and freshwater ecosystems and even in remote regions (DRIS *et al.* 2015, BERGMANN *et al.* 2017, HORTON *et al.* 2017). While most research focuses on the abundance and possible effects of MP in marine environments, the number of studies in freshwater ecosystems is also rapidly increasing (HORTON *et al.* 2017). Nevertheless, many gaps in knowledge about abundance, toxicity, and hazards of MP in freshwater systems still exist.

Possible effects of MP can be related to mechanical injuries caused by the particles (e.g. von MOOS *et al.* 2012, KARAMI *et al.* 2016, LU *et al.* 2016, PAUL-PONT *et al.* 2016, DING *et al.* 2018). Of particular interest are very small particles (mainly nanoplastics) for which uptake in cells were shown (e.g. MATTSSON *et al.* 2017, VAN POMEREN *et al.* 2017, DING *et al.* 2018). In addition to this physical damage, MP can also potentially affect organisms due to the leakage of hazardous substances like residual monomers, polymerization solvents, or additives (LITHNER *et al.* 2009, SCHIAVO *et al.* 2018). A third process that should be considered in this context is that MP might adsorb/absorb hydrophobic organic pollutants like PAHs, PCBs, or pesticides (reviewed by WANG *et al.* 2018) and transport them into organisms. Sorption of hydrophobic organic pollutants to MP is especially important for freshwater, since the concentrations of these pollutants are generally higher than in marine ecosystems (DRIS *et al.* 2015). The sorption of organic pollutants to MP may alter the bioavailability of the pollutants (e.g. OLIVEIRA *et al.* 2013, NEMATDOOST HAGHI AND BANAEI 2017, SLEIGHT *et al.* 2017, GUILHERMINO *et al.* 2018, KLEINTEICH *et al.* 2018, REHSE *et al.* 2018). Furthermore, BATEL *et al.* (2016) showed the possibility of the transfer of organic pollutants adsorbed to MP along an artificial food chain. The biological relevance of MP as vectors for chemicals is still under debate. Several studies suggest the effect of MP to be negligible compared to other exposure pathways and the concentration of organic compounds in most MP to be in

equilibrium with the surrounding media (e.g. BAKIR *et al.* 2016, KOELMANS *et al.* 2016, BECKINGHAM AND GHOSH 2017). To assess the risk of MP alone and in combination with organic pollutants, more studies under controlled lab conditions are required.

Residues of pesticides are regularly found in freshwater ecosystems (e.g. SMITH *et al.* 2012, BUNDSCHUH *et al.* 2014, KÖCK-SCHULMEYER *et al.* 2014). Methiocarb (or synonym mercaptodimethur) is a carbamate pesticide, which is used as a molluscicide, herbicide, insecticide, acaricide, and as repellent in seed treatment (WORTHING *et al.* 1991, EUROPEAN COMMISSION 2014, LOOS *et al.* 2018). In the US, products containing methiocarb are registered by the EPA for restricted usage (EPA 1994). In September 2019, the European Commission did not renew the approval of methiocarb as an active substance (EUROPEAN COMMISSION 2019b). Prior to this decision, products containing methiocarb were generally approved for usage in the EU, although the application as a molluscicide was already prohibited since 2014 (EUROPEAN COMMISSION 2014, EUROPEAN COMMISSION 2019a). Methiocarb is on the first surface water Watch List under the Water Framework Directive of the European Union and is recommended for the second Watch List (EUROPEAN COMMISSION 2015, LOOS *et al.* 2018). The average surface water concentration of methiocarb in the EU-wide monitoring campaign was between 6 and 40 ng/L, and maximal concentration 109 ng/L (LOOS *et al.* 2018).

The purpose of the present study was to investigate whether polystyrene (PS) MP alone and in co-exposure with methiocarb affect juvenile brown trout (*Salmo trutta f. fario*). To determine the amount of methiocarb sorbed on PS particles, a separate sorption study would be necessary. Sorption of chemical contaminants to MP involves various mechanisms and depends on physicochemical properties of the sorbate, the sorbent, as well as the medium characteristics (TOURINHO *et al.* 2019). The animals were exposed to either PS-MP alone ( $10^4$  particles/L), to methiocarb alone (1 mg/L), or co-exposed to both ( $10^4$  particles/L and 1 mg/L methiocarb) for 96 h. The chosen methiocarb concentration was relatively high to ensure that the effects of methiocarb and hence also a possible modulation could be observed in the experiment. Besides apical endpoints (mortality and body weight), biomarkers for oxidative stress (activity of superoxide dismutase (SOD) and formation of lipid peroxidation (LPO)), proteotoxicity (stress protein family Hsp70) as well as neurotoxicity (acetylcholinesterase (AChE) activity and two protective carboxylesterases (CbE)) were examined. Furthermore, the histopathological status of gills and liver was analyzed. Our purpose was to investigate possible mechanistic effects in juvenile brown trout of PS-MP or methiocarb alone at sub-lethal level and whether PS-MP modulate the toxicity of methiocarb at the tested concentrations.

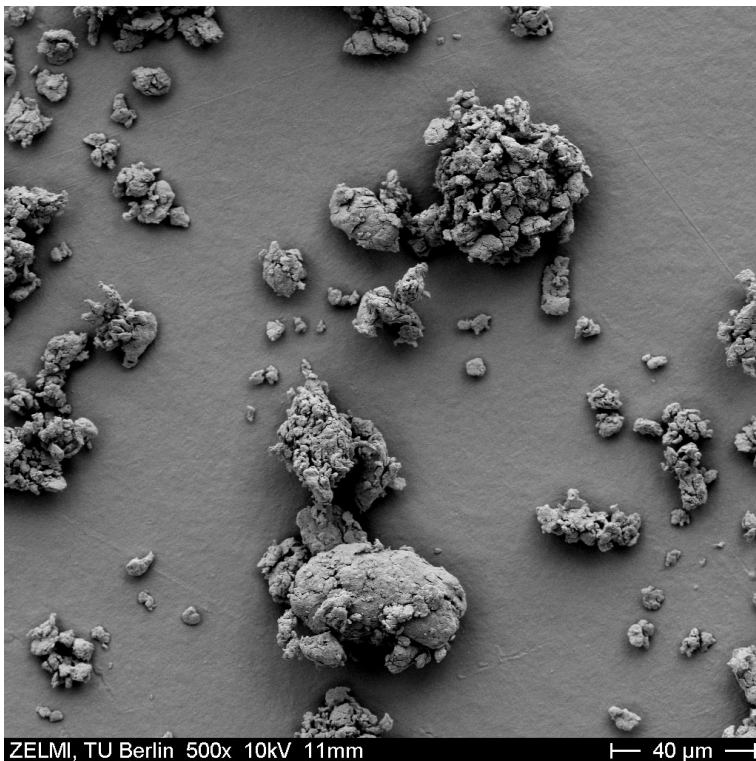
## 2 Materials and methods

### 2.1 Test organism

In the present study, approximately 11-month-old juvenile brown trout were used. Prior to the experiment, trout were acclimated in a 250 L tank to lab conditions (aerated filtered tap water-iron filter, particle filter, activated charcoal filter) for almost three months. Trout originated from a commercial fish breeder (Forellenzucht Lohmühle, D-72275 Alpirsbach-Ehlenbogen, Germany). In regular controls, the breeding establishment is categorized as category I, disease-free (EU 2006).

### 2.2 Test substances

PS-MP suspensions with a defined number of particles were produced according to the method of EITZEN *et al.* (2019). The polystyrene particles were analysed by different techniques (Raman and FTIR spectroscopy and TED-GC-MS) in scope of the joint project MiWa (for FTIR spectrum see supplement Figure S1). In brief, transparent polystyrene pellets (Polystyrol 158 K, BASF, Germany) with a density of 1.05 g/mL were cryogenically milled (CryoMill, Retsch, Germany) resulting in irregularly shaped PS-MP particles (Figure 1).



**Figure 1:** Electron micrograph of the cryo-milled gold sputtered PS particles (Scanning electron microscope (SEM) Zeiss DSM 982 GEMINI; secondary electron detector).

The number of PS particles in the pure suspension was determined with a particle counter (SVSS, PAMAS, Germany) by light extinction in a laser-diode sensor (type HCB-LD-50/50). The particle

size distribution is provided in Table 1, a figure in the supplement (Figure S2). Subsequently, the particles were fractionated by a micro-sieve (polyamide monofilament) to  $< 50 \mu\text{m}$ , and the permeate was used as stock suspension. Particles below  $1 \mu\text{m}$  (e.g. ca. 500 nm) were only rarely found in SEM in samples after cryogenic milling much more excessive than applied for the particles used in this study (compare EITZEN *et al.* 2019). Methiocarb was purchased from Sigma-Aldrich (product line: PESTANAL®; CAS number: 2032-65-7; purity 99.8%; more details in the supplement). The octanol/water partition coefficient of methiocarb is  $\log \text{Pow } 3.08$  (ILO 2012). The predicted solubility in water (20 °C) is between 14.23 mg/L and 119.63 mg/L (EPA CHEMISTRY DASHBOARD). Nevertheless, it was not possible to dissolve 15 mg/L methiocarb without a solvent. Therefore, 0.01% dimethyl sulfoxide (DMSO) was used to dissolve methiocarb in water.

**Table 1:** Size ranges (in  $\mu\text{m}$ ) and counted particle numbers (per mL) of polystyrene particles in the stock suspension.

Size range [ $\mu\text{m}$ ]	Particle number [1/mL]	Size range [ $\mu\text{m}$ ]	Particle number [1/mL]
2-3	9067	30-35	643
3-4	6488	35-40	473
4-5	8872	40-50	511
5-6	4832	50-60	220
6-7	3770	60-70	89
7-8	3484	70-80	43
8-9	3076	80-90	18
9-10	2412	90-100	6
10-12	3259	100-150	5
12-14	2330	150-200	0
14-16	1628	200-250	0
16-18	1195	250-300	0
18-20	1081	300-350	0
20-25	1698	350-400	0
25-30	1041		

### 2.3 Exposure of juvenile brown trout

Fish were exposed in a static three-block design for 96 h (18.10.-23.10.2017). Each of the three blocks consisted of five tanks with the different treatment groups: a negative control group (pure water), a solvent control (0.01% DMSO), PS-MP ( $10^4$  particles/L), methiocarb (1 mg/L), and a co-exposure of  $10^4$  particles/L and 1 mg/L methiocarb (mixture). The test concentration of 1 mg/L methiocarb was selected due to published  $\text{LC}_{50}$  values for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): the reported  $\text{LC}_{50}$  (96 h) values vary between  $\text{LC}_{50} = 0.198 \text{ mg/L}$  (JOHNSON AND FINLEY 1980) and  $\text{LC}_{50} = 4.82 \text{ mg/L}$  (PESTICIDE ACTION NETWORK 2000-2019). However, ALTINOK *et al.* (2006) found all fish in the experiment exposed to concentrations equal or less 3.75 mg/L survived over two months. The relatively high concentration of 1 mg/L was selected in order to have a high chance

for methiocarb to cause effects in brown trout and to be able to observe potential modulation of these effects. Each aquarium contained 10 fish (in 15 L of the corresponding test medium) resulting in 30 fish per treatment (aquaria in triplicates) and 150 fish in total. To be able to consider potential confounding factors, the position of each treatment group within the blocks was randomized. Exposure took place in a thermo-constant chamber set to 7 °C with a light/dark cycle of 10 h/14 h (tanks were shaded from direct light). Aeration of the tanks was ensured by glass pipettes, which were connected to compressed air via silicone tubes.

In all treatment groups, filtered tap water was used. For the PS-MP treatments, the defined volumes of the stock suspensions (56 240 particles/mL) were added. To avoid a loss of particles in the glass vessels containing the PS-MP suspensions, the vessels were rinsed four times. For each tank containing methiocarb, a stock solution (15 mg/L methiocarb) was prepared as follows: 15 mg methiocarb were dissolved in 1.5 mL DMSO (resulting in a concentration of 0.01% DMSO in the tanks), and subsequently, 1 L water was added. Finally, the solutions were stirred for two days to ensure a complete dissolution of methiocarb. To provide comparability between the groups, 0.01% DMSO was also added to the tanks which contained only PS-MP.

Fish were fed daily a defined portion (4% of body weight) of commercially available fish food (0.8 mm, Biomar, Brande, Denmark). After 48 h and 72 h, 2.5 L of the test medium of each aquarium was removed to get rid of feces and remains of food. Water parameters were measured at the beginning and the end of the experiment (average values: temperature =  $7.0 \pm 0.3$  °C, pH =  $7.3 \pm 0.5$ , oxygen concentration =  $10.9 \pm 0.4$  mg/L, oxygen saturation =  $94.7 \pm 2.4\%$ ; conductivity =  $489.8 \pm 15.8$   $\mu$ S/cm; for detailed information see supplement Table S1 and Table S2). Nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) values did not exceed 0.2 mg/L.

After 24 h, four animals (one fish of block 1 methiocarb, two fish of block 3 methiocarb, and one fish of block 2 mixture) were in very poor health conditions and had to be euthanized. Apart from these, no fish died during the experiment.

At the end of the experiment, fish were anesthetized and killed by an overdose of tricaine methanesulfonate (1 g/L MS222, buffered with  $\text{NaHCO}_3$ ). Subsequently, death of the animals was ensured by severance of the spine. Body weight and length of each animal were recorded prior to dissection ( $2.96 \pm 1.01$  g /  $6.47 \pm 0.73$  cm). For histological investigations samples of gills and liver were transferred into fixative (2% glutardialdehyde diluted in 0.1 M cacodylate buffer; pH 7.6) and stored at 4 °C until further processing. For biochemical analyses, samples of muscle (AChE and CbE activity), brain (LPO analysis), gills (stress protein analysis), and a part containing muscle and kidney (for analysis of SOD activity) were immediately frozen in liquid nitrogen. Subsequently, samples for biochemical analyses were stored at -80 °C.

In addition, 30 fish (kept in a 250 L tank during the experiment) were sampled in an analogous manner as lab control to be able to recognize possible effects of the exposure procedure (e.g. limited water volume) itself.

#### *2.4 Chemical analysis*

From each aquarium, 12 mL medium was taken at the beginning and the end of the experiment and frozen at -20 °C until further processing. Samples of the three replicate tanks were analyzed separately by means of HPLC-ESI-MS/MS. Quantification was performed via liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). As instrumentation, a PerkinElmer Series 200 LC system (PerkinElmer, Waltham, USA) consisting of two Series 200 micro-pumps, a Series 200 vacuum degasser, and a Series 200 autosampler was coupled to a QqLIT mass spectrometer SCIEX QTRAP 3200 (AB SCIEX, Darmstadt, Germany), and ionization was achieved via electrospray ionization (ESI) in positive mode (further information is provided in the supplement).

Separation was performed at 23 °C using an XSelect™ HSS T3 reverse phase column (2.1 mm x 50 mm, 3.5 µm particle size) from Waters (Milford, USA). Injection volume was 10 µL and a gradient was run with a flow rate of 200 µL/min. Eluents used for chromatographic separation were mixtures of methanol and water (Eluent A: MeOH/H<sub>2</sub>O, 5:95, v/v; Eluent B: MeOH/H<sub>2</sub>O, 95:5, v/v) additionally containing 5 mM/L ammonium formate (NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>) and adjusted to pH 3 with formic acid (further information are provided in the supplement).

A multiple reaction monitoring (MRM) method was used for quantification. The individual transitions and optimized MS parameters are stated in Table S5 in the supplement.

Unless specified otherwise, all calculations were carried out via Microsoft Excel 2016. The developed method was validated regarding the limit of detection (LoD), the limit of quantification (LoQ), and the method precision and accuracy. LoD and LoQ were determined by application of the signal to noise (S/N) approach. The S/N ratios of two calibration standards ( $\beta$  = 0.25 ng/mL and 0.5 ng/mL) were measured in triplicate, and their S/N ratio was determined. LoD was defined as  $S/N > 3$ , and LoQ with  $S/N > 9$ . With the determined S/N ratios, the theoretical LoD and LoQ were calculated as LoD = 0.04 ng/ml and LoQ = 0.13 ng/mL (more details are provided in Table S6 in the supplement). The lowest standard of the calibration (0.25 ng/mL) corresponds to the applied LoQ.

Concentrations of standards used for calibration ranged from 0.25 to 250 ng/mL, and atrazine was used as an internal standard. Measurement precision was determined by multiple ( $n = 5$ ) of three standards and the calculation of their concentration based on the obtained calibration.

Mean concentrations, relative standard deviation (RSD), and accuracy are stated in Table S7 in the supplement. For quantification, calibration was measured in triplicate (before, in between, and after the samples). Samples were filtered via syringe filters (Carl Roth, SPARTAN® regenerated cellulose, 0.2 µm) after dilution (1:25; 1:100; V.V) with type 1 water and prior to their measurement.

## 2.5 Determination of oxidative stress level

### 2.5.1 Activity of SOD

The SOD activity (Cu/Zn SOD, Mn SOD, and Fe SOD) in muscle/kidney samples was analyzed with the Cayman Chemical superoxide dismutase assay kit (item no. 706002, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) in 96-well plates. To remove any blood residues, samples were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) before they were frozen in liquid nitrogen. The dilution of the final samples was 1:150. In the assay, superoxide radicals are generated with xanthine oxidase and hypoxanthine. Subsequently, the superoxide radicals are detected with tetrazolium salt. The absorbance at 450 nm was measured (Bio-Tek Instruments, Winooski VT, USA) after an incubation of 30 min at room temperature. All samples were analyzed in duplicates.

### 2.5.2 Level of lipid peroxidases

The level of lipid peroxides was quantified with the ferrous oxidation xylenol orange (FOX) assay. The assay was performed in a slightly modified way for 96-well plates according to HERMES-LIMA *et al.* (1995) and MONSERRAT *et al.* (2003). For homogenization, the brains were 1:2 diluted with HPLC grade methanol and subsequently centrifuged (15 000 rcf, 5 min, 4 °C). Supernatant was stored until the final assay at -80 °C. The assay was performed in 96-well plates. Into each well, 50 µL of 0.75 mM FeSO<sub>4</sub>-solution, 50 µL of 75 mM sulfuric acid, 50 µL of 0.3 mM xylenol orange solution, 40 µL supernatant, and 10 µL bidistilled water were added successively. Triplicates of each sample were tested. Furthermore, a sample blank without FeSO<sub>4</sub> (replaced by bidistilled water) of each sample was measured to correct for potential Fe in the samples. After an incubation of 120 min at room temperature, the absorbance at 570 nm (ABS570) was measured (Bio-Tek Instruments, Winooski VT, USA). Afterward, in each well 1 µL of 1 mM cumene hydroperoxide solution (CHP) was pipetted. The plates were incubated for another 30 min at room temperature, and a second measurement at 570 nm was conducted. The data of both measurements were related to a master blank (200 µL bidistilled water). Cumene hydroperoxide equivalents (CHPequiv./mg wet weight) were calculated using the following equation:

$$\begin{aligned}
 \text{CHPequiv.} &= \frac{\text{ABS570 sample} - \text{ABS570 sample blank}}{\text{ABS570 sample and CHP} - \text{ABS570 sample blank and CHP}} * \text{volume CHP} \\
 &\quad * \frac{\text{total volume in well}}{\text{sample volume}} * \text{dilution factor} \\
 &= \frac{\text{ABS570 sample} - \text{ABS570 sample blank}}{\text{ABS570 sample and CHP} - \text{ABS570 sample blank and CHP}} * 1 * \frac{200}{40} * 2
 \end{aligned}$$

## 2.6 Stress protein analysis

Hsp70 quantification was performed as described by DIETERICH *et al.* (2015). Samples were 1:3 diluted with extraction buffer (80 mM potassium acetate, 5 mM magnesium acetate, 20 mM HEPES, and 2% protease inhibitor at pH 7.5) and homogenized on ice. The samples were centrifuged (20 000 rcf, 10 min, 4 °C) and the supernatant was divided into two samples. The first was used to quantify the total protein content via Bradford assay (BRADFORD 1976). Subsequently, the second sample (amount standardized to 40 µg of total protein content) was separated via SDS-PAGE (12% acrylamide, 0.12% bisacrylamide, 30 min at 80 V plus 90 min at 120 V). The proteins were blotted on a nitrocellulose membrane and immuno-stained with a monoclonal α-Hsp70 IgG (Dianova, Hamburg, Germany) followed by a secondary peroxidase-coupled α-IgG (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). The optical volume (area x average pixel intensity) of the protein bands was quantified (Image Studio Lite, 4.0.2.1, Li-Cor Biosciences, Lincoln, USA) and put into relation to an internal Hsp70 standard.

## 2.7 Analysis of neurotoxicity

For the analysis of the activity of AChE and two CbE, muscle tissue was diluted 1:5 in Tris-LS buffer (20 mM Tris<sub>base</sub>, 20 mM NaCl, inhibitor mix, pH 7.3) and homogenized. After centrifugation (5000 rcf, 10 min, 4 °C), 50% glycerol was added to the supernatant (1/4 of the amount of the supernatant), and the mixture was frozen at -20 °C. The protein content in the samples was determined with the Lowry method modified by MARKWELL *et al.* (1978). The AChE-activity was measured spectrophotometrically at 405 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski VT, USA) according to ELLMAN *et al.* (1961) and modified by RAULT *et al.* (2008). CbE activity was determined with the substrates 5 mM 4-nitrophenol acetate (pnpa) and 5 mM 4-nitrophenyl valerate (pnpv) described by SANCHEZ-HERNANDEZ *et al.* (2009). In all assays, samples were analyzed in triplicates. The data were related to the total protein amount (specific activity per milligram total protein content). One unit is described as 1 µmol substrate hydrolyzed per minute.

### 2.8 Histopathology

Liver and gill samples were fixed in 2% glutardialdehyde diluted in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.6) and stored at 4 °C for at least 4 weeks. Prior to further processing, gill samples were decalcified in a 1:2 mixture of 100% formic acid and 70% ethanol. All samples were rinsed three times for 10 min in 0.1 M cacodylate buffer and subsequently three times for 15 min in 70% ethanol. Dehydration of the samples and embedding into paraffin were achieved in an automated tissue infiltrator (TP 1020, Leica Wetzlar, Germany). With a sledge microtome (SM 2000 R, Leica Wetzlar, Germany), 3 µm thick histological sections were cut. Sections were stained (1) with hematoxylin-eosin (HE) which visualizes nuclei, cytoplasm muscles, and connective tissue and (2) alcian blue – PAS by which glycogen and mucus were stained. In a first step, the slides were evaluated qualitatively to identify pathologies. In a second step, the slides were examined semi-quantitatively in an observer blinded way. The samples were categorized into five classes (1: control; 2: slight reactions; 3: medium reactions; 4: strong reactions; 5: destruction) as suggested by TRIEBKORN *et al.* (2008). Detailed definitions of the five categorizes are provided in the supplement (Table S8).

### 2.9 Statistical analysis

Data analysis was performed with JMP®14.0.0 (SAS Institute Inc., North Carolina, USA). Standard distribution of the data was checked with the Shapiro Wilk test. Homogeneity of variance was checked with the Levene`s test. If necessary, data were transformed (AChE: root, weight: third root, SOD: fifth root, Hsp70: natural logarithm, Cbe-pnpa: 1/x, Cbe-pnpv: seventh root). Using a *t* test for all investigated parameters, we ensured that there were no significant differences between the control and the solvent control. Subsequently, the other treatments were compared to the solvent control. In addition to the comparison to the solvent control, the PS-MP and the methiocarb treatments were compared to the mixture treatment. Comparisons with the lab control were conducted only qualitatively and were not included in the mathematical analyses.

The base  $\alpha$ -level was set to 0.05. Parametric data were analyzed with a nested ANOVA including `block` as nesting factor. This allows considering potential confounding factors and avoiding pseudo-replication. The comparison between the single groups was made with Tukey HSD. The data of the activity of CbE with the substrate pnpa could not be transformed to reach homoscedasticity. Thus, a Welch ANOVA was performed to analyze the effect on the activity of CbE-pnpa mathematically. Frequency data were analyzed with likelihood-ratio analysis and a post hoc Bonferroni-Holm correction. Detailed values of the tests are given in the supplement (Table S9).

### 2.10 Credibility of data

The information on the fulfillment of the criteria for reporting and evaluation of ecotoxicity data (CRED) proposed by MOERMOND *et al.* (2016) is provided in the supplementary information.

## 3 Results

### 3.1 Chemical analyses

At the beginning and the end of the experiment, in both control groups, the methiocarb concentrations in the water phase were below the applied quantification limit (LoQ) of 0.25 µg/L (Table 2). In the PS-MP exposure, no methiocarb in the water phase could be detected (< LoQ). In both exposure groups with methiocarb (methiocarb and mixture), the measured concentrations in the water phase at the beginning of the experiment were 50% of the nominal concentrations. After 96 h, in the treatment group with solely methiocarb, the concentration was further reduced by approximately 50%, and in the mixture treatment by 34%.

**Table 2:** Nominal and measured concentrations of methiocarb in the water phase of the different treatment groups. Displayed are the arithmetic means ± standard deviation of the three aquaria. The applied limit of quantification was 0.25 µg/L methiocarb.

Treatment group	Nominal concentration	Measured concentration at start of experiment	Measured concentration at end of experiment
Control	0 µg/L	< 0.25 µg/L	< 0.25 µg/L
Solvent control	0 µg/L	< 0.25 µg/L	< 0.25 µg/L
PS-MP (10 <sup>4</sup> particles/L)	0 µg/L	< 0.25 µg/L	< 0.25 µg/L
Methiocarb	1000 µg/L	463 µg/L ± 32 µg/L	237 µg/L ± 59 µg/L
Mixture PS-MP + methiocarb	1000 µg/L	469 µg/L ± 133 µg/L	308 µg/L ± 76 µg/L

### 3.2 Mortality and weight

After 48 h, three of the fish exposed to methiocarb and one of the fish exposed to the mixture had to be euthanized due to their poor health conditions. Apart from that, no mortality occurred during the experiment. The total mortality was 2.67%. Weight (overall mean: 2.96 ± 1.01 g) did not differ between the treatment groups (Table 3;  $p = 0.3384$ ).

### 3.3 Oxidative Stress

To assess the oxidative stress level, SOD activity and the degree of LPO were investigated. No difference ( $p = 0.5136$ ) between SOD activity in the different treatment groups was found (Table 3). The degree of LPO of the exposure groups was comparable to the solvent control ( $p = 0.5770$ ). For both tested endpoints, neither PS-MP nor methiocarb nor the mixture caused oxidative stress.

**Table 3:** Summary of data for the investigated endpoints. All data are given as arithmetic means  $\pm$  standard deviation.

	<b>Lab control</b>	<b>Control</b>	<b>Solvent control</b>	<b>PS-MP</b>	<b>Methiocarb</b>	<b>Mixture</b>
<b>Weight [g]</b>	4.02 $\pm$ 1.09	2.49 $\pm$ 0.66	2.89 $\pm$ 0.87	3.21 $\pm$ 0.91	2.95 $\pm$ 1.27	3.30 $\pm$ 1.06
<b>SOD [U/mL]</b>	92.71 $\pm$ 26.12	105.29 $\pm$ 28.81	106.50 $\pm$ 24.22	106.66 $\pm$ 29.69	99.88 $\pm$ 31.59	99.43 $\pm$ 35.37
<b>FOX [CHP-Equiv.]</b>	2.17 $\pm$ 1.26	2.56 $\pm$ 1.09	1.97 $\pm$ 1.17	1.69 $\pm$ 1.21	1.83 $\pm$ 1.52	1.60 $\pm$ 1.39
<b>Hsp70 [relative grey value]</b>	1.71 $\pm$ 0.29	1.84 $\pm$ 0.29	1.78 $\pm$ 0.29	1.72 $\pm$ 0.26	1.77 $\pm$ 0.30	1.71 $\pm$ 0.27
<b>AChE [mU/mg protein]</b>	69.32 $\pm$ 11.55	88.38 $\pm$ 24.98	77.37 $\pm$ 18.39	73.93 $\pm$ 20.28	31.48 $\pm$ 11.38	32.38 $\pm$ 11.64
<b>CbE-pnpa [mU/mg protein]</b>	82.20 $\pm$ 9.16	79.13 $\pm$ 10.83	79.10 $\pm$ 11.38	76.68 $\pm$ 7.90	45.52 $\pm$ 5.74	44.48 $\pm$ 5.01
<b>CbE-pnpv [mU/mg protein]</b>	60.60 $\pm$ 11.14	53.89 $\pm$ 12.38	54.01 $\pm$ 12.94	49.59 $\pm$ 10.46	9.10 $\pm$ 3.24	9.05 $\pm$ 1.91

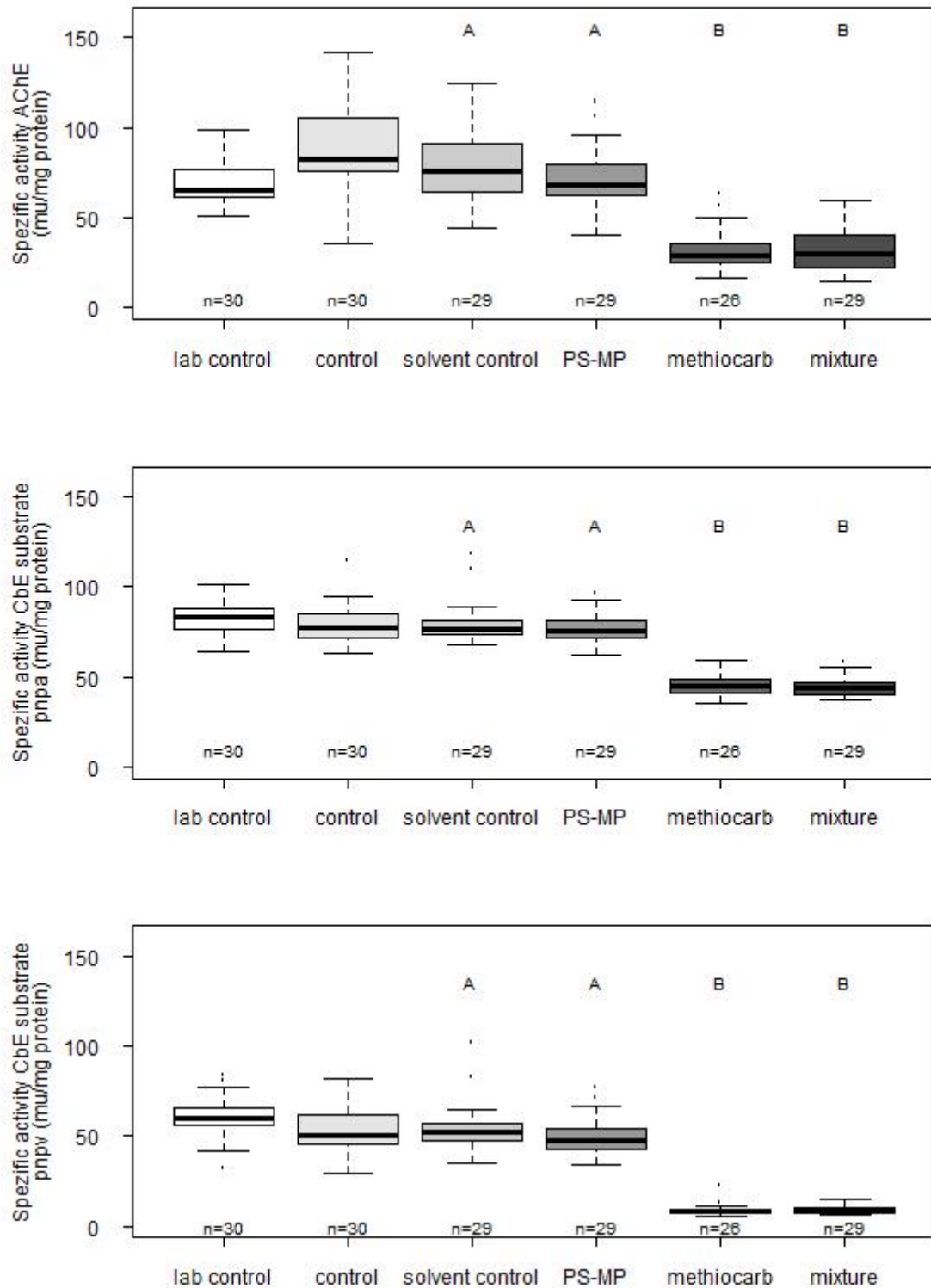
### 3.4 Proteotoxicity

The analysis of the Hsp70 level did not reveal any differences between control, solvent control, and exposure groups (Table 3;  $p = 0.7922$ ).

### 3.5 Neurotoxicity

No difference in the activity of AChE occurred between solvent control and treatment group with PS-MP ( $p = 0.8192$ ). However, the methiocarb and the mixture of methiocarb and PS-MP led to a significantly reduced activity of AChE in comparison to the solvent control and PS-MP alone (Figure 2).

The activity of AChE in the methiocarb-exposed fish was 59% reduced compared to the solvent control ( $p < 0.001$ ). In fish exposed to the mixture of PS-MP and methiocarb, the activity of AChE was reduced by 58% compared to the solvent control ( $p < 0.001$ ; Table 3). Between fish exposed to methiocarb alone and methiocarb plus PS-MP, no differences were found ( $p = 0.9951$ ). The activity of CbE-pnpa was also inhibited by methiocarb and the mixture treatment (Figure 2; DMSO/PS-MP:  $p = 0.9357$ ; DMSO/methiocarb, DMSO/mixture and PS-MP/mixture:  $p < 0.001$ ; methiocarb/mixture:  $p = 0.8531$ ). The activity of the CbE-pnpa was not altered by PS-MP alone. Methiocarb alone reduced the activity compared to the solvent control by 42%, the mixture by 44%.



**Figure 2:** Specific activity of acetylcholinesterase and carboxylesterases with substrate pnpa and pnpv in muscular tissue of brown trout. The box plots display the median, the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles as well as minimum and maximum values (whiskers); the dots indicate outliers. Different letters indicate significant differences. Methiocarb and mixture significantly reduced the AChE activity as well as CbE-pnpa and CbE-pnpv activity ( $p < 0.0001$ ).

Even more pronounced was the inhibition of CbE with the substrate pnpv: compared to the solvent control, the activity was reduced by 83% both in methiocarb-exposed fish and for fish in the mixture treatment (Figure 2; DMSO/mixture, PS-MP/mixture:  $p < 0.0001$ ; methiocarb/mixture:  $p = 0.7609$ ). Again, PS-MP alone had no influence on the activity of CbE-pnpv. Beside the clear effect of the different treatments, the treatment nested in the block had a significant effect ( $p = 0.0322$ ).

### 3.6 Histopathology

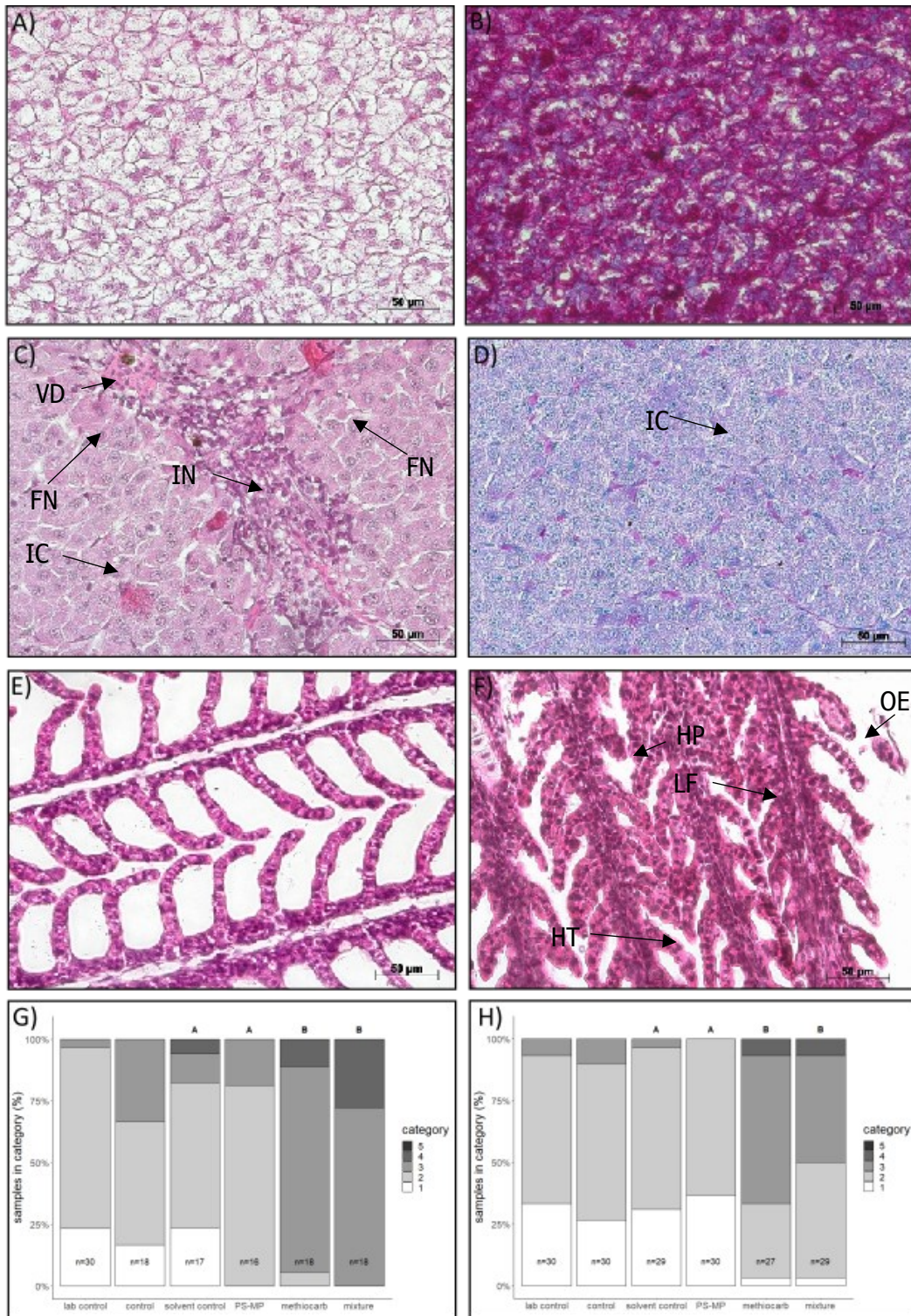
#### 3.6.1 Liver

Healthy liver tissue consists of large bright cells containing high amounts of glycogen (Figure 3A and B). Fish from the lab control, control, solvent control, and exposure with PS-MP showed in some cases inflammations and even focal necrosis. In fish exposed to methiocarb alone or the mixture treatment, a reduction of the glycogen stores became obvious (Figure 3D) resulting in atrophic cells and enlarged intercellular spaces.

Furthermore, in both groups containing methiocarb vacuolization and inflammations occurred cumulatively, and in the majority of samples small zones (single cell or few cells) with karyopyknosis and focal necrosis were found (Figure 3C). In all investigated samples the proportion of necrotic tissue was  $< 10\%$ . Semi-quantitative analyses showed a very similar condition of fish from the control, solvent control, and exposure with PS-MP, whereas livers of fish exposed to methiocarb, or the mixture treatment showed significantly stronger reactions (Figure 3G; DMSO/PS-MP:  $p = 0.0577$ , DMSO/methiocarb, DMSO/mixture, PS-MP/mixture:  $p < 0.0001$ , methiocarb/mixture:  $p = 0.2396$ ).

#### 3.6.2 Gills

Observed pathological alterations in gills of brown trout included hyperplasia and hypertrophy of chloride and pillar cells resulting, in some cases, in lamellar fusion (Figure 3 E and F). Furthermore, an increase of mucus secreting cells, lifting of epithelia, edema, and even necrosis in small areas occurred. Most of these symptoms were observed in the methiocarb and the mixture treatment groups.



**Figure 3:** A: Control status of liver of juvenile trout with homogenous tissue with large hepatocytes. B: The hepatocytes contain a huge amount of glycogen. C: Occurring reactions in the liver were inter alia inflammations (IN), vascular dilation (VD) and focal necrosis (FN). D: Furthermore, reduced glycogen amount and increased intercellular (IC) spaces in liver samples were found. E: Control status of gills of juvenile trout with regularly shaped secondary lamellae. F: Reaction status of gills showing hypertrophy (HT) and hyperplasia (HP) of cells, lamellar fusion (LF) reactions as well as edema (OE). A, C, E and F: hematoxylin-eosin staining; B and D: alcian blue-PAS staining. G and H: Semi-quantitative analyses of liver (G) and gills (H). Category 1 represents an excellent health status, 3 a reaction status and 5 a destruction status. 2 and 4 are intermediary classes. No section was assigned to category 5. Statistical comparison showed significantly more reactions in liver and gill samples of methiocarb or methiocarb plus PS-MP exposed fish. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.0001$ ).

Lamellar fusion occurred on small parts of the lamellae of circa 20% in the lab control, the control, and the solvent control samples as well as 10% of the MP exposure. In the methiocarb and mixture groups it was considerably more common with 47% (methiocarb) and 42% (mixture). Edemas occurred only in 19% of the methiocarb group and 14% of the mixture exposed group. They were located at the inner side of the secondary lamellae.

Semi-quantitative analysis revealed a significantly worse condition of the two treatment groups containing methiocarb compared to the solvent control and fish exposed solely to PS-MP (Figure 3 H; DMSO/PS-MP:  $p = 0.4562$ , DMSO/methiocarb, DMSO/mixture, PS-MP/mixture:  $p < 0.0001$ , methiocarb/mixture:  $p = 0.7266$ ). Gill sections were classified in categories 1-4 of 5 categories in total. No difference was found between the control groups and the group containing solely PS-MP.

#### **4 Discussion**

In the present study, the effects of PS-MP and the pesticide methiocarb either applied alone or in their binary mixture were investigated in juvenile brown trout.

##### *4.1 General considerations concerning the conducted experiment*

The measured methiocarb concentrations corresponded to approximately half of the nominal concentration in the methiocarb and mixture groups at the beginning of the experiment and 24% (methiocarb group) and 31% (mixture group) at the end. Considering the standard deviations, however, there is no relevant difference in the methiocarb concentration of methiocarb and mixture treatment group at the end of the experiment. Methiocarb has a comparable low persistence in laboratory aerobic soil-water systems (ARENA *et al.* 2018). The degradation of methiocarb is pH-dependent and higher under alkaline conditions. The main metabolites are methiocarb phenol and methiocarb sulfoxide phenol. The dissipation half-life ( $DT_{50}$ ) of methiocarb in water at pH 7 is 24 days and 0.21 days at pH 9 (EFSA 2006). Thus, a degradation of methiocarb in this experiment was likely, but occurred to a greater extent as it could have been assumed in an environment with a pH of 7.3. During the experiment, beside the abiotic degradation, a metabolization by the fish may have contributed to the decreased methiocarb concentration after 96 h. In humans, mainly cytochrome p450 and flavin-containing monooxygenases in liver and kidney contribute to the metabolism of methiocarb (USMANI *et al.* 2004, FURNES AND SCHLENK 2005). For longer exposure to methiocarb, regular exchange of the water with freshly-prepared methiocarb solutions or a flow-through exposure is recommended.

#### 4.2 Do PS-MP affect juvenile brown trout?

In juvenile brown trout, none of the investigated parameters were affected by  $10^4$  polystyrene particles/L. In the past, MP were found to cause oxidative stress in fish (LU *et al.* 2016, PAUL-PONT *et al.* 2016, QIAO *et al.* 2019). In contrast to these results, other studies found either no effects (OLIVEIRA *et al.* 2013, LUÍS *et al.* 2015, FONTE *et al.* 2016) or effects in only some of the investigated endpoints for oxidative stress (AVIO *et al.* 2015, FERREIRA *et al.* 2016, DING *et al.* 2018, MAGNI *et al.* 2018). The oxidative defense system is complex and consists of enzymatic (e.g. SOD, catalase (CAT), glutathione reductase) and non-enzymatic compounds (LUSHCHAK 2016). In addition, the types of investigated polymers, their concentrations, their potential additives as well as the size of the used MP highly vary in the different studies. JEONG *et al.* (2016) analyzed the influence of the particle size on oxidative stress responses and showed that there is a clear connection to this parameter: smaller particles cause more oxidative stress. In general, however, the data are still far too limited and experimental designs of the studies are too variable to decide on whether or not MP cause oxidative stress and, in case of any influence, which pathways are affected.

To the best of our knowledge, the present study is the first that investigated potential proteotoxic effects of MP. In the tested concentration, no effect of PS-MP on the stress protein level (Hsp70) was found in brown trout after 96 h exposure.

Also, the activity of AChE and two investigated CbE was not altered after exposure to PS-MP. In the past several studies reported significant reductions about 20% of AChE activity in common goby (*Pomatoschistus microps*) after exposure to 184 µg/L polyethylene (PE; 1-5 µm) for 96 h (OLIVEIRA *et al.* 2013, LUÍS *et al.* 2015, FONTE *et al.* 2016). Under the same test conditions, FERREIRA *et al.* (2016) only found a reduction of AChE activity by 13% in common goby. Furthermore, a decrease of AChE activity in Amazonian discus fish *Symphysodon aequifasciatus* was observed after exposure to 200 µg/L fluorescent PE (70-88 µm) for 30 days (WEN *et al.* 2018). In red tilapia (*Oreochromis niloticus*), an even higher inhibition of AChE by 37.7% was found after exposure to PS nanoplastics (0.1 µm) in concentrations of circa  $1.8 \times 10^6$ ,  $1.8 \times 10^7$ ,  $1.8 \times 10^8$  particles/L for 14 days (DING *et al.* 2018). CHEN *et al.* (2017) did not find any neurotoxic effect of PS-MP (45 µm, 20 particles/mL) in zebrafish (*Danio rerio*) but reported a significant reduction of AChE activity by 40% after exposure to a high concentration of PS nanoplastics (50 nm,  $1.5 \times 10^{10}$  particles/mL). In general, the mode of action of how MP might cause neurotoxicity remains unclear. In addition to the type of polymer (including different additives), the particle size also seems to be of importance in this context, since neurotoxic effects were mainly found in studies using very small micro- or even nanoplastics. Furthermore, DING *et al.* (2018) reported accumulation of nanoplastics in the brain of red tilapia. These findings are supported by a study

of MATTSSON *et al.* (2017) who demonstrated that polystyrene nanoplastics are capable of penetrating the blood-brain barrier of Crucian carp (*Carassius carassius*). The plastic particles we used in the present study were  $< 50 \mu\text{m}$  with only a low number of particles  $< 1 \mu\text{m}$  which might explain the lack of influence on neurotoxicity.

In the present study, no alterations in the histopathological status of the liver and gills were found in fish exposed to PS-MP alone when compared to the solvent control group as well. Also, low-density PE (125-250  $\mu\text{m}$ ) caused no alterations in the liver of zebrafish after 3 weeks of exposure (RAINIERI *et al.* 2018). Furthermore, besides effects on the intestine LEI *et al.* (2018) did not find any alterations in gills, liver, and kidney of zebrafish exposed to polyamide (PA), polypropylene (PP), polyvinyl chloride (PVC), and PE (each  $\sim 70 \mu\text{m}$  in a concentration up to 10 mg/L) for 10 days. Moreover, in silver barb fry (*Barbodes gonionotus*) no histopathological reactions were caused by PVC (0.1-1000  $\mu\text{m}$ ; 0.2, 0.5 and 1.0 mg/L) fragments besides a slight thickening of the intestinal mucosal epithelium (ROMANO *et al.* 2018). In addition, LEI *et al.* (2018) did not find any effect of PS-MP (0.1, 1.0 and 5  $\mu\text{m}$  up to 10 mg/L) on tissue integrity of intestine, gills, kidney, and liver of zebrafish after 10 days of exposure. In contrast, LU *et al.* (2016) observed early inflammation responses as well as lipid droplets in the liver of zebrafish after exposure to 5  $\mu\text{m}$  polystyrene particles in a concentration of  $2.9 \times 10^4$  particles/L for three weeks. In Japanese medaka (*Oryzias latipes*) severe glycogen depletion and fatty vacuolization in the liver occurred, but no alterations were found in gonads after exposure to PE ( $< 0.5\text{mm}$ ) for 2 months (ROCHMAN *et al.* 2013, ROCHMAN *et al.* 2014). KARAMI *et al.* (2016) exposed African catfish (*Clarias gariepinus*) to low-density PE ( $< 60 \mu\text{m}$ ) for 96 h. They observed hyperplasia and sloughing and even necrosis in gills at a concentration of 50  $\mu\text{g/L}$  and even more severe reactions like desquamation of cells at a concentration of 500  $\mu\text{g/L}$ . In addition, the degree of tissue damage in the liver of the fish was increased after exposure to low-density PE in a concentration of 500  $\mu\text{g/L}$  (KARAMI *et al.* 2016). The sizes of the investigated MP are an important parameter since small MP or nanoplastic particles can be taken up by cells (BATEL *et al.* 2016, MATTSSON *et al.* 2017, DING *et al.* 2018). In general, there is no evidence for a uniform pattern under which conditions histopathological changes may occur after exposure to MP.

Reports of the environmental concentration of MP in surface waters of a size  $< 50 \mu\text{m}$  are rather scarce possibly due to difficulties with the sampling and detection methodology (DE SÁ *et al.* 2018, TRIEBSKORN *et al.* 2019). Nevertheless, reported results of MP indicate higher concentrations of smaller MP compared to larger ones (TRIEBSKORN *et al.* 2019). Measured MP concentrations in the environment varied between 0.5 and 3.1 particles/L ( $> 20 \mu\text{m}$ ) and 1000 and 9000 particles/L ( $> 4 \mu\text{m}$ ) (SU *et al.* 2018, TRIEBSKORN *et al.* 2019). In the present study, the concentration of PS particles was  $10^4$  and therefore higher than the environmental concentration. Our study does not

indicate a risk for brown trout at environmental concentrations. Nevertheless, to exclude potential negative effects of MP on brown trout other experiments with longer exposure time and other polymer types are necessary.

#### 4.3 Does methiocarb affect juvenile brown trout?

Three fish exposed to methiocarb as sole pollutant showed strong behavioral reactions after 24 h and had to be euthanized. After 96 h, all other fish exposed to methiocarb also exhibited behavioral abnormalities like slower swimming and reduced escape behavior. To the best of our knowledge, this is the first study that investigated the effects of methiocarb on brown trout. In the present study, weight of methiocarb-exposed fish was comparable to the control group. However, 96 h is a relatively short time to observe changes regarding this endpoint in brown trout. To our knowledge no one has analyzed the effect of methiocarb on stress proteins so far, and rarely proteotoxic effects of carbamate pesticides were studied in general. In the present study, methiocarb did not cause any alteration of Hsp70 level of juvenile brown trout. Samples of brown trout showed neither an increase of SOD nor an altered amount of LPO exposure to methiocarb. An increase of LPO and an alteration of reduced glutathione level was found in male Wistar rats fed with 2, 10, and 25 mg/kg methiocarb (OZDEN AND ALPERTUNGA 2010). OZDEN AND ALPERTUNGA (2010) found the highest malondialdehyde level in the brain and explained their finding by the comparably large amount of fatty acids in this organ. In another study, OZDEN *et al.* (2012) found also an increase of glutathione as well as of the activities of SOD, CAT, and glutathione peroxidase in male Wistar rats after administration of 25 mg/kg methiocarb.

The observed reactions of fish can be seen as a consequence of the AChE inhibition by methiocarb. Acetylcholine (ACh) accumulates in the synaptic cleft leading to a cholinergic crisis (ROSMAN *et al.* 2009). In the present study, methiocarb led to a reduction of the AChE activity by 59% in the tested juvenile brown trout. The mode of action of carbamate pesticides is based on carbamylation of AChE and, thereby, inhibition of its ability to hydrolyze acetylcholine (FUKUTO 1990). Therefore, it could have been expected that methiocarb reduces the activity of AChE also in brown trout. Comparable effects were observed by ESSAWY *et al.* (2008) in the land snail *Eobania vermiculata* in which AChE activity was reduced up to 69.3% by methiocarb. Carboxylesterases play an important role in pesticide detoxification (WHEELLOCK *et al.* 2005). SANCHEZ-HERNANDEZ *et al.* (2009) suggested that CbE might act as a biochemical barrier for organophosphate pesticides in *Lumbricus terrestris*. MAYMÓ *et al.* (2006) found that esterase activity is higher in western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) with increased resistance against methiocarb. To our knowledge, no studies about the effect of methiocarb on AChE and CbE activities in fish were performed up to date. However, in the present study, CbE as well as

AChE were inhibited by methiocarb, and no protective effect became obvious. This might possibly be related to the fact that the methiocarb concentration was rather high and all three enzymes were inhibited and the protective effect of CbE ceased.

After exposure to methiocarb, prominent histopathological alterations became evident in livers and gills of the exposed fish. ALTINOK *et al.* (2006) observed similar effects in gills of rainbow trout exposed to 3.75 and 7.5 mg/L methiocarb. After 96 h, symptoms like lamellar edema, lifting of epithelia, telangiectasis, increased cytoplasmic granularity, and lamellar fusion occurred. Effects were reversible in concentrations below 3.75 mg/L. In fish livers, ALTINOK *et al.* (2006) found necrosis. ALTINOK *et al.* (2006) assumed that the alterations are caused by ionic imbalance due to inhibition of AChE activity. In a follow up study, ALTINOK AND CAPKIN (2007) found no histopathological alterations in liver, kidney, brain, and spleen of rainbow trout after exposure to 2.5 or 3.75 mg/L methiocarb for 21 days. However, in gills of rainbow trout lamellar lifting occurred when fish were exposed to 3.75 mg/L methiocarb for 21 days (ALTINOK AND CAPKIN 2007). Brown trout seem to be more sensitive to methiocarb than rainbow trout as indicated by the more severe effects in the present study. This was also shown in the past for other environmental stressors (SCHMIDT-POSTHAUS *et al.* 2001).

The tested methiocarb concentration (1 mg/L) was considerably higher than the average surface water concentration of 6-40 ng/L in an EU wide monitoring campaign (LOOS *et al.* 2018). The study was designed to investigate acute effects of methiocarb and a potential modulation of these effects by PS-MP. Nevertheless, the strong acute effects of methiocarb in brown trout elucidate the need for experiments in which brown trout are exposed to methiocarb at environmentally relevant concentrations for a longer exposure time. Such experiments would allow to assess the current risk of methiocarb exposure for brown trout in the environment.

#### *4.4 Do PS-MP modulate the effects of methiocarb?*

When considering all investigated endpoints, fish exposed to the mixture of methiocarb, and PS-MP showed the same reactions as fish exposed to methiocarb only. Weight as well as the stress protein level and the level of oxidative stress remained unchanged. However, the activity of AChE and CbE was significantly reduced in the mixture to almost the same extent as caused by methiocarb alone. Furthermore, the observed histopathological alterations in liver and gills in fish of the mixture treatment were comparable to those found in fish exposed only to the pesticide. Thus, the toxicity of methiocarb on brown trout was not modulated by PS-MP. The chemical analytics and the observed effects indicate that no relevant sorption of methiocarb to PS-MP occurred. It is possible that a modulation of the toxicity of methiocarb by PS-MP in the present study was hidden by the comparable strong effect caused by the relatively high

methiocarb concentration. To the best of our knowledge, the interaction of carbamate pesticides and MP has not been investigated before. In their review, de Sá *et al.* (2018) identified only one out of 59 studies where no interaction between MP and another tested contaminant was found. FERREIRA *et al.* (2016) reported that the effects of gold nanoparticles were not modulated by PE particles (1-5 µm). Of course, DE SÁ *et al.* (2018) could not account in their meta-analysis for the probable bias against publishing negative results. Multiple studies show that effects of different pollutants were decreased in combination with MP. For example, PS-MP alleviated the effects of 17 α-ethinylestradiol (EE2) on locomotion in zebrafish (CHEN *et al.* 2017). Similar results were found after exposure of zebrafish larvae to EE2, phenanthrene and a mixture of both with PVC particles. In the presence of PVC particles, the expression of cytochrome P4501A and vitellogenin was reduced up to 48% for EE2 and by 33% for phenanthrene (SLEIGHT *et al.* 2017). In general, a reduced toxicity of co-contaminants in the presence of MP might be explained by a decreased bioavailability of the chemicals due to sorption to the plastic particles. In the present study, chemical analyses revealed that the concentration of methiocarb was higher in the mixture treatment than in the groups exposed to methiocarb alone after 97 h. Thus, it is probable that methiocarb did not sorb in considerable amounts to the plastic microparticles. In contrast to reports on a reduction of chemical-induced effects by MP, other studies conducted with MP in combination with chemicals found an intensification of such effects. For example, in common carp (*Cyprinus carpio*), MP increased the effects of paraquat on biochemical blood parameters. Thereby, higher concentrations of MP increased the toxicity (NEMATDOOST HAGHI AND BANAEI 2017). Moreover, FONTE *et al.* (2016) found a significant interaction between PE-MP and cefalexin. In the mixture of both, the effect of cefalexin on the predatory performance of common goby was increased at 20 °C, but reduced at 25 °C. In the present study, the toxicity of methiocarb was not enhanced by MP. Compared to the uptake pathway via the water, PS-MP seemed to have a negligible effect on the uptake of methiocarb in juvenile brown trout.

## 5 Conclusion

Based on the results of our study, we conclude that methiocarb heavily impairs the health of brown trout, whereas the studied PS-MP in a concentration of 10<sup>4</sup> particles/L do not. It can also be excluded that the studied PS-MP modulate methiocarb-induced effects in brown trout in the tested concentrations. In general, literature provides a diverse and inconsistent image with respect to the capacity of MP to modulate the toxicity of environmental chemicals. Although our study does not speak for an environmental risk related to the investigated polystyrene particles and their interaction with the pesticide methiocarb, this study provides only a very small piece of knowledge for a defined type and size class of plastics and a single pesticide and emphasizes the need of further research in this field.

### **Supplementary information**

Supplementary information accompanies this paper at  
<https://doi.org/10.1186/s12302-020-00327-4>.

### **Authors' contributions**

HS wrote the manuscript except for "Chemical analysis" section, which was written by SH. She contributed to the design of the experiment, conducted the experiment, analyzed (or supervised analyses) of stress-proteins and oxidative stress. SH performed the chemical analysis and revised the whole manuscript. SK and TPK revised the entire manuscript. FR analyzed the level of lipid peroxidation as well as the acetylcholinesterase and carboxylesterase activity. KR performed the histopathological analysis and parts of the analysis of the SOD activity; ASR provided the microplastic particles and revised the whole manuscript, HRK and RT designed the experiment, contributed to the interpretation of data and revised the entire manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Funding**

The experiment was conducted within the joint project MiWa (Microplastics in the water cycle—sampling, sample preparation, analytics, occurrence, removal, and assessment) founded by the German Federal Ministry of Education and Research (Support Code: 02WRS1378).

### **Acknowledgements**

We are deeply grateful to Prof. Dr. Martin Jekel for the initiation and coordination of the MiWa project. We thank Christoph Fahrenson (ZELMI, TU Berlin) for electron microscopic analyses. For proofreading of the manuscript we thank Sarai Rosenberg and Dr. Sophie Schmieg. Furthermore, the authors wish to thank Dr. Katharina Peschke, Michael Ziegler, Stefanie Jacob, Sabrina Wilhelm, Dr. Simon Schwarz, Dr. Carla Lorenz, Dr. Paul Thellmann, Dr. Andreas Dieterich and Kathrin Leinmüller for discussion, technical assistance and assistance in the lab.

### **References**

- ALTINOK I. AND CAPKIN E. (2007). "Histopathology of Rainbow Trout Exposed to Sublethal Concentrations of Methiocarb or Endosulfan." *Toxicologic Pathology* **35**(3): 405-410.
- ALTINOK I., CAPKIN E., KARAHAN S. AND BORAN M. (2006). "Effects of water quality and fish size on toxicity of methiocarb, a carbamate pesticide, to rainbow trout." *Environmental Toxicology and Pharmacology* **22**(1): 20-26.
- ARENA M., AUTERI D., BARMAZ S., BRANCATO A., BROCCA D., BURA L., CABRERA L. C., CHIUSOLO A., CIVITELLA C., MARQUES D. C., CRIVELLENTI F., CTVERACKOVA L., LENTDECKER C. D., EGSMOSE M., ERDOS Z., FAIT G., FERREIRA L., GRECO L., IPPOLITO A., ISTACE F., JARRAH S., KARDASSI D., LEUSCHNER R., LOSTIA A., LYTHGO C., MAGRANS J. O., MEDINA P., MINEO D., MIRON I., MOLNAR T., PADOVANI L., MORTE J. M. P., PEDERSEN R., REICH H., SACCHI A., SANTOS M., SERAFIMOVA R., SHARP R., STANEK A., STREISSL F., STURMA J., SZENTES C., TARAZONA J., TERRON A., THEOBALD A., VAGENENDE B., DIJK J.

- V. AND VILLAMAR-BOUZA L. (2018). "Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance methiocarb." EFSA Journal **16**(10).
- AVIO C. G., GORBI S., MILAN M., BENEDETTI M., FATTORINI D., D'ERRICO G., PAULETTO M., BARGELLONI L. AND REGOLI F. (2015). "Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels." Environmental Pollution **198**: 211-222.
- BAKIR A., O'CONNOR I. A., ROWLAND S. J., HENDRIKS A. J. AND THOMPSON R. C. (2016). "Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life." Environmental Pollution **219**: 56-65.
- BATEL A., LINTI F., SCHERER M., ERDINGER L. AND BRAUNBECK T. (2016). "Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants." Environmental Toxicology and Chemistry **35**(7): 1656-1666.
- BECKINGHAM B. AND GHOSH U. (2017). "Differential bioavailability of polychlorinated biphenyls associated with environmental particles: Microplastic in comparison to wood, coal and biochar." Environmental Pollution **220**: 150-158.
- BERGMANN M., WIRZBERGER V., KRUMPEN T., LORENZ C., PRIMPKE S., TEKMAN M. B. AND GERDTS G. (2017). "High quantities of microplastic in Arctic deep-sea sediments from the HAUSGARTEN observatory." Environmental Science & Technology **51**(19): 11000-11010.
- BRADFORD M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**(1): 248-254.
- BUNDSCHUH M., GOEDKOOP W. AND KREUGER J. (2014). "Evaluation of pesticide monitoring strategies in agricultural streams based on the toxic-unit concept — Experiences from long-term measurements." Science of The Total Environment **484**: 84-91.
- CHEN Q., GUNDLACH M., YANG S., JIANG J., VELKI M., YIN D. AND HOLLERT H. (2017). "Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity." Science of The Total Environment **584-585**: 1022-1031.
- DE SÁ L. C., OLIVEIRA M., RIBEIRO F., ROCHA T. L. AND FUTTER M. N. (2018). "Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future?" Science of The Total Environment **645**: 1029-1039.
- DIETERICH A., TROCHINSKI S., SCHWARZ S., DI LELLIS M. A., HENNEBERG A., FISCHBACH U., LUDWIG M., GÄRTNER U., TRIEBSKORN R. AND KÖHLER H.-R. (2015). "Hsp70 and lipid peroxide levels following heat stress in *Xeropicta derbentina* (Krynicky 1836) (Gastropoda, Pulmonata) with regard to different colour morphs." Cell Stress and Chaperones **20**(1): 159-168.
- DING J., ZHANG S., RAZANAJATOVO R. M., ZOU H. AND ZHU W. (2018). "Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Environmental Pollution **238**: 1-9.
- DRIS R., IMHOF H., SANCHEZ W., GASPERI J., GALGANI F., TASSIN B. AND LAFORSCH C. (2015). "Beyond the ocean: contamination of freshwater ecosystems with (micro-) plastic particles." Environmental Chemistry **12**(5): 539-550.
- EFSA (2006). Conclusion on the peer review of methiocarb. Scientific Report EFSA. **79**: 1-82.
- EITZEN L., PAUL S., BRAUN U., ALTMANN K., JEKEL M. AND RUHL A. S. (2019). "The challenge in preparing particle suspensions for aquatic microplastic research." Environmental Research **168**: 490-495.
- ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. AND FEATHERSTONE R. M. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochemical Pharmacology **7**(2): 88-95.

EPA. "Chemistry Dashboard: Methiocarb." <https://comptox.epa.gov/dashboard/DTXSID3032626> accessed at 26.02.2020

EPA (1994). R.E.D. facts methiocarb. E. P. Agency. United States.

ESSAWY A. E., ABDELMEGUEID N. E., RADWAN M. A., HAMED S. S. AND HEGAZY A. E. (2008). "Neuropathological effect of carbamate molluscicides on the land snail, *Eobania vermiculata*." Cell Biology and Toxicology **25**(3): 275.

EU (2006). "Council Directive 2006/88/EC." Official Journal of the European Union **L 328**: 14–56.

EUROPEAN COMMISSION (2014). "Commission implementing regulation (EU) No 187/2014 amending implementing regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance methiocarb." Official Journal of the European Union **L 57**: 24-26.

EUROPEAN COMMISSION (2015). "Development of the first Watch List under the Environmental Quality Standards Directive."

EUROPEAN COMMISSION (2019a). "Commission implementing regulation (EU) 2019/707 " Official Journal of the European Union **L 120**: 16-19.

EUROPEAN COMMISSION (2019b). "Commission implementing regulation (EU) 2019/1606." Official Journal of the European Union **L 250**: 53-55.

FERREIRA P., FONTE E., SOARES M. E., CARVALHO F. AND GUILHERMINO L. (2016). "Effects of multi-stressors on juveniles of the marine fish *Pomatoschistus microps*: Gold nanoparticles, microplastics and temperature." Aquatic Toxicology **170**: 89-103.

FONTE E., FERREIRA P. AND GUILHERMINO L. (2016). "Temperature rise and microplastics interact with the toxicity of the antibiotic cefalexin to juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Post-exposure predatory behaviour, acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation." Aquatic Toxicology **180**: 173-185.

FUKUTO T. R. (1990). "Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides." Environmental Health Perspectives **87**: 245-254.

FURNES B. AND SCHLENK D. (2005). "Extrahepatic metabolism of carbamate and organophosphate thioether compounds by the flavin-containing monooxygenase and cytochrome p450 systems " Drug Metabolism and Disposition **33**(2): 214.

GUILHERMINO L., VIEIRA L. R., RIBEIRO D., TAVARES A. S., CARDOSO V., ALVES A. AND ALMEIDA J. M. (2018). "Uptake and effects of the antimicrobial florfenicol, microplastics and their mixtures on freshwater exotic invasive bivalve *Corbicula fluminea*." Science of The Total Environment **622-623**: 1131-1142.

HERMES-LIMA M., WILLMORE W. G. AND STOREY K. B. (1995). "Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation." Free Radical Biology and Medicine **19**(3): 271-280.

HORTON A. A., WALTON A., SPURGEON D. J., LAHIVE E. AND SVENDSEN C. (2017). "Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities." Science of The Total Environment **586**: 127-141.

ILO (2012). "International Chemical Safety Cards (ICSC): Methiocarb." ICSC: 1766 [http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_version=2&p\\_card\\_id=1766](http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_version=2&p_card_id=1766). accessed at 11.12.2019

JEONG C.-B., WON E.-J., KANG H.-M., LEE M.-C., HWANG D.-S., HWANG U.-K., ZHOU B., SOUSSI S., LEE S.-J. AND LEE J.-S. (2016). "Microplastic size-dependent toxicity, oxidative stress induction, and p-JNK and p-p38 activation in the monogonont rotifer (*Brachionus koreanus*)." Environmental Science & Technology **50**(16): 8849-8857.

- JOHNSON W. W. AND FINLEY M. T. (1980). Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates: summaries of toxicity tests conducted at Columbia National Fisheries Research Laboratory, 1965-78. Resource Publication: 106.
- KARAMI A., ROMANO N., GALLOWAY T. AND HAMZAH H. (2016). "Virgin microplastics cause toxicity and modulate the impacts of phenanthrene on biomarker responses in African catfish (*Clarias gariepinus*)."  
Environmental Research **151**: 58-70.
- KLEINTEICH J., SEIDENSTICKER S., MARGGRANDER N. AND ZARFL C. (2018). "Microplastics reduce short-term effects of environmental contaminants. Part II: Polyethylene particles decrease the effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on microorganisms." International journal of environmental research and public health **15**(2): 287.
- KÖCK-SCHULMEYER M., GINEBRED A., POSTIGO C., GARRIDO T., FRAILE J., LÓPEZ DE ALDA M. AND BARCELÓ D. (2014). "Four-year advanced monitoring program of polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE-Spain)."  
Science of The Total Environment **470-471**: 1087-1098.
- KOELMANS A. A., BAKIR A., BURTON G. A. AND JANSSEN C. R. (2016). "Microplastic as a vector for chemicals in the aquatic environment: Critical review and model-supported reinterpretation of empirical studies." Environmental Science & Technology **50**(7): 3315-3326.
- LEI L., WU S., LU S., LIU M., SONG Y., FU Z., SHI H., RALEY-SUSMAN K. M. AND HE D. (2018). "Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*." Science of The Total Environment **619-620**: 1-8.
- LITHNER D., DAMBERG J., DAVE G. AND LARSSON Å. (2009). "Leachates from plastic consumer products – Screening for toxicity with *Daphnia magna*." Chemosphere **74**(9): 1195-1200.
- LOOS R., MARINOV D., SANSEVERINO I., NAPIERSKA D. AND LETTIERI T. (2018). Review of the 1st watch list under the Water Framework Directive and recommendations for the 2nd Watch List. Luxembourg, Publications Office of the European Union.
- LU Y., ZHANG Y., DENG Y., JIANG W., ZHAO Y., GENG J., DING L. AND REN H. (2016). "Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (*Danio rerio*) and Toxic Effects in Liver." Environmental Science & Technology **50**(7): 4054-4060.
- LÚIS L. G., FERREIRA P., FONTE E., OLIVEIRA M. AND GUILHERMINO L. (2015). "Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium(VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations." Aquatic Toxicology **164**: 163-174.
- LUSHCHAK V. I. (2016). "Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach." Fish Physiology and Biochemistry **42**(2): 711-747.
- MAGNI S., GAGNÉ F., ANDRÉ C., DELLA TORRE C., AUCLAIR J., HANANA H., PARENTI C. C., BONASORO F. AND BINELLI A. (2018). "Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia)." Science of The Total Environment **631-632**: 778-788.
- MARKWELL M. A. K., HAAS S. M., BIEBER L. L. AND TOLBERT N. E. (1978). "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples." Analytical Biochemistry **87**(1): 206-210.
- MATTSSON K., JOHNSON E. V., MALMENDAL A., LINSE S., HANSSON L.-A. AND CEDERVALL T. (2017). "Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain." Scientific Reports **7**(1): 11452.
- MAYMÓ A. C., CERVERA A., DOLORES GARCERÁ M., BIELZA P. AND MARTÍNEZ-PARDO R. (2006). "Relationship between esterase activity and acrinathrin and methiocarb resistance in field populations of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*." Pest Management Science **62**(12): 1129-1137.
- MOERMOND C. T. A., KASE R., KORKARIC M. AND ÅGERSTRAND M. (2016). "CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data." Environmental Toxicology and Chemistry **35**(5): 1297-1309.

MONSERRAT J. M., GERACITANO L. A., PINHO G. L. L., VINAGRE T. M., FALEIROS M., ALCIATI J. C. AND BIANCHINI A. (2003). "Determination of Lipid Peroxides in Invertebrates Tissues Using the Fe(III) Xylenol Orange Complex Formation." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **45**(2): 177-183.

NEMATDOOST HAGHI B. AND BANAEE M. (2017). "Effects of micro-plastic particles on paraquat toxicity to common carp (*Cyprinus carpio*): biochemical changes." International Journal of Environmental Science and Technology **14**(3): 521-530.

OLIVEIRA M., RIBEIRO A., HYLLAND K. AND GUILHERMINO L. (2013). "Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae)." Ecological Indicators **34**: 641-647.

OZDEN S. AND ALPERTUNGA B. (2010). "Effects of methiocarb on lipid peroxidation and glutathione level in rat tissues." Drug and Chemical Toxicology **33**(1): 50-54.

OZDEN S., CATALGOL B., GEZGINCI-OKTAYOGLU S., KARATUG A., BOLKENT S. AND ALPERTUNGA B. (2012). "Acute effects of methiocarb on oxidative damage and the protective effects of vitamin E and taurine in the liver and kidney of Wistar rats." Toxicology and Industrial Health **29**(1): 60-71.

PAUL-PONT I., LACROIX C., GONZÁLEZ FERNÁNDEZ C., HÉGARET H., LAMBERT C., LE GOÏC N., FRÈRE L., CASSONE A.-L., SUSSARELLU R., FABIoux C., GUYOMARCH J., ALBENTOSA M., HUVET A. AND SOUDANT P. (2016). "Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: Toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation." Environmental Pollution **216**: 724-737.

PESTICIDE ACTION NETWORK N. A. (2000-2019). "PAN Pesticide Database." <http://www.pesticideinfo.org>. accessed at 1.9.2019

QIAO R., SHENG C., LU Y., ZHANG Y., REN H. AND LEMOS B. (2019). "Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish." Science of The Total Environment **662**: 246-253.

RAINIERI S., CONLLEDO N., LARSEN B. K., GRANBY K. AND BARRANCO A. (2018). "Combined effects of microplastics and chemical contaminants on the organ toxicity of zebrafish (*Danio rerio*)." Environmental Research **162**: 135-143.

RAULT M., COLLANGE B., MAZZIA C. AND CAPOWIEZ Y. (2008). "Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion." Soil Biology and Biochemistry **40**(12): 3086-3091.

REHSE S., KLOAS W. AND ZARFL C. (2018). "Microplastics reduce short-term effects of environmental contaminants. Part I: Effects of bisphenol A on freshwater zooplankton are lower in presence of polyamide particles." International journal of environmental research and public health **15**(2): 280.

ROCHMAN C. M., HOH E., KUROBE T. AND TEH S. J. (2013). "Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress." Scientific Reports **3**: 3263.

ROCHMAN C. M., KUROBE T., FLORES I. AND TEH S. J. (2014). "Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment." Science of The Total Environment **493**: 656-661.

ROMANO N., ASHIKIN M., TEH J. C., SYUKRI F. AND KARAMI A. (2018). "Effects of pristine polyvinyl chloride fragments on whole body histology and protease activity in silver barb *Barbodes gonionotus* fry." Environmental Pollution **237**: 1106-1111.

ROSMAN Y., MAKAROVSKY I., BENTUR Y., SHROT S., DUSHNISTKY T. AND KRIVROY A. (2009). "Carbamate poisoning: treatment recommendations in the setting of a mass casualties event." The American Journal of Emergency Medicine **27**(9): 1117-1124.

SANCHEZ-HERNANDEZ J. C., MAZZIA C., CAPOWIEZ Y. AND RAULT M. (2009). "Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **150**(4): 503-511.

- SCHIAVO S., OLIVIERO M., ROMANO V. AND MANZO S. (2018). "Ecotoxicological assessment of virgin plastic pellet leachates in freshwater matrices." Journal of Environmental Accounting and Management **6**(4): 345-353.
- SCHMIDT-POSTHAUS H., BERNET D., WAHLI T. AND BURKHARDT-HOLM P. (2001). "Morphological organ alterations and infectious diseases in brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to polluted river water." Diseases of Aquatic Organisms **44**(3): 161-170.
- SLEIGHT V. A., BAKIR A., THOMPSON R. C. AND HENRY T. B. (2017). "Assessment of microplastic-sorbed contaminant bioavailability through analysis of biomarker gene expression in larval zebrafish." Marine Pollution Bulletin **116**(1): 291-297.
- SMITH R., MIDDLEBROOK R., TURNER R., HUGGINS R., VARDY S. AND WARNE M. (2012). "Large-scale pesticide monitoring across Great Barrier Reef catchments – Paddock to Reef Integrated Monitoring, Modelling and Reporting Program." Marine Pollution Bulletin **65**(4): 117-127.
- SU L., CAI H., KOLANDHASAMY P., WU C., ROCHMAN C. M. AND SHI H. (2018). "Using the Asian clam as an indicator of microplastic pollution in freshwater ecosystems." Environmental Pollution **234**: 347-355.
- TOURINHO P. S., KOČÍ V., LOUREIRO S. AND VAN GESTEL C. A. M. (2019). "Partitioning of chemical contaminants to microplastics: Sorption mechanisms, environmental distribution and effects on toxicity and bioaccumulation." Environmental Pollution **252**: 1246-1256.
- TRIEBSKORN R., BRAUNBECK T., GRUMMT T., HANSLIK L., HUPPERTSBERG S., JEKEL M., KNEPPER T. P., KRAIS S., MÜLLER Y. K., PITTROFF M., RUHL A. S., SCHMIEG H., SCHÜR C., STROBEL C., WAGNER M., ZUMBÜLTE N. AND KÖHLER H.-R. (2019). "Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review." TrAC Trends in Analytical Chemistry **110**: 375-392.
- TRIEBSKORN R., TELCEAN I., CASPER H., FARKAS A., SANDU C., STAN G., COLĂRESCU O., DORI T. AND KÖHLER H.-R. (2008). "Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: Metal accumulation and histopathology in fish." Environmental Monitoring and Assessment **141**(1): 177-188.
- USMANI K. A., KAROLY E. D., HODGSON E. AND ROSE R. L. (2004). "In vitro sulfoxidation of thioether compounds by human cytochrome p459 and flavin-containing monooxygenase isoforms with particular reference to the CYP2C subfamily." Drug Metabolism and Disposition **32**(3): 333.
- VAN POMEREN M., BRUN N. R., PEIJNENBURG W. J. G. M. AND VIJVER M. G. (2017). "Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages." Aquatic Toxicology **190**: 40-45.
- VON MOOS N., BURKHARDT-HOLM P. AND KÖHLER A. (2012). "Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel *Mytilus edulis* L. after an Experimental Exposure." Environmental Science & Technology **46**(20): 11327-11335.
- WANG F., WONG C. S., CHEN D., LU X., WANG F. AND ZENG E. Y. (2018). "Interaction of toxic chemicals with microplastics: A critical review." Water Research **139**: 208-219.
- WEN B., ZHANG N., JIN S.-R., CHEN Z.-Z., GAO J.-Z., LIU Y., LIU H.-P. AND XU Z. (2018). "Microplastics have a more profound impact than elevated temperatures on the predatory performance, digestion and energy metabolism of an Amazonian cichlid." Aquatic Toxicology **195**: 67-76.
- WHEELOCK C. E., SHAN G. AND OTTEA J. (2005). "Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides." Journal of Pesticide Science **30**(2): 75-83.
- WORTHING C. R., HANCE R. J. AND BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (1991). The Pesticide manual a world compendium, Farnham, Surrey, UK British Crop Protection Council.

# Kapitel III: Interacting Effects of Polystyrene Microplastics and the Antidepressant Amitriptyline on Early Life Stages of Brown Trout (*Salmo trutta f. fario*)

HANNAH SCHMIEG<sup>a</sup>, JANNE K.Y. BURMESTER<sup>a</sup>, STEFANIE KRAIS<sup>a</sup>, AKI S. RUHL<sup>b,c</sup>, SELINA TISLER<sup>d</sup>, CHRISTIAN ZWIENER<sup>d</sup>, HEINZ-R. KÖHLER<sup>a</sup> and RITA TRIEBSKORN<sup>a, e</sup>

<sup>a</sup> Animal Physiological Ecology, Institute of Evolution and Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, 72076 Tübingen, Germany

<sup>b</sup> Chair of Water Quality Control, Technische Universität Berlin, Sekr. KF 4, Str. des 17. Juni 135, 10623 Berlin, Germany

<sup>c</sup> German Environment Agency (UBA), Section II 3.1 (National and International Development of Drinking Water Quality and Resource Protection), Schichauweg 58, 12307 Berlin, Germany

<sup>d</sup> Environmental Analytical Chemistry, Center for Applied Geoscience, University of Tübingen, Schnarrenbergstr.94-96, 72076 Tübingen, Germany

<sup>e</sup> Steinbeis Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, 72108 Rottenburg, Germany

Published in: Water (2020) **12** (9): 2361, <https://doi.org/10.3390/w12092361>

## Abstract

Whether microplastics themselves or their interactions with chemicals influence the health and development of aquatic organisms has become a matter of scientific discussion. In aquatic environments, several groups of chemicals are abundant in parallel to microplastics. The tricyclic antidepressant amitriptyline is frequently prescribed, and residues of it are regularly found in surface waters. In the present study, the influence of irregularly shaped polystyrene microplastics (< 50 µm), amitriptyline, and their mixture on early life-stages of brown trout were investigated. In a first experiment, the impacts of 100, 10<sup>4</sup>, and 10<sup>5</sup> particles/L were studied from the fertilization of eggs until one month after yolk-sac consumption. In a second experiment, eggs were exposed in eyed ova stages to 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> particles/L, to amitriptyline (pulse-spiked, average 48 ± 33 µg/L) or to two mixtures for two months. Microplastics alone did neither influence the development of fish nor the oxidative stress level or the acetylcholinesterase activity. Solely, a slight effect on the resting behavior of fry exposed to 10<sup>6</sup> particles/L was observed. Amitriptyline exposure exerted a significant effect on development, caused elevated acetylcholinesterase activity and inhibition of two carboxylesterases. Most obvious was the severely altered swimming and resting behavior. However, effects of amitriptyline were not modulated by microplastics.

## Keywords

Microplastics, Amitriptyline, Brown trout, Development, Behavior, Oxidative stress, Acetylcholinesterase

## 1 Introduction

Microplastic particles (MP) are detected worldwide from densely populated and rural areas to remote regions (WANG *et al.* 2017, PEEKEN *et al.* 2018, PIEHL *et al.* 2018, ALLEN *et al.* 2019). The presence of MP has globally been reported for sediment, surface water and even for air samples (CLAESSENS *et al.* 2011, DRIS *et al.* 2017, LESLIE *et al.* 2017, VIANELLO *et al.* 2019). Representing the recent state of knowledge in freshwater systems, MP concentrations range from 0.00012 particles/L up to 2,867 particles/L (according to LI *et al.* 2020a). However, the potential risk for organisms and ecosystems caused by MP is still a matter of discussion. MP were shown to be ingested and egested by fish (MAZURAS *et al.* 2015, BATEL *et al.* 2016, LI *et al.* 2020b) and small particles (mostly nanoplastics) can even transfer into tissues (MATSSON *et al.* 2017, VAN POMEREN *et al.* 2017, DING *et al.* 2018, TRIEBSKORN *et al.* 2019). Microplastic particles can injure organisms mechanically resulting in inflammation and other histopathological effects in contact epithelia (KARAMI *et al.* 2016, LU *et al.* 2016, LEI *et al.* 2018), disturb the energy metabolism (LU *et al.* 2016, WEN *et al.* 2018), and induce oxidative stress (LU *et al.* 2016, DING *et al.* 2018, LEI *et al.* 2018). Early life stages of fish are considered as very sensitive for pollutants (MOHAMMED 2013). In this context, high concentrations of MP have been shown to reduce and delay hatching as well as negatively influence growth and heart rate of marine medaka (*Oryzias melastigma*; LI *et al.* 2020b). Moreover, MALAFAIA *et al.* (2020) reported that exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to polyethylene (PE) MP reduced the hatching time and survival rates and led to morphological changes. In contrast, LEMOINE *et al.* (2018) found no effects of PE-MP on hatching, mortality, and growth rates of zebrafish. However, zebrafish exposed to MP exhibit transcriptomic changes as, for example, downregulation of genes involved in the neural development. MAZURAS *et al.* (2015) observed that a diet that incorporated about 200 PE microbeads per day caused a slightly higher mortality rate in sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*). Apart from that MP had only limited effects on the development of sea bass larvae in the experiment (MAZURAS *et al.* 2015).

The evaluation of the risk of MP for aquatic organisms in general is complex since different polymer types with manifold additives in various sizes and shapes are present in the environment (WAGNER *et al.* 2014). With our study we therefore solely address a selected aspect of MP aquatic ecotoxicology.

The topic is even more complex since not only MP themselves, but also their interaction with chemicals have to be regarded. For example, polymerization solvents, residual monomers, plasticizers, or other additives can leak from the particles and affect MP-exposed organisms (LITHNER *et al.* 2009, SCHIAVO *et al.* 2018). In addition, MP has the potential to adsorb or absorb organic pollutants (reviewed by DE SÁ *et al.* 2018 and WANG *et al.* 2018). The sorption can modulate the toxicity of the pollutants in different ways: If the particles are ingested and excreted together with an adherent pollutant this would be without consequences for the organism. However, the bioavailability of otherwise free pollutants may be reduced due to sorption what can lead to less negative effects in organisms (CHEN *et al.* 2017, REHSE *et al.* 2018, LI *et al.* 2020b). On the other hand, pollutants ingested together with MP can desorb in the digestive track, for example due to different pH conditions. In such cases, MP act as a vector and adverse effects can be enhanced by the presence of MP (OLIVEIRA *et al.* 2013, NEMATDOOST HAGHI & BANAEI 2017, GUILHERMINO *et al.* 2018). BATEL *et al.* (2016) showed that MP and associated benzo[a]pyrene can also be transported along an artificial food web. Nevertheless, the relevance of MP as vectors for organic pollutants in comparison to other exposure pathways in the environment remains a matter of discussion (BAKIR *et al.* 2016, KOELMANS *et al.* 2016, BECKINGHAM & GHOSH 2017). Since the concentrations of persistent organic pollutants in continental environments are expected to be higher than in marine ecosystems, sorption of hydrophobic organic pollutants to MP might be especially important for freshwater ecosystems (DRIS *et al.* 2015).

One group of chemicals commonly found in aquatic environments are pharmaceuticals (FENT *et al.* 2006, BAKER & KASPRZYK-HORDERN 2013). Residues of these or their metabolites enter surface waters mainly via wastewater treatment plants (SANDERSON *et al.* 2003, FENT *et al.* 2006). Non-selective monoamine reuptake inhibitors more known as tricyclic antidepressants are one of the oldest groups of pharmaceuticals to treat depression. Amitriptyline is the most prescribed drug of this group (BREYER-PFAFF 2004, CHOCKALINGAM *et al.* 2019, SCHWABE *et al.* 2019). Beside depression, amitriptyline is also used for migraine prophylaxis and to treat chronic pain (SCHWABE *et al.* 2019). In comparison to other antidepressants, its mode of action is rather unspecific: In addition to the inhibition of the reuptake of the neurotransmitters serotonin and noradrenaline, amitriptyline acts as muscarinic acetylcholine receptor antagonist (SNYDER & YAMAMURA 1977). Furthermore, it has been shown to bind to histamine receptors (NGUYEN *et al.* 2001) as well as to neurotrophic tyrosine kinase A/B receptors resulting in an upregulation of acetyl transferase and an influence on cell differentiation (JANG *et al.* 2009). Amitriptyline is mainly metabolized in the liver by cytochrome P450 (RUDORFER & POTTER 1999). An important metabolite is nortriptyline which is also in use as an antidepressant itself (RUDORFER & POTTER 1999, BREYER-PFAFF 2004, MA *et al.* 2018). Amitriptyline has been found in surface waters around the world (BAKER & KASPRZYK-

HORDERN 2013, FERREY *et al.* 2015, MA *et al.* 2018). The highest concentration of 71.0 ng/L was reported by BAKER & KASPRZYK-HORDERN (2013) for a large river in the UK. Mean surface water concentrations are normally in the low nanogram per liter range up to 22 ng/L (LAJEUNESSE *et al.* 2008, THOMAS *et al.* 2014, FERREY *et al.* 2015). TOGOLA & BUDZINSKI (2008) reported that in France residues of amitriptyline (1.4 ng/L) were even found in drinking water. Pharmaceuticals are designed to be bioactive at low concentrations, and it can be, therefore, not excluded that they also may affect non-target organisms at low environmental concentrations (SANDERSON *et al.* 2003, FENT *et al.* 2006).

DEMIN *et al.* (2017) showed that amitriptyline increases the serotonin-triggered neurotransmission in the brain of adult zebrafish in a dose-dependent way, with significantly higher 5-hydroxyindoleacetic (5-HIAA)/serotonin ratios in fish exposed to 5 and 10 mg/L amitriptyline for a few hours. No effects on the noradrenaline level were shown in this study. In contrast, MESHALKINA *et al.* (2018) found a significant reduction of the 5-HIAA/serotonin ratio and an increased dopamine and noradrenaline level in the brain of adult zebrafish exposed for two weeks to 10 and 50 µg/L amitriptyline. Moreover, the antidepressant was shown to alter the immune response in *in vitro* studies with primary macrophages of common carp (*Cyprinus carpio*) as well as *in vivo* studies with zebrafish (YANG *et al.* 2014, QIU *et al.* 2017) and to affect the oxidative stress level of both fish species (YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2017, SEHONOVA *et al.* 2019b). Furthermore, amitriptyline was found to affect the swimming behavior of zebrafish, by reducing for example the swimming activity as well as the covered distance, and high concentrations of the antidepressant even led to side or vertical swimming behavior (DEMIN *et al.* 2017, MESHALKINA *et al.* 2018, HUANG *et al.* 2019, SEHONOVA *et al.* 2019a). In addition, exposure of common carp and zebrafish to the antidepressant stimulated hatching and caused retarded development and malformations in common carp as well as reduced body length of zebrafish larvae (YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2017). In contrast, high amitriptyline concentrations were found to extend the time until hatch and to decrease the heart rate in zebrafish (SEHONOVA *et al.* 2019a). Most studies about the ecotoxicity of amitriptyline were performed with model species, but ecotoxicological studies with feral aquatic species are lacking. Brown trout are known to be a sensitive test organism and as important predators are of ecological relevance (SCHMIDT-POSTHAUS *et al.* 2001, KLEMETSEN *et al.* 2003).

In the present study, effects of polystyrene (PS) MP at an environmental relevant concentration of 100 particles/L and higher concentrations of  $10^4$  and  $10^5$  particles/L on the development of brown trout were investigated. Fish were exposed for 182 days from freshly fertilized eggs until about one month after the fry completed their yolk sac consumption. In a second experiment, eggs were exposed from eyed ova stage until one week after yolk sac consumption. In addition

to PS-MP ( $10^5$  and  $10^6$  particles/L) fish were also exposed to amitriptyline and co-exposed to the mixtures of PS-MP and the antidepressant. The co-exposure allows to investigate a potential modulation of the effects of amitriptyline by PS-MP. In both experiments, the impact of exposure on the development and biomarkers for oxidative stress (activity of superoxide dismutase (SOD) and the level of lipid peroxidation (LPO)) were analyzed. Since the chorion of zebrafish has been reported to act as an effective protective barrier against carbon nanotubes (CHENG *et al.* 2007), we examined the structure of the chorion of brown trout in the first experiment by means of scanning electron microscopy. In the second experiment, also the behavior of larvae and endpoints for neurotoxicity (activity of acetylcholinesterase (AChE) and two carboxylesterases (CbE)) were investigated.

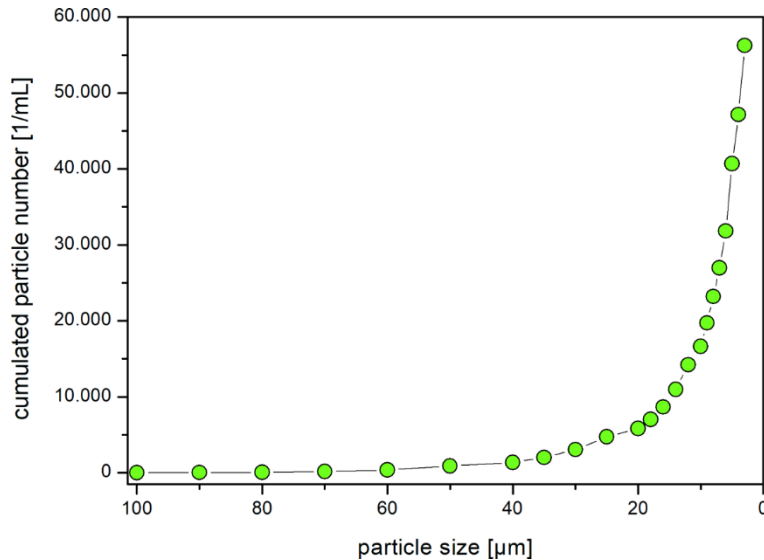
## **2 Materials and Methods**

### *2.1 Test Organism*

Eggs of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) were obtained from a commercial fish breeder (Forellenzucht Lohmühle, D-72275 Alpirsbach-Ehlenbogen, Germany). According to the EC Council Directive, the breeding facility is listed as category 1, disease-free (EU 2006). All experiments started directly after purchase of the eggs: In experiment 1, eggs (in total 360 eggs) were exposed on the same day of their fertilization, in experiment 2 (in total 540 eggs), exposure started 47 days post fertilization (dpf) in the eyed ova stage.

### *2.2 Test Substances*

In both experiments, transparent PS pellets (Polystyrol 158 K, BASF, Ludwigshafen, Germany, density 1.05 g/mL) were cryo-milled (CryoMill, Retsch, Haan, Germany) according to the method of EITZEN *et al.* (2019). The resulting irregularly shaped particles were suspended in ultra-pure water (without any surfactant), fractionated using a micro-sieve (polyamide monofilament) with nominal mesh-size of 50  $\mu\text{m}$  and the permeate was used as stock suspension. The particle concentration in the stock suspensions were analyzed with a particle counter (SVSS, PAMAS, Rutesheim, Germany) by light extinction in a laser-diode sensor (type HCB-LD-50/50). Exemplary particle numbers with the analyzed size ranges are provided in Figure 1 and in Table S1 in the supplement. The stock suspensions were diluted with respective ratios to obtain the target particle concentrations for the exposure experiments.



**Figure 1:** Size distribution of the used polystyrene microplastic particles (PS-MP).

Amitriptyline hydrochloride was purchased from Sigma Aldrich (CAS Number: 549-18-8; Lot: BCBV1175; molecular formula:  $C_{20}H_{23}N \cdot HCl$ ; purity  $\geq 98\%$ ; molecular weight 313.86). Amitriptyline hydrochloride in the used concentration is water soluble without adding organic solvents. For the stock solutions, 8.5 mg/L amitriptyline hydrochloride were solved in bidistilled water. Bottles with stock solutions were covered in aluminum foil to protect them from light. All further given amitriptyline concentrations refer to pure amitriptyline not amitriptyline hydrochloride. The predicted logP octanol-water coefficient (pH 7.4) of amitriptyline is 4.92 (HANSCH *et al.* 1995).

### 2.3 Exposure and Sampling of Brown Trout

In both experiments, each treatment was tested in triplicates in a semi-static three-block design. Exposures took place in a thermostat-controlled chamber with a light/dark cycle of 10/14 h. Petri dishes and aquaria were shaded from direct light. Aquaria were aerated with glass pipettes connected via silicone tubes to compressed air. Test suspensions were prepared from defined PS-MP stock suspensions (56,240 particles/mL). Vessels containing the respective stock suspension were rinsed four times to avoid loss of particles. After consumption of the yolk sacs, fish were fed daily approximately 3% of their body weight with commercial fish feed (0.5 mm, Biomar, Brande, Denmark). At the end of the experiments, brown trout were anesthetized and killed by an overdose of tricaine methanesulfonate ((MS-222), 1 g/L, buffered with  $NaHCO_3$ ). Death was ensured by severance of the spine. Length and weight of each fish were recorded. The level of LPO, the activity of SOD and the activity of AChE and CbE had to be analyzed in different tissues, due to the small size of the fish.

### 2.3.1 Experiment 1a: Exposure of Embryos and Sac-Fry Stages

The first part of experiment 1 was conducted according to the OECD guideline 212 for exposing fish embryos and sac-fry stages to dissolved chemicals (OECD 1998). Freshly fertilized eggs (fertilization and start of experiment 07 December 2016) were exposed to 0 particles/L (C1), 100 particles/L (MP1<sub>h</sub>), 10<sup>4</sup> particles/L (MP1<sub>tt</sub>) and 10<sup>5</sup> particles/L (MP1<sub>ht</sub>). This first part of the experiment 1 was performed in glass Petri dishes containing 200 mL of the respective test suspension. To achieve the final concentration, the stock suspension was diluted with aerated artificial water (294 mg/L CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 123.25 mg/L MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 64.75 mg/L NaHCO<sub>3</sub>, 5.75 mg/L KCl in pure water). In each Petri dish, 30 brown trout eggs were exposed to the test suspensions (90 eggs per treatment). Until the eyed ova stage, the eggs were kept in complete darkness. The temperature in the Petri dishes was 6.7 ± 0.2°C. To maintain good water quality, 25 to 50% of the test suspensions were renewed every second day (detailed information in the supplement Table S2). From day 138 dpf, filtered aerated tap water (iron filter, particle filter, activated charcoal filter) was used to prepare the test suspensions to habituate the growing larvae to the water used in the second part of the experiment. The first part of the experiment ended after 150 days when the fry had completely consumed their yolk sacs (07 December 2016–05 May 2017). Investigated parameters were time of development until eyed ova stage, time until hatch, heart rate 93 dpf, and mortality (excluding unfertilized eggs). After the first part of the experiment, ten larvae were sampled from each Petri dish. For determination of the LPO level, heads of the larvae were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until further usage.

### 2.3.2 Experiment 1b: Exposure of Fry

The second part of experiment 1 lasted 33 days until 182 dpf (05 May 2017–06 June 2017). The remaining fry of experiment 1a were transferred into 12 L aquaria with 5 L of the corresponding test suspensions (in total C1: *n* = 57, MP1<sub>h</sub>: *n* = 57, MP1<sub>tt</sub>: *n* = 53 and MP1<sub>ht</sub>: *n* = 58). PS-MP stock suspensions were diluted with filtered tap water. To ensure good water quality, half of the test suspension was renewed twice a week. Water parameters were checked 177 dpf and at the end of the experiment (average values: Temperature 6.38 ± 0.45 °C, pH 8.5 ± 0.1, oxygen concentration 12.71 ± 0.22 mg/L, oxygen saturation 107.33 ± 1.60%; conductivity 493.33 ± 7.30 µS/cm; see supplement Table S3). Samples for analysis of SOD activity (muscle/kidney) as well as for determination of the LPO level (head) were frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C.

### 2.3.3 Experiment 2

In experiment 2, embryos/larvae were exposed in total for 60 days from eyed ova stage (47 dpf) until one week after yolk sac consumption (29 December 2017–26/27. February 2018). Exposure groups included a control group (C2) and groups exposed to  $10^5$  particles/L (MP2<sub>ht</sub>),  $10^6$  particles/L (MP2<sub>mio</sub>), pulse-spiked amitriptyline (AMI2, nominal concentration 300 µg/L, average concentration calculated and given as follows),  $10^5$  particles/L + pulse-spiked amitriptyline (MIX2<sub>ht</sub>, nominal concentration 300 µg/L amitriptyline, average concentration calculated and given as follows), and  $10^6$  particles/L + pulse-spiked amitriptyline (MIX2<sub>mio</sub>, nominal concentration 300 µg/L amitriptyline, average concentration calculated and given as follows). Test media were prepared with filtered tap water. Exposure took place in 12 L aquaria filled with 5 L of the corresponding test media. Per aquarium, 30 individuals were exposed (3 × 30 per treatment group). 2.5 L of the test media were exchanged on average once a week (see Table S2 in the supplement). Water parameters were determined to control water quality at the start, after 55 days of exposure and at the end of the experiment. The average values were pH  $8.3 \pm 0.2$ , temperature  $7.06 \pm 0.20$  °C, conductivity  $430.83 \pm 17.24$  µS/cm, oxygen content  $10.92 \pm 0.10$  mg/L, oxygen saturation  $95.06 \pm 0.79\%$  (see supplement Table S4). Nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) values did not exceed 0.05 mg/L. The heart rate was counted 21 days after the start of the experiment. Samples for LPO (head), SOD (muscle/kidney), AChE and CbE (muscle) were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

### 2.4 Chemical Analyses

At the start of the second experiment as well as prior and past a water exchange (17 January 2018) mixed samples of all three blocks of each treatment group (4 mL per aquarium 12 mL in total) were taken and frozen at -20 °C until further analysis. The water concentrations of amitriptyline were determined using LC-MS with a 1290 Infinity HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and a triple quadrupole mass spectrometer (6490 iFunnel Triple Quadrupole LC/MS, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) in ESI (+) mode. An Agilent Poroshell-120-EC-C18 (2.7 µm, 2.1 × 100 mm) column at a flow rate of 0.4 mL/min was used for separation, and column temperature was maintained at 40 °C. Eluent A and B were water (+ 0.1% formic acid) and acetonitrile (+ 0.1% formic acid), respectively. Gradient elution was used: 0–1 min 5% B, linear increase to 100% B within 7 min, hold for 7 min at 100% B. After switching back to the starting conditions, reconditioning time of 3 min was employed. Samples were kept in the autosampler at 10 °C, the injection volume was 10 µL. Samples of the control experiments were measured undiluted and samples of the experiments pulse-spiked with amitriptyline were measured after 50-times dilution. The detection limit of amitriptyline (mass

transition  $m/z$  278.2  $\rightarrow$  117.1) for undiluted samples was 10 ng/L (10  $\mu$ L injection volume). Further details on operating parameters of the triple quadrupole are provided in Table S5 and Table S6 in the supplement.

### *2.5 Development Parameters*

Mortality, malformations, eye pigmentation (only experiment 1), and hatch were checked daily. Coagulated eggs, dead fish and remains of chorions were removed. To determine the heart rate, five animals of each Petri dish/aquaria were transferred into a Petri dish with fresh test medium. The heart rate was counted under a stereo microscope for 20 s and water temperature was measured. Subsequently, fish were placed back into the corresponding Petri dish/aquaria.

### *2.6 Scanning Electron Microscopy*

After hatching in experiment 1, chorions were immediately fixed in 2% glutardialdehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.6) for several days. Specimens were rinsed three times with 0.1 M cacodylate buffer and subsequently incubated in 1% osmium tetroxide overnight. The next day, chorions were transferred in a graded series of ethanol for dehydration. Subsequently, samples were fixed to specimen holder stubs and sputter-coated with gold. Analyses were conducted using a scanning electron microscope EVO LS 10 (Zeiss, Jena, Germany).

### *2.7 Behavior*

In the second experiment, resting behavior of fry was determined after 42 days of exposure. In each tank, the positions of all fish were recorded (resting on the side/resting in ventral position). Additionally, the swimming behavior under stressful conditions (bright illumination, no aeration) was quantified at the end of the experiment (27 February 2018). For this, five fish per replicate were transferred into small tanks (17 cm  $\times$  17 cm  $\times$  8.5 cm) filled with 0.5 L of the corresponding test medium. Four of these tanks were measured simultaneously. Tanks were surrounded with white polystyrene plates and indirectly illuminated with lamps (one lamp per tank, 2,700 K, 1,521 lm per lamp) facing the top plate. After a habitation period of 2 min, swimming behavior of fish was recorded for 18 min with four cameras (Basler acA 1300–60 gm, 1.3 megapixels resolution, Basler AG, Ahrensburg, Germany, lens: 4.5–12.5 mm; 1:1.2; IR 1/2") positioned 32 cm above the water surface of each tank. Fry were center-point tracked individually, and total distance moved, mean velocity over time, time of no movement and body contact were assessed using the EthoVision 12 XT software (Noldus Information Technology bv, Wageningen, Netherlands). Whenever the system exhibited difficulties in automatic tracking, data were manually corrected for swaps between tracked individuals. After the video tracking fish were sampled as described above.

### 2.8 Level of Lipid Peroxides

The degree of LPO was quantified with the ferrous oxidation xylene orange (FOX) assay. The assay was performed according to HERMES-LIMA *et al.* (1995) and MONSERRAT *et al.* (2003), slightly modified for 96-well plates. In pre-tests, the dilution factor with methanol as well as sample volume and incubation time were adjusted for optimal output (see Table S7). Frozen heads of fry were homogenized with HPLC grade methanol. Samples were centrifuged (15,000 rcf, 5 min, 4 °C) and the supernatants were stored at –80 °C. For the final assay, the following compounds were added to each well: 50 µL of 0.75 mM FeSO<sub>4</sub>-solution, 50 µL of 75 mM sulfuric acid, and 50 µL of 0.3 mM xylene orange solution. Subsequently, the corresponding sample volume was added. To be able to correct for potential Fe in the samples, additionally, a sample blank in which the FeSO<sub>4</sub>-solution was replaced by bidistilled water was performed. Bidistilled water was used to achieve a total volume of 200 µL in each well. Well plates were incubated at room temperature and the absorbance at 570 nm (ABS570) was measured in a photometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). In a next step, 1 µL of 1 mM cumene hydroperoxide solution (CHP) was added into each well and the plates were incubated for another 30 min (at room temperature). Afterwards, the absorbance of the samples with CHP was measured at 570 nm. Data were related to the corresponding sample blanks. Each sample was analyzed in triplicates. CHP equivalents were calculated according to the following equation:

$$CHPequiv. = \frac{ABS570}{ABS570_{CHP}} \times \text{volume CHP (1 } \mu\text{L)} \times \frac{\text{total volume (200 } \mu\text{L)}}{\text{sample volume}} \times \text{dilution factor} \quad (1)$$

### 2.9 Activity of Superoxide Dismutase

Samples containing muscle and kidney tissue were rinsed in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4) before they were frozen. Superoxide dismutase (Cu/Zn SOD, Mn SOD and Fe SOD) activity was determined with a superoxide dismutase assay kit (item no. 706002, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Samples were homogenized with 1:5 20 mM HEPES buffer (pH 7.2) and stored at –80 °C. Prior to the assay, samples were diluted 5:150 with TRIS buffer (50 mM TRIS-HCl, pH 8.0). In the assay formazan dye is formed as a product of the reduction of tetrazolium salt by superoxide radicals (generated by xanthine oxidase and hypoxanthine). SOD catalyzes the dismutation of the superoxide anion to hydrogen peroxide and molecular oxygen. After incubation for 30 min, the absorbance at 450 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) was measured and the SOD activity was calculated. All samples were analyzed in duplicates.

### 2.10 Neurotoxicity

Muscle tissue was homogenized in TRIS buffer (20 mM TRIS<sub>base</sub>, 20 mM NaCl, inhibitor mix, pH 7.3) in a ratio of 1:5 and centrifuged (5000 rcf, 10 min, 4 °C). Subsequently, 50% glycerol (1/4 of the volume of the supernatant) were added to the supernatant. Until final analysis, samples were stored at –20 °C. The Lowry method (LOWRY *et al.* 1951) modified by MARKWELL *et al.* (1978) was used to determine the total protein content in the samples. The activity of acetylcholinesterase (AChE) was photometrically analyzed at 405 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) according to the method of ELLMAN *et al.* (1961) and modified by RAULT *et al.* (2008). Additionally, the activity of two carboxylesterases (CbE) with 5 mM 4-nitrophenyl acetate (pnpa) and 5 mM 4-nitrophenyl valerate (pnpv) were determined according to SANCHEZ-HERNANDEZ *et al.* (2009). All samples were analyzed in triplicates. Reported are specific activities of the enzyme per mg of total protein content. One unit corresponds to one µmol substrate hydrolyzed per min.

### 2.11 Statistical Analysis

All analyses were performed with the software R 3.6.2. The  $\alpha$ -level was set to 0.05. Developmental time until eyed ova stage, time until hatch and mortality were analyzed with mixed effects Cox models (package *coxme*) including the treatment as fixed effect and the Petri dish/tank as random effect to consider potential position effects and influences among the fish in the Petri dish/tank. Post-hoc comparisons with the control were performed with Dunnett`s test (experiment 1), and among all groups with Tukey-HSD test (experiment 2). If necessary, data were transformed to achieve normal distribution (see supplement Table S8). Length (experiment 1a) and CbE-pnpa (experiment 2) could not be transformed to normal distributed data. In these cases, a Kruskal-Wallis test was performed. Data for weight, AChE activity, CbE activity, SOD activity, LPO level, body contact, total distance, and length (experiment 1b and experiment 2) were analyzed with a linear mixed model (package *lme4*) including treatment as fixed effect and Petri dish/aquarium as random effect. Heart rate was similarly analyzed but with temperature during measurement as additional random effect. For mean velocity and no movement beside treatment, recording time was included in the model as fixed effect, and again the aquarium as random effect. Resting behavior was analyzed with a likelihood-ratio test followed by Fisher`s exact tests. The method of BENJAMINI & HOCHBERG (1995) was used to correct for multiple testing. All p-values not mentioned in the manuscript are given in Table S9 in the supplement.

### 2.12 Animal Welfare

The animal welfare committee of the regional council of Tübingen, Germany has approved the experiments (authorization number ZO 2/16).

### 2.13 Credibility of Data

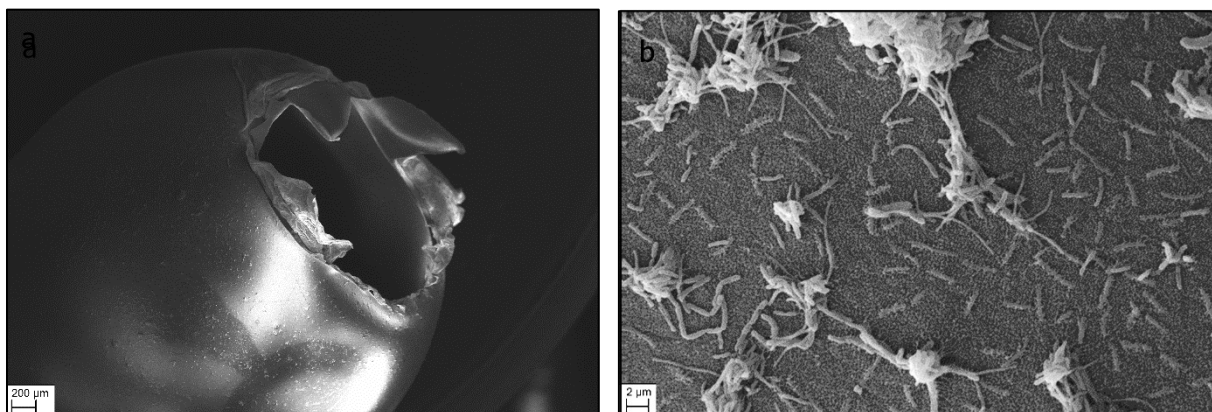
Details on the fulfillment of the criteria for reporting and evaluation of ecotoxicity of data (CRED) proposed by MOERMOND *et al.* (2016) are provided in the supplement.

## 3 Results

Both experiments were considered valid as the survival of fish in the control groups as well as the oxygen saturation were above 95%, and the difference in temperature between the aquaria in each test was smaller than 1.5 °C. Prevalence of malformations was negligible in both tests.

### 3.1 Experiment 1a: Exposure of Embryos and Sac-Fry Stages

The fertilization rate of the eggs was 98%. Table 1 summarizes the results of the first part of experiment 1. Eye pigmentation started 37 dpf and was completed after 55 dpf. Over 99% of the larvae hatched between 68 and 84 dpf. No significant differences in time until eyed ova stage and hatch were found between the groups exposed to MP (MP1<sub>h</sub>, MP1<sub>tt</sub>, MP1<sub>ht</sub>) and the control group (eyed ova:  $d.f. = 3, n = 352, \chi^2 = 16.401, p < 0.001$ , C1/MP1<sub>h</sub>  $p = 0.977$ , C1/MP1<sub>tt</sub> and C1/MP1<sub>ht</sub>  $p = 1$ ; hatch  $d.f. = 3, n = 349, \chi^2 = 171.66, p < 0.001$ , C1/MP1<sub>h</sub>  $p = 0.230$ , C1/MP1<sub>tt</sub>  $p = 0.999$ , C1/MP1<sub>ht</sub>  $p = 0.814$ ). It became evident that the chorion of the eggs consists of several layers and exhibits no pores in the micrometer range (Figure 2). The heart rate of brown trout larvae was not affected by the exposure to PS-MP ( $d.f. = 3/6.649, F = 3.971, p = 0.066$ ).



**Figure 2:** SEM images of the chorion of a recently hatched brown trout. **(a):** Overview with distinguishable layers at the opening. **(b):** Detailed view of the chorion's surface. No pores in  $\mu\text{m}$  range are present.

**Table 1:** Summary of data for the investigated endpoints in experiment 1a. All data are given as arithmetic means  $\pm$  standard deviation.

	Control (C1)	100 Particles/L (MP1 <sub>h</sub> )	10 <sup>4</sup> Particles/L (MP1 <sub>tt</sub> )	10 <sup>5</sup> Particles/L (MP1 <sub>ht</sub> )
Mortality (%)	1 $\pm 2$	1 $\pm 2$	1 $\pm 2$	1 $\pm 2$
Time until eyed ova stage (dpf)	39 $\pm 1$	39 $\pm 1$	40 $\pm 3$	40 $\pm 2$
Time to hatch (dpf)	75 $\pm 3$	73 $\pm 3$	73 $\pm 2$	73 $\pm 3$
Heart rate (beats/min)	51 $\pm 2$	56 $\pm 3$	52 $\pm 2$	53 $\pm 3$
Length (cm)	2.7 $\pm 0.2$	2.7 $\pm 0.2$	2.7 $\pm 0.2$	2.8 $\pm 0.2$
Body mass (g)	0.15 $\pm 0.03$	0.14 $\pm 0.02$	0.14 $\pm 0.03$	0.16 $\pm 0.02$
Lipid peroxidation (CHP-equiv.)	57.89 $\pm 10.20$	60.12 $\pm 13.70$	62.42 $\pm 12.17$	61.23 $\pm 13.01$

The mortality did not differ between the treatment groups and was below 2% ( $d.f. = 3, n = 354, \chi^2 = 0.0017, p = 1$ ) in all groups. At 150 dpf, fish were  $2.72 \pm 0.18$  cm long and weighted  $0.15 \pm 0.03$  g on average. No significant differences were measured in length and body mass compared to the control group (length:  $n = 120, d.f. = 3, \chi^2 = 4.857, p = 0.183$ ; body mass:  $d.f. = 3/8, F = 0.928, p = 0.471$ ). The level of LPO was alike in all treatment groups ( $d.f. = 3/8.072, F = 0.928, p = 0.471$ ).

### 3.2 Experiment 1b: Exposure of Fry

No fish died during the second part of the experiment. The fish were  $2.92 \pm 0.21$  cm long and weighted  $0.19 \pm 0.04$  g on average. MP had neither a significant effect on biometric values nor on the oxidative stress level compared to the control (Table 2; length:  $d.f. = 3/7.819, F = 2.511, p = 0.134$ ; body mass:  $d.f. = 3/220, F = 3.576, p = 0.015, C1/MP1_h: p = 0.064, C1/MP1_{tt}: p = 0.729, C1/MP1_{ht}: p = 0.997$ ; SOD:  $d.f. = 3/115, F = 0.341, p = 0.795$ ; LPO:  $d.f. = 3/116, F = 2.904, p = 0.038, C1/MP1_h: p = 0.355, C1/MP1_{tt}: p = 0.286, C1/MP1_{ht}: p = 0.286$ ).

**Table 2:** Summary of data for the investigated endpoints in experiment 1b. All data are given as arithmetic means  $\pm$  standard deviation.

	Control (C1)	100 Particles/L (MP1 <sub>h</sub> )	10 <sup>4</sup> Particles/L (MP1 <sub>tt</sub> )	10 <sup>5</sup> Particles/L (MP1 <sub>ht</sub> )
Mortality (%)	0 $\pm 0$	0 $\pm 0$	0 $\pm 0$	0 $\pm 0$
Length (cm)	3.0 $\pm 0.1$	2.9 $\pm 0.2$	3.0 $\pm 0.2$	2.9 $\pm 0.2$
Body mass (g)	0.20 $\pm 0.02$	0.17 $\pm 0.04$	0.20 $\pm 0.04$	0.19 $\pm 0.04$
Lipid peroxidation (CHP-equiv.)	58.28 $\pm 15.46$	65.46 $\pm 22.14$	52.30 $\pm 18.77$	58.57 $\pm 15.51$
SOD (U/mL)	95.43 $\pm 28.47$	105.60 $\pm 42.84$	96.15 $\pm 31.87$	98.60 $\pm 30.56$

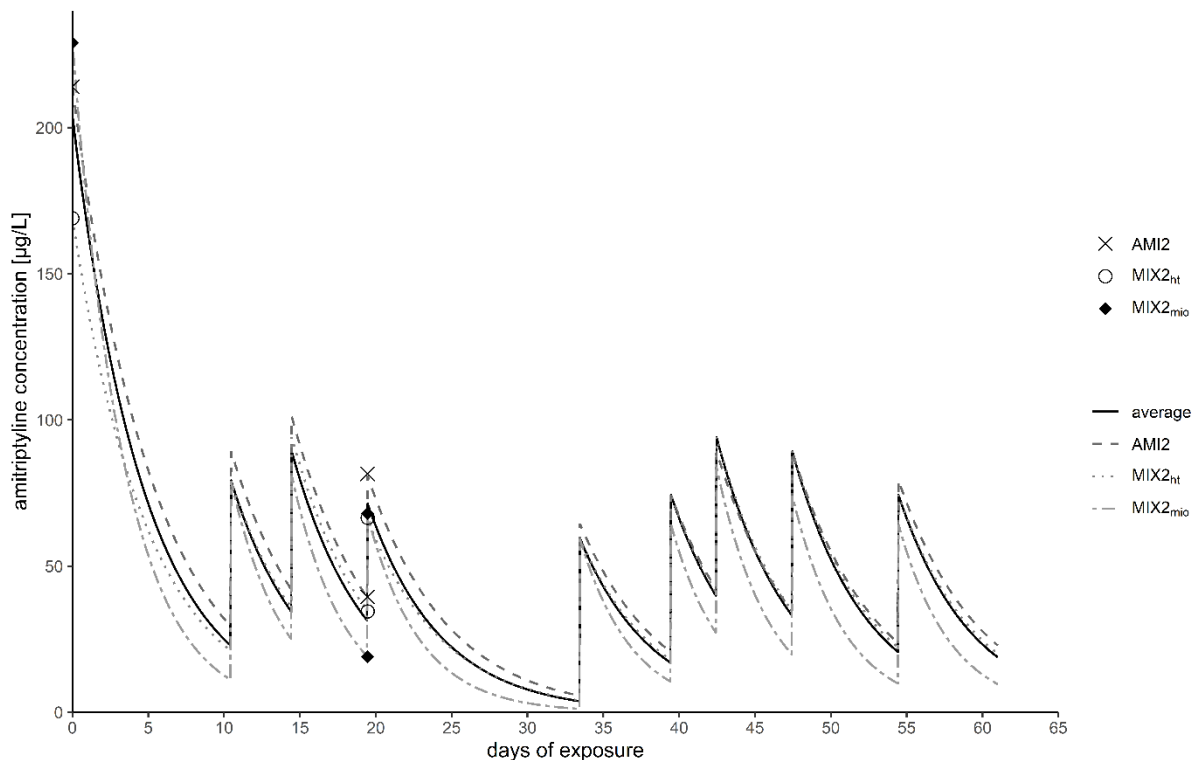
3.3 Experiment 2

At every time point sampled, the concentration of amitriptyline in C2, MP2<sub>ht</sub>, MP2<sub>mio</sub> was below the limit of detection (10 ng/L). The nominal concentration of amitriptyline in the groups AMI2, MIX2<sub>ht</sub> and MIX2<sub>mio</sub> was 300 µg/L. However, at the beginning of the experiment the real concentration was only between 76% and 56% of the nominal concentration (Table 3).

**Table 3:** Nominal and measured amitriptyline concentrations at the start of the experiment as well as prior and after a water exchange.

	Nominal Concentration	Measured Concentration		
		Start of Experiment	Prior Water Exchange	After Water Exchange
C2	0 µg/L	< 0.01 µg/L	< 0.01 µg/L	< 0.01 µg/L
MP2 <sub>ht</sub>	0 µg/L	< 0.01 µg/L	< 0.01 µg/L	< 0.01 µg/L
MP2 <sub>mio</sub>	0 µg/L	< 0.01 µg/L	< 0.01 µg/L	< 0.01 µg/L
AMI2	300 µg/L	214 µg/L	40 µg/L	82 µg/L
MIX2 <sub>ht</sub>	300 µg/L	169 µg/L	35 µg/L	67 µg/L
MIX2 <sub>mio</sub>	300 µg/L	229 µg/L	19 µg/L	68 µg/L

Prior to the water exchange, the measured concentration of amitriptyline was only between 6% and 13% of the nominal concentration in all three groups. After the exchange of half of the media with freshly prepared amitriptyline solutions, it was between 22% and 27% of the nominal concentration. Due to the strong depletion of amitriptyline during the experiment, we modeled the concentration fish were exposed to over time (Figure 3).



**Figure 3:** Modelled amitriptyline concentration over the duration of the experiment. Measured concentrations of the three exposure groups (AMI2, MIX2<sub>ht</sub>, and MIX2<sub>mio</sub>) are depicted as points.

Based on the measured concentrations, the removal of amitriptyline from the aqueous phase was assumed as pseudo-first order:

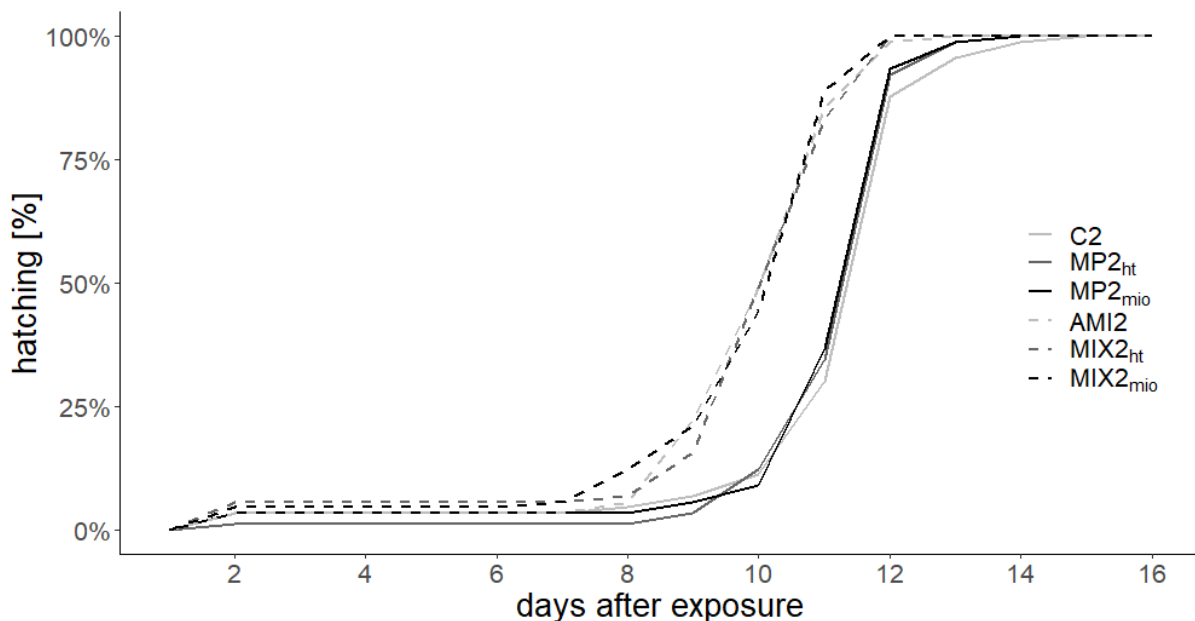
$$y = c_0 \times e^{-k \times t_{exp}}. \quad (2)$$

Where  $c_0$  is the initial concentration and  $t_{exp}$  are the days of exposure. To adjust the model to the measured amitriptyline concentrations, for  $k$  values between 0.19 and 0.29 were presumed. According to this model, the average amitriptyline concentration during the experiment was  $48 \pm 33 \mu\text{g/L}$ .

Results of the second experiment are summarized in Table 4. No mortality occurred in the control group (C2) and it was below 5% in all treatment groups ( $\chi^2 = 0.3102$ ,  $d.f. = 5$ ,  $p = 0.9974$ ).

Fish hatched on average 11 days after the start of the experiment (Figure 4). While no differences were found between C2 and MP2<sub>ht</sub> as well as between C2 and MP2<sub>mio</sub>, all exposure groups with amitriptyline (AMI2, MIX2<sub>ht</sub> and MIX2<sub>mio</sub>) hatched significantly earlier than the control group and the two MP treatment groups ( $\chi^2 = 164.6$ ,  $d.f. = 5$ ,  $p < 0.0001$ ). Neither trout treated with MP nor those exposed to amitriptyline or the mixture of both showed an influence on their heart rate ( $d.f. = 5/7.5129$ ,  $F = 0.2909$ ,  $p = 0.9044$ ).

MP had no effect on body mass and length of the fry while fish exposed to AMI2, MIX2<sub>ht</sub> and MIX2<sub>mio</sub> weighted significantly less and were significantly smaller than C2, MP2<sub>ht</sub> and MP2<sub>mio</sub> (Table 4; body mass:  $d.f. = 5/8.6811$ ,  $F = 36.602$ ,  $p < 0.0001$ ; length:  $d.f. = 5/10.75$ ,  $F = 65.262$ ,  $p < 0.0001$ ).



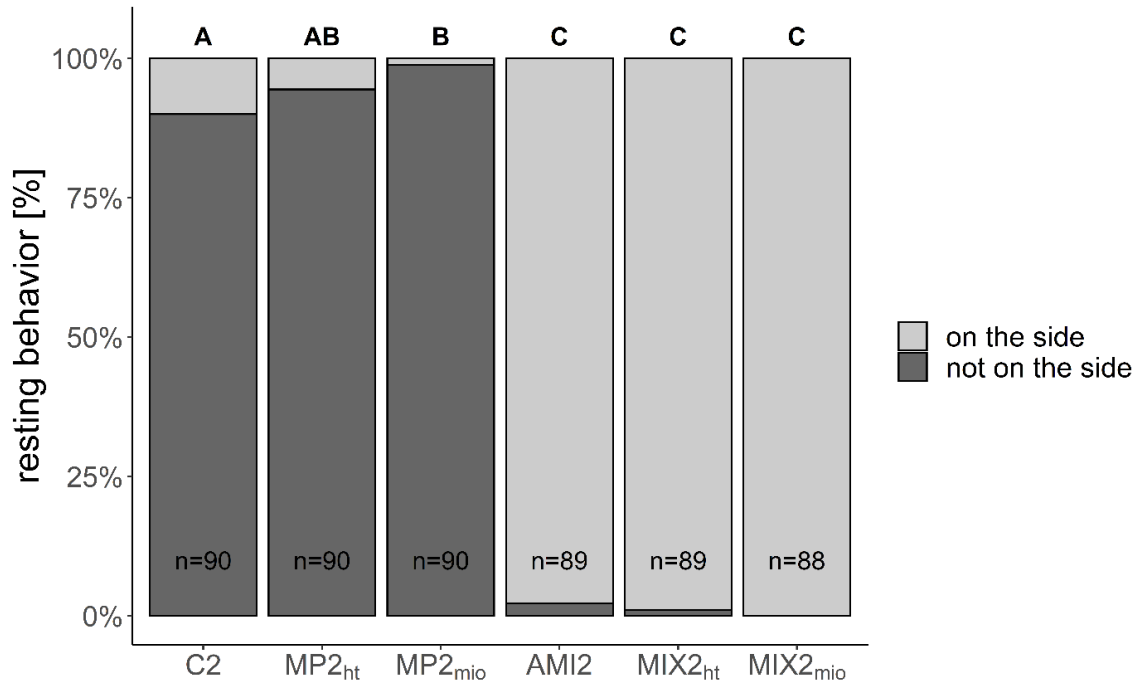
**Figure 4.** Percent of brown trout hatched in the different treatment groups at the different days after exposure. All fish exposed to amitriptyline (AMI2, MIX2<sub>ht</sub>, MIX2<sub>mio</sub>) hatched significantly earlier than the control group and the groups containing solely MP (MP2<sub>ht</sub> and MP2<sub>mio</sub>).

**Table 4:** Summary of data for the investigated endpoints in experiment 2. All data are given as arithmetic means  $\pm$  standard deviation. *p*-values in comparison to the control group are given if significant differences occurred.

	Control (C2)	10 <sup>5</sup> Particles/L (MP2 <sub>ht</sub> )	10 <sup>6</sup> Particles/L (MP2 <sub>mio</sub> )	Amitriptyline (AMI2)	Amitriptyline + 10 <sup>5</sup> Particles/L (MIX2 <sub>ht</sub> )	Amitriptyline +10 <sup>6</sup> Particles/L (MIX2 <sub>mio</sub> )
<b>Mortality (%)</b>	0 $\pm$ 0	1 $\pm$ 1	0 $\pm$ 0	3 $\pm$ 4	2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 3
<b>Time to hatch (days of exposure)</b>	12 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1 <i>p</i> = 0.786	11 $\pm$ 2 <i>p</i> = 0.580	<b>10</b> <b><math>\pm</math> 2</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>10</b> <b><math>\pm</math> 2</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>10</b> <b><math>\pm</math> 2</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>
<b>Heart rate (beat /min)</b>	56 $\pm$ 4	55 $\pm$ 2	56 $\pm$ 2	56 $\pm$ 1	54 $\pm$ 4	55 $\pm$ 2
<b>Larvae resting on their side (%)</b>	10.0 $\pm$ 11.9	5.6 $\pm$ 4.2 <i>p</i> = 0.405	<b>1.1</b> <b><math>\pm</math> 1.6</b> <b><i>p</i> = 0.018</b>	<b>97.8</b> <b><math>\pm</math> 3.1</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>98.9</b> <b><math>\pm</math> 1.6</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>100.0</b> <b><math>\pm</math> 0.0</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>
<b>Total distance moved (cm)</b>	2135 $\pm$ 862	1617 $\pm$ 1008 <i>p</i> = 0.385	1772 $\pm$ 1103 <i>p</i> = 0.756	<b>224</b> <b><math>\pm</math> 95</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>253</b> <b><math>\pm</math> 136</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>345</b> <b><math>\pm</math> 165</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>
<b>Body contact (s)</b>	75 $\pm$ 31	77 $\pm$ 49 <i>p</i> = 1	56 $\pm$ 17 <i>p</i> = 0.999	217 $\pm$ 137 <i>p</i> = 0.082	<b>241</b> <b><math>\pm</math> 137</b> <b><i>p</i> = 0.023</b>	222 $\pm$ 63 <i>p</i> = 0.066
<b>Mean velocity (cm/s)</b>	2.0 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 0.9 <i>p</i> = 0.129	1.6 $\pm$ 1.0 <i>p</i> = 0.505	<b>0.2</b> <b><math>\pm</math> 0.1</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>0.2</b> <b><math>\pm</math> 0.1</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>0.3</b> <b><math>\pm</math> 0.2</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>
<b>No movement (s)</b>	579 $\pm$ 207	706 $\pm$ 243 <i>p</i> = 0.628	668 $\pm$ 282 <i>p</i> = 0.902	<b>1050</b> <b><math>\pm</math> 20</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>1049</b> <b><math>\pm</math> 28</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>1025</b> <b><math>\pm</math> 36</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>
<b>Length (cm)</b>	2.7 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.1 <i>p</i> = 0.603	2.7 $\pm$ 0.1 <i>p</i> = 1	<b>2.4</b> <b><math>\pm</math> 0.1</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>2.4</b> <b><math>\pm</math> 0.1</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>2.4</b> <b><math>\pm</math> 0.1</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>
<b>Body mass (g)</b>	0.14 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.02 <i>p</i> = 1	0.15 $\pm$ 0.02 <i>p</i> = 0.963	<b>0.11</b> <b><math>\pm</math> 0.02</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>0.11</b> <b><math>\pm</math> 0.02</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>0.12</b> <b><math>\pm</math> 0.02</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>
<b>Lipid peroxidation (CHP-equiv.)</b>	18.59 $\pm$ 2.62	19.61 $\pm$ 4.01	18.04 $\pm$ 2.46	19.05 $\pm$ 2.40	19.24 $\pm$ 3.71	19.29 $\pm$ 2.53
<b>SOD (U/mL)</b>	117.54 $\pm$ 28.89	122.62 $\pm$ 28.11	121.55 $\pm$ 24.58	137.88 $\pm$ 33.58	133.66 $\pm$ 29.16	129.09 $\pm$ 31.48
<b>AChE activity (mu/mg protein)</b>	52.46 $\pm$ 12.66	54.48 $\pm$ 13.04 <i>p</i> = 0.997	53.69 $\pm$ 12.39 <i>p</i> = 0.999	<b>68.29</b> <b><math>\pm</math> 13.59</b> <b><i>p</i> = 0.008</b>	<b>68.53</b> <b><math>\pm</math> 14.70</b> <b><i>p</i> = 0.008</b>	<b>68.87</b> <b><math>\pm</math> 14.78</b> <b><i>p</i> = 0.008</b>
<b>CbE-pnpa activity (mu/mg protein)</b>	69.21 $\pm$ 22.85	70.25 $\pm$ 17.96 <i>p</i> = 0.915	70.15 $\pm$ 17.54 <i>p</i> = 0.915	<b>59.23</b> <b><math>\pm</math> 14.10</b> <b><i>p</i> = 0.001</b>	<b>54.11</b> <b><math>\pm</math> 23.21</b> <b><i>p</i> = 0.001</b>	<b>57.22</b> <b><math>\pm</math> 15.89</b> <b><i>p</i> = 0.008</b>
<b>CbE-pnpv activity (mu/mg protein)</b>	70.28 $\pm$ 24.04	66.15 $\pm$ 21.79 <i>p</i> = 0.859	70.43 $\pm$ 21.51 <i>p</i> = 1	<b>39.12</b> <b><math>\pm</math> 26.11</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>38.27</b> <b><math>\pm</math> 27.86</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>	<b>31.33</b> <b><math>\pm</math> 23.59</b> <b><i>p</i> &lt; 0.001</b>

Significant differences from the control group are highlighted in bold.

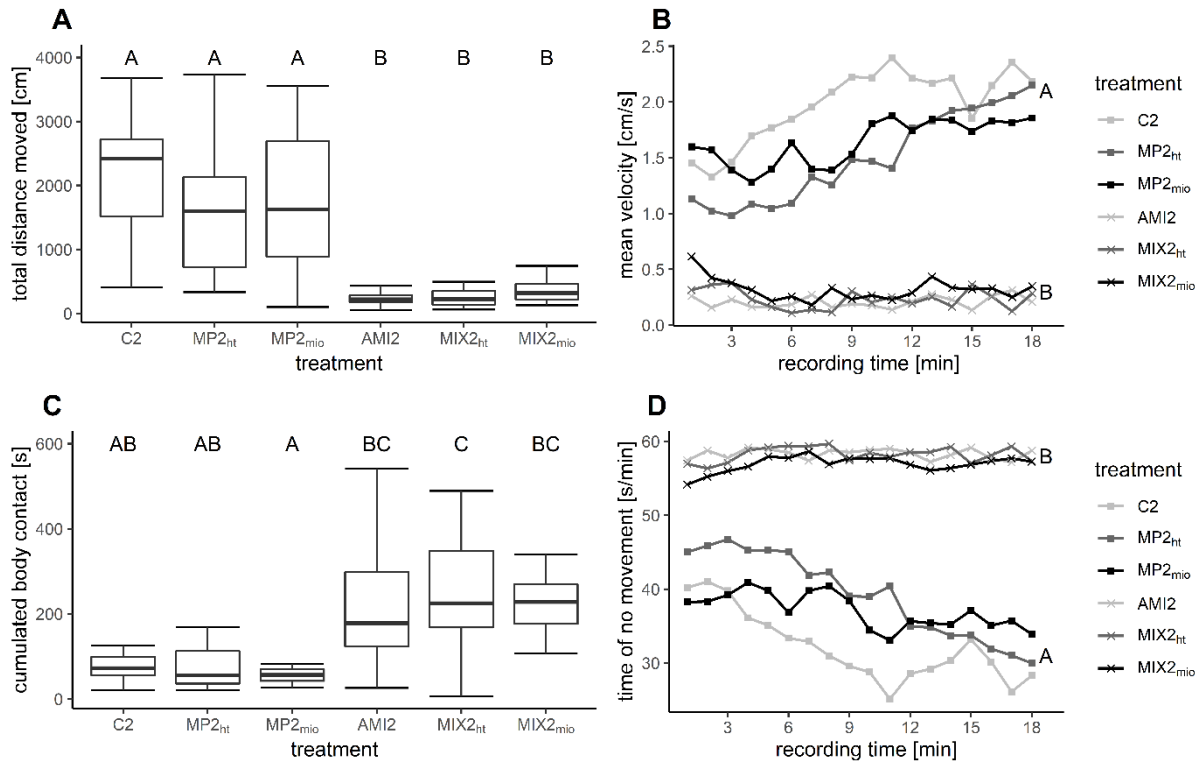
The resting behavior was influenced by the different treatments: Compared to C2, significantly less fish exposed to MP2<sub>mio</sub> were resting on their side, while nearly all fish exposed to AMI2, MIX2<sub>ht</sub> and MIX2<sub>mio</sub> showed this behavior (Figure 5;  $\chi^2 = 604.081$ , *d.f.* = 5,  $p < 0.001$ ). Furthermore, abnormal swimming behavior was observed as larvae exposed to AMI2, MIX2<sub>ht</sub> and MIX2<sub>mio</sub> showed looping behavior as well as side swimming.



**Figure 5.** Resting behavior of brown trout fry after 42 days after exposure. Compared to the control significantly less fish exposed to MP2<sub>mio</sub> are resting on their side while significantly more fish exposed to amitriptyline (AMI2) or the mixture of amitriptyline and MP (MIX2<sub>ht</sub> and MIX2<sub>mio</sub>) are resting on their side ( $\chi^2 = 604.0806$ , *d.f.* = 5,  $p < 0.0001$ , C2/MP2<sub>ht</sub>:  $p = 0.4048$ , C2/MP2<sub>mio</sub>:  $p = 0.01816$ , MP2<sub>ht</sub>/MP2<sub>mio</sub>:  $p = 0.2108$ , C2/AMI2, C2/MIX2<sub>ht</sub>, C2/MIX2<sub>mio</sub>, MP2<sub>ht</sub>/MIX2<sub>ht</sub> and MP2<sub>mio</sub>/MIX2<sub>mio</sub>  $p < 0.001$ , AMI2/ MIX2<sub>ht</sub> and MIX2<sub>ht</sub>/MIX2<sub>mio</sub>:  $p = 1$ , AMI2/ MIX2<sub>mio</sub>:  $p = 0.4972$ ). Different letters indicate significant differences.

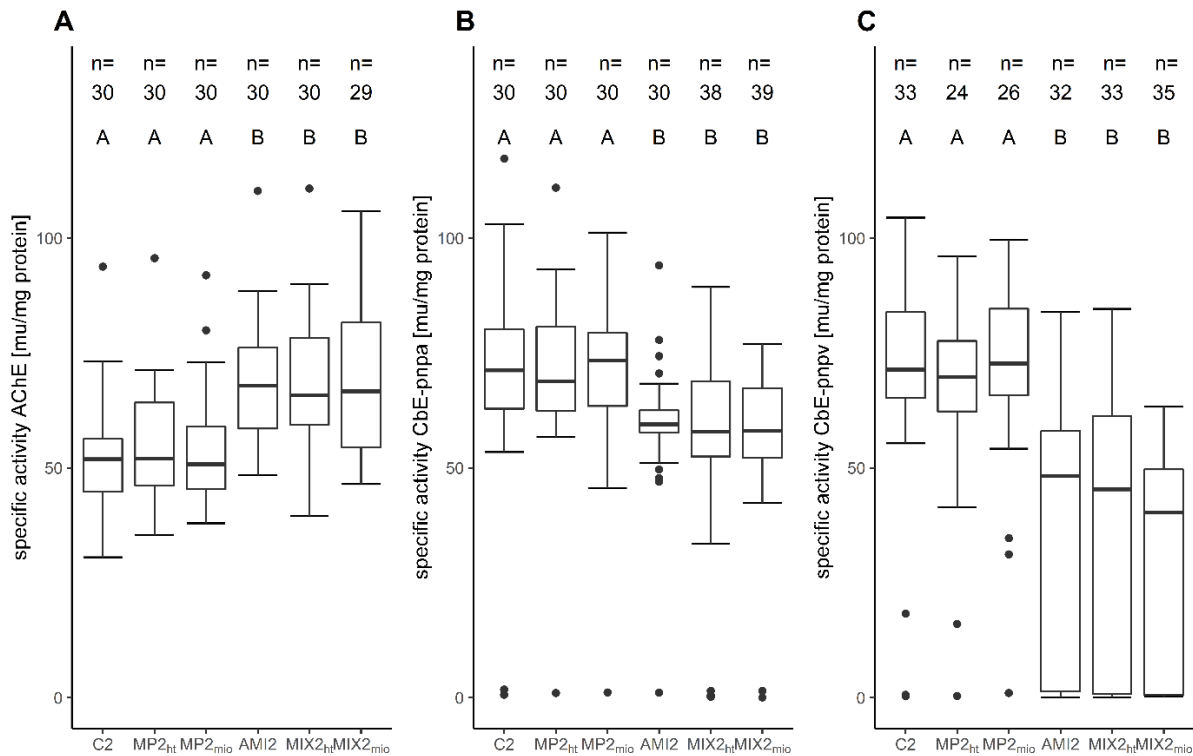
Video tracking revealed considerable differences in the behavior of fry (Figure 6, Table 4). For all investigated parameters, fish exposed to MP2<sub>ht</sub> and MP2<sub>mio</sub> did not differ from the control group. In contrast, fish exposed to AMI2, MIX2<sub>ht</sub>, and MIX2<sub>mio</sub> covered only 11–19% of the distance compared to the control (Figure 6A). In addition, in the three groups containing amitriptyline, fry swam significantly (84–90%) slower than the control fish (Figure 6B). In the control group and in MP2<sub>ht</sub> and MP2<sub>mio</sub>, the mean velocity increased over the recording time. This effect did not occur in the groups exposed to AMI2 or the mixtures. It is especially noticeable that the fry in the three groups containing amitriptyline had more body contact. Compared to the control group, the time fry had body contact to another fish was tripled in AMI2, MIX2<sub>ht</sub>, and MIX2<sub>mio</sub> (Figure 6C). Nevertheless, this behavior was highly variable among the different aquaria. A significant difference was only found between C2 and MIX2<sub>ht</sub>, MP2<sub>ht</sub>, and MIX2<sub>ht</sub> as well as MP2<sub>mio</sub> and MIX2<sub>mio</sub>. AMI2 and MIX2<sub>mio</sub> only showed a trend towards more body contact than the fry in the control group. Furthermore, fry exposed to AMI2, MIX2<sub>ht</sub> and MIX2<sub>mio</sub> spent significantly more

time in inactivity than the fish in the control group and the two exposure groups containing solely MP (Figure 6D; distance:  $d.f. = 5/84, F = 21.25, p < 0.001$ ; velocity:  $d.f. = 5/12, F = 35.290, p < 0.001$ , time:  $d.f. = 1/1601, F = 33.115, p < 0.001$ ; no movement:  $d.f. = 5/12, F = 30.028, p < 0.001$ , time:  $d.f. = 1/2.0794 \times 10^{21}, F = 40.300, p < 0.001$ ; body contact:  $d.f. = 5/12, F = 5.302, p = 0.008$ ).



**Figure 6:** Behavior of brown trout during video tracking ( $n = 15$  in each group). (A): Total distance moved in 18 min. (B): Mean velocity. (C): Total time individuals had body contact. (D): Time of no movement over recording time. (A) and (C): The box plots display the median, the 25th and 75th percentiles as well as minimum and maximum values (whiskers); the dots indicate outliers. Different letters indicate significant differences.

No differences occurred in the activity of SOD and the level of LPO between all exposure groups (SOD:  $d.f. = 5/173, F = 2.081, p = 0.070$ ; LPO:  $d.f. = 5/12.287, F = 1.010, p = 0.452$ ). The AChE activity was increased about 30% in all treatment groups with amitriptyline (Figure 7a). Contrarily, CbE-pnpa was reduced between 14% and 22% in the three exposure groups with the antidepressant. Outliers with very low activity of CbE-pnpa were found in all groups but occurred cumulatively in AMI2, MIX2<sub>ht</sub>, MIX2<sub>mio</sub> (Figure 7b). The activity of CbE-pnpv was even more reduced in the AMI2 and the mixture exposure groups (Figure 7c). Compared to the control, the activity of CbE-pnpv was 44 - 55% lower in AMI2, MIX2<sub>ht</sub>, MIX2<sub>mio</sub> (AChE:  $d.f. = 5/11.822, F = 6.081, p = 0.005$ ; CbE-pnpa:  $d.f. = 5, \chi^2 = 39.211, p < 0.001$ ; CbE-pnpv:  $d.f. = 5/177, F = 22.135, p < 0.001$ ).



**Figure 7:** Enzyme activity in brown trout fry exposed to microplastic particles (MP), amitriptyline, or the mixture of both. (A): Specific activity of acetylcholinesterase (AChE). (B): Specific activity of carboxylesterases (CbE) with the substrate pnpa. (C): Specific activity of CbE with the substrate pnpv. The box plots display the median, the 25th and 75th percentiles as well as minimum and maximum values (whiskers); the dots indicate outliers. Different letters indicate significant differences.

## 4 Discussion

### 4.1 Amitriptyline Concentration

The measured amitriptyline concentrations were considerably lower than the nominal concentration of 300 µg/L. Due to the strong depletion of the amitriptyline concentration, fish were not constantly exposed to the same concentration. The concentration was considerably lower and fluctuated due to the water exchange design. Amitriptyline was found to be one of the most stable pharmaceuticals at pH 7 (BAENA-NOGUERAS *et al.* 2017). However, degradation of the antidepressant via photolysis occurs at low or high pH (BAENA-NOGUERAS *et al.* 2017). In our experiment, the pH was  $8.3 \pm 0.2$  and thereby slightly alkaline. At pH 9, BAENA-NOGUERAS *et al.* (2017) found a half-life of amitriptyline of 9.63 h (wavelength 300-800 nm, irradiance 500 W/m<sup>2</sup>). In our experiment stock solutions were covered in aluminum foil and aquaria were shaded from direct light which reduces the impact of photodegradation. Another factor that likely influenced the concentration of amitriptyline is a possible sorption of the chemical to the glass of the aquaria. Amitriptyline has a high adsorption capacity to kaolinite and Ca-montmorillonite (LV *et al.* 2013, CHANG *et al.* 2014).

One day prior to the start of the experiment, the tanks were filled with the corresponding amitriptyline solutions to saturate sorptive surfaces, and the test media were renewed before

the start of the experiment. Nonetheless, it cannot be excluded that, still, sorption of amitriptyline to the glass occurred. A third process that has likely reduced the measured amitriptyline concentration is the uptake and metabolization of the antidepressant by the fish. Amitriptyline was found to bioconcentrate in brain tissue, gills, liver, blood plasma as well as in bile and muscle tissue of fish with bioconcentration factors between 4 up to 198 (LAJEUNESSE *et al.* 2011, MUIR *et al.* 2017, ZIARRUSTA *et al.* 2017, DAVID *et al.* 2018). Furthermore, in gilt-head bream (*Sparus aurata*), amitriptyline was shown to be degraded to a broad range of metabolites including nortriptyline which is known to be also a bioactive antidepressant (ZIARRUSTA *et al.* 2017). In our experiment, amitriptyline exposure led to severe effects in early life stages of brown trout which supports the assumption that fish had taken up the antidepressant. To counteract the decline of amitriptyline concentration, we performed as many water exchanges with freshly prepared amitriptyline solution and/or cryo-milled PS-MP (whose amount was limited) as possible. However, the goal of our study, which was to show a possible modulation of amitriptyline-induced effects in early life stages of brown trout, was not influenced by the unexpectedly low amitriptyline concentrations, since even those induced strong reactions in the exposed fish.

#### 4.2 Effects of MP

In the first experiment, brown trout eggs exposed to MP developed in a similar way as fish of the control group. This might be due to an impeded passage of the tested MP through the egg chorion which protects the first developmental stages of the fish embryo (GRIERSON & NEVILLE 1981). This explanation is highly probable since our own REM images showed the chorion of brown trout eggs to be free of micropores > 1 µm. Similarly, LI *et al.* (2020b) describes that 10 µm PS-MP accumulated at the outside of the chorion of marine medaka but failed to pass it. In a study with zebrafish, VAN POMEREN *et al.* (2017) found the uptake of nanoplastics via chorion and epidermis to be marginal. Furthermore, LEMOINE *et al.* (2018) observed that MP could not pass the chorion of zebrafish and that the larvae started to ingest and accumulate MP (10–45 µm) not earlier than 5 d post hatch, i.e., as soon as they start to feed on exogenous food. Larvae of marine medaka ingested MP from two days post hatching (LI *et al.* 2020b). In the second experiment we therefore decided to expose the fish in a later developmental stage. In addition to the different developmental stages at the start of the experiment, a slight difference in the temperature explains the faster development and higher heart rate of the fish in the second experiment. KILLEEN *et al.* (1999) investigated the influence of temperature on the development of brown trout in detail and described that the development is generally delayed at lower temperatures.

In both experiments of our study, PS-MP had no effect on hatching, growth, mortality, or heart rate. LEMOINE *et al.* (2018) and CHEN *et al.* (2017) also observed that neither PE-MP (10–45 µm, 480 particles/mL) nor PS-MP (45 µm, 1 mg/L) had any effect on mortality, hatching or growth rate of zebrafish embryos. While PE-MP (10–45 µm) incorporated into the diet of European sea bass likewise did not affect the growth of the fish, high dosages (10<sup>5</sup> particles/g diet) of PE-MP had a slight but significant effect on the survival (MAZURASIS *et al.* 2015). Furthermore, MALAFAIA *et al.* (2020) reported a trend to early hatching and lower survival of zebrafish larvae exposed to PE-MP (38.26 ± 15.64 µm; up to 7.07 × 10<sup>3</sup> particles/L). In contrast, LI *et al.* (2020b) observed that PE-MP (6,534.0 ± 247.8 and 63,640.0 ± 723.5 particles/L) delayed the hatching and reduced the heart rate and growth of marine medaka. Overall, in most studies only minor effects on mortality and developmental parameters were observed in fish exposed to MP. A plausible reason for this might be that the chorion acts as protective barrier, and effects on this life stage are therefore more likely caused by chemicals leaking from the MP than by the particles themselves.

The exposure of brown trout to PS-MP during the development apparently did not lead to oxidative stress as neither the activity of SOD nor the LPO level was influenced. Also, CHEN *et al.* (2017) did not observe any influence of PS-MP on the activity of catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) but they reported a significant decrease in the level of the reduced form of glutathione (GSH) in zebrafish larvae. In juvenile brown trout, also no effect of PS-MP on oxidative stress was found SCHMIEG *et al.* 2020. Furthermore, in common gobies (*Pomatoschistus microps*) the LPO level was not affected by PE-MP exposure in several studies (OLIVEIRA *et al.* 2013, LUÍS *et al.* 2015, FONTE *et al.* 2016, MIRANDA *et al.* 2019). Nevertheless, other studies showed that some MP may induce oxidative stress in fish (FERREIRA *et al.* 2016, LU *et al.* 2016, QIAO *et al.* 2019). Thus, it should be further investigated which parameters of MP as for example particle size, additives or the way of exposure can be responsible for MP-induced oxidative stress in fish.

PS-MP did neither affect the AChE activity nor the activity of two CbEs of brown trout. Similar results were found for juvenile brown trout exposed to the same PS-MP (10<sup>4</sup> particles/L) for 96 h SCHMIEG *et al.* 2020. Furthermore, PS-MP (45 µm) did not cause alterations in the activity of AChE in zebrafish (CHEN *et al.* 2017). However, several studies showed that PE-MP (1–5 µm) reduced the AChE activity in common gobies significantly (OLIVEIRA *et al.* 2013, LUÍS *et al.* 2015, MIRANDA *et al.* 2019). Moreover, 30 days exposure to 200 µg/L fluorescent PE (70–88 µm) led to a significantly decreased AChE activity in the Amazonian discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*; WEN *et al.* 2018). Considering the different polymer types and organisms investigated, the size of the administered particles seems to be important as the most neurotoxic effects are reported for small MP or even nanoplastics (CHEN *et al.* 2017, DING *et al.* 2018).

Exposure to  $10^6$  PS-MP resulted in a minimal change in the resting behavior of trout larvae. However, it seems rather unlikely that this slight change is biologically relevant especially when considering the huge variation between the replicas. Furthermore, in the video tracking of brown trout fry, no differences in swimming and shoaling behavior were observed in response to MP exposure. Likewise, exposure of embryo and larvae of zebrafish to PE-MP (10–45  $\mu\text{m}$ ) did not affect the covered distance during darkness (CHEN *et al.* 2017). Exposure of Krefft's frillgobies (*Bathygobius krefftii*) to PE-MP (38–45  $\mu\text{m}$ ) via diet did not affect their boldness or exploration behavior (TOSETTO *et al.* 2017). Moreover, CRITCHELL & HOOGENBOOM (2018) observed that the feeding and aggression behavior of juvenile planktivorous fish (*Acanthochromis polyacanthus*) was not affected by polyethylene terephthalate (PET) MP (< 300  $\mu\text{m}$  and 2 mm). In addition, the foraging activity and survival facing predators of post-larvae surgeonfish (*Acanthurus triostegus*) was not affected by PS-MP (90  $\mu\text{m}$ ) exposure (JACOB *et al.* 2019). In contrast, juvenile black rockfish (*Sebastes schlegelii*) stayed more closely together when exposed to about  $10^6$  particles/L PS-MP (15  $\mu\text{m}$ ) than the control group. Furthermore, black rockfish exposed to PS-MP swam with reduced speed and showed both a diminished explorative behavior during search for food and an increased feeding time (YIN *et al.* 2018, YIN *et al.* 2019). In European sea bass exposed to MP (0.69 mg/L; 1–5  $\mu\text{m}$ ) a significantly reduced swimming velocity and resistance time (0.26 and 0.69 mg/L) until being dragged away by water flow was observed (BARBOZA *et al.* 2018). Moreover, PE-MP (1–5  $\mu\text{m}$  and 420–500  $\mu\text{m}$ ) led, depending on the influence of the environmental condition during development, to a significant reduction of the predatory performance in early juvenile of common goby (DE SÁ *et al.* 2015, MIRANDA *et al.* 2019). In two other studies investigating the effects of PE-MP (1–5  $\mu\text{m}$ ) in common gobies, a non-significant reduction of the post exposure predatory performance was observed (LUÍS *et al.* 2015, FONTE *et al.* 2016). Likewise, the predatory performance of juvenile barramundi (*Lates calcarifer*) was not influenced by PS-MP (97  $\mu\text{m}$ ) but the fish showed more curved swimming paths than control fish (GUVEN *et al.* 2018).

The factors that delimit effects of MP on the behavior of fish remain unclear. It does not seem that chemical properties of the polymer have a major importance as, for example, after exposure to PE-MP and PS-MP some studies found effects on the behavior of fish and some did not. It is possible that different size ranges or additives of the particles are responsible for the reported differences. Moreover, the discrepancies can be due to different sensitivity of the test species or the used study design.

In the present study, no biologically relevant effects of PS-MP on the development and behavior of brown trout were observed.

#### 4.3 Effects of Amitriptyline

In our experiment the survival of fish was not affected by the exposure to amitriptyline. However, the antidepressant led to a significantly reduced time until hatching. In common carp SEHONOVA *et al.* (2017) also observed a significant stimulation of hatching speed in fish exposed to 10, 100 and 500 µg/L amitriptyline. In addition, YANG *et al.* (2014) found that amitriptyline (1 ng up to 1 mg) reduced the time to hatch of zebrafish in a concentration-dependent manner. In contrast, higher concentrations of 3 mg/L amitriptyline led to an increased hatching time and a higher mortality in zebrafish (SEHONOVA *et al.* 2019a). This is, per se, not necessarily contradictory: In common carp, amitriptyline caused either developmental stimulation or retardation depending on the developmental stage and the concentration of the antidepressant (SEHONOVA *et al.* 2017). Based on these data, amitriptyline seems to stimulate hatching of fish in general but may also delay hatching at high concentrations. In the present study, no influence was found on the heart rate of the larvae. In contrast, the considerably higher concentration of 3 mg/L led to a reduced heart rate in zebrafish larvae (SEHONOVA *et al.* 2019a).

After two months, brown trout larvae exposed to amitriptyline were significantly smaller and weighted less than fish of the control group. YANG *et al.* (2014) reported that the body length of zebrafish was significantly reduced after exposure to concentrations as low as 100 ng/L amitriptyline for 120 h. WU *et al.* (2017) found only a slight but insignificant reduction in body size of zebrafish and a modulation of the expression of genes encoding early growth response factors after exposure to 0.1 µg/L amitriptyline for 120 h. Thus, amitriptyline affects the growth of different fish species which can influence the survival of the larvae. Another reason for growth effects might be behavioral changes that led to less food consumption.

Exposure to amitriptyline did not cause an alteration of the activity of SOD or the level of LPO in early life stages of brown trout. Likewise, amitriptyline led to only moderate or minor effects on the oxidative stress level of zebrafish during development: The transcription of glutathione S-transferase (GST), GPx, and SOD genes in zebrafish embryos was not significantly altered in response to the antidepressant (SEHONOVA *et al.* 2019b). Nonetheless, a significant upregulation of CAT mRNA formation in fish exposed to 30 µg/L amitriptyline was observed after 144 h (SEHONOVA *et al.* 2019b). In common carp, exposure to 10 µg/L amitriptyline during development had no effect on the activity of CAT, GPx, GST and cytosolic SOD or the amount of protein carbonylation (SEHONOVA *et al.* 2017). However, the antidepressant led to an increase in the level of LPO and in glutathione reductase activity (SEHONOVA *et al.* 2017). Furthermore, YANG *et al.* (2014) have found a significantly positive influence of 100 ng/L amitriptyline to the antioxidant capacity of zebrafish as the activities of both SOD and CAT were enhanced and the formation of

hydroxyl radicals and LPO was significantly suppressed. Nevertheless, in fish treated with higher amitriptyline concentrations the activity of SOD, CAT and peroxidase was found to be inhibited, and in zebrafish exposed to 1 mg/L amitriptyline the hydroxyl radical formation and the LPO level were significantly increased (YANG *et al.* 2014). Brown trout might be less susceptible to oxidative stress caused by the tricyclic antidepressant than common carp and zebrafish whereas the rather low amitriptyline concentrations applied in our study do not allow any predictions about effects of higher concentrations that caused hydroxyl radical formation and an increase of LPO level in zebrafish.

Amitriptyline is a neuroactive compound and has been shown to induce neurotoxic effects in human cell lines as well as in non-target organisms. In a neuroblastoma cell line 100 µM amitriptyline caused a total loss of viability in neurons and a 30% loss of viability in astrocytes (MANNERSTRÖM *et al.* 2006). SEHONOVA *et al.* (2017) observed neuronal dystrophy in common carp exposed to amitriptyline (lowest observed effect concentration 10 µg/L). Moreover, mRNA expression of genes related to the development of eyes and the central nervous system (*pax 6*) were significantly downregulated in zebrafish exposed to 30 µg/L amitriptyline (SEHONOVA *et al.* 2019a). In the present study, the antidepressant increased the activity of AChE and significantly inhibited two other CbEs in early life stages of brown trout. The two CbEs are involved in the detoxification of pollutants and are assumed to act in a protective way against AChE inhibiting pesticides (SANCHEZ-HERNANDEZ *et al.* 2009). An impact of amitriptyline on AChE activity is likely since amitriptyline was shown to act as a muscarinic acetylcholine receptor antagonist (SNYDER & YAMAMURA 1977). In human serum and erythrocyte ghosts, amitriptyline caused a decrease of the AChE activity (MÜLLER *et al.* 2002). However, to the best of our knowledge, our study was the first to investigate the effects of amitriptyline on the activities of AChE, CbE-pnpv, and CbE-pnpa in non-target organisms.

Considering its influence on neuronal processes and the general purpose of antidepressants to alter behavior, it is not surprising that amitriptyline caused also behavioral changes in non-target organisms. In our study fish showed altered resting and swimming behavior. Video tracking conditions in the used artificial system are rather stressful for the fish (ZIEGLER *et al.* 2020), therefore reduced velocity and covered distance can be interpreted as a result from an anxiolytic effect of amitriptyline. Even though it cannot be excluded that freezing behavior and, therefore, anxiogenic behavior increased the time of inactivity, it seems more probable that the effect was caused by the sedative effect of amitriptyline. Another possible explanation is that amitriptyline interfered with neuronal processes resulting in ataxic behavior, like looping or side swimming. Likewise, zebrafish exposed to 5 mg/L and 10 mg/L amitriptyline exhibited a significantly reduced maximal swimming velocity. Furthermore, 10 mg/L amitriptyline caused

ataxic movement, like swimming vertically or on the side (DEMIN *et al.* 2017). Moreover, exposure of adult zebrafish to 50 µg/L, 1 and 5 mg/L amitriptyline significantly reduced the time until fish entered the top in a novel tank test and increased the time they spent in the top region of the tank (DEMIN *et al.* 2017, MESHALKINA *et al.* 2018). MESHALKINA *et al.* (2018) also observed a reduction in the covered distance and mean velocity, and an increased meandering and angular velocity. In addition, decreased swimming activity was observed in zebrafish larvae treated with 100 µg/L amitriptyline in different exposure scenarios (HUANG *et al.* 2019). In another study, SEHONOVA *et al.* (2019a) observed that 300 µg/L amitriptyline resulted in a significantly decreased swimming distance of zebrafish in the dark and, when exposed to 3,000 µg/L amitriptyline, even in both dark and light conditions. Common carp exposed to 100 µg/L and 500 µg/L amitriptyline just floated apathetically and sank to the bottom of the aquarium (SEHONOVA *et al.* 2017).

Synoptically, our study revealed severe effects of amitriptyline on the behavior of brown trout at concentrations in the µg/L range (calculated average concentration of 48 µg/L amitriptyline). Even though also other antidepressants like citalopram (KELLNER *et al.* 2018, ZIEGLER *et al.* 2020), fluoxetine (PAINTER *et al.* 2009, MEIJIDE *et al.* 2018) or venlafaxine (PAINTER *et al.* 2009, MAULVAULT *et al.* 2018) exhibit an amitriptyline-analogous mode of action and have been shown to cause similar effects in non-target organisms our study was not designed to draw conclusions on the environmental risk of the antidepressant, since measured amitriptyline concentrations in surface waters are largely in the range of 22 ng/L (LAJEUNESSE *et al.* 2011, THOMAS *et al.* 2014, FERREY *et al.* 2015). To evaluate the ecotoxicological risk on non-target organisms, definitely further research on environmental relevant concentrations of amitriptyline as single substance and in combination with other antidepressants would be necessary. The focus of our study, however, was on the potential interactions of a psychoactive drug and MP.

#### 4.4 Co-Exposure of MP and Amitriptyline

In our experiment brown trout were co-exposed to amitriptyline and PS-MP. Like recently pointed out by HEINRICH *et al.* (2020) environmental pollutants are present both in liquid (water) and solid (e.g., MP) compartments. Co-exposure allows to establish an equilibrium in the overall system including water, MP, and organisms. Co-exposure of brown trout to MP plus amitriptyline led to the same effects as the exposure to amitriptyline alone and the amitriptyline concentrations in the water phase of the treatment groups showed no considerable difference. While the mortality and heart rate as well as the oxidative stress level were not affected, larvae hatched significantly earlier, were smaller and weighted less than control fish. Furthermore, the swimming behavior was altered, and the activity of AChE was increased while the activities of the two other tested CbEs were inhibited. Therefore, we did not find any indication for PS-MP to modulate the effects

of amitriptyline on the development and behavior of brown trout. Several studies reported that MP can alleviate some negative effects caused by other pollutants by reducing their bioavailability (LUÍS *et al.* 2015, CHEN *et al.* 2017, LI *et al.* 2020b). On the other hand, MP was reported to increase negative effects of other contaminants (OLIVEIRA *et al.* 2013, NEMATDOOST HAGHI & BANAEI 2017, LU *et al.* 2018). In our experiments, measured amitriptyline concentrations were only slightly lower in those exposure groups which also included MP. Nevertheless, the data basis of the chemical analytic seems to be too limited to draw clear conclusions about the sorption of amitriptyline to MP. Only few studies found, like the present study, no interaction between MP and pollutants (FERREIRA *et al.* 2016, SCHMIEG *et al.* 2020). However, it cannot be excluded that this might have been resulting from a bias against the publication of negative results (DE SÁ *et al.* 2018).

## 5 Conclusions

In our study PS-MP (< 50 µm up to 10<sup>6</sup> particles per liter) did not influence the development of brown trout. It is very likely that MP is not capable to pass the chorion so that the fish are protected until hatch. Therefore, it might be reasonable to focus on life stages that have hatched and started to feed on exogenous food. The only observed effect caused by MP in our experiment was a slight change in the resting behavior that occurred at the highest tested (but environmentally irrelevant) concentration. The biological relevance seems negligible considering the solely small change in behavior and the high variability among the replicas. The antidepressant amitriptyline affected development and behavior at considerably higher concentrations than reported in the environment. These effects were not modulated by the co-exposure of the antidepressant with PS-MP. Overall, no harmful effects were caused by PS-MP in the tested concentrations in brown trout and PS-MP did not modulate the effects of amitriptyline on fish. Nevertheless, these results do not allow to deduce a general statement about the risk of MP considering the complexity caused by different polymers, size classes, and additives reported in the environment as well as different sensitivities of affected organisms.

## Supplementary Materials

The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4441/12/9/2361/s1>, Table S1: Size ranges (in µm) and counted particle numbers (per mL) of polystyrene particles in the stock suspension. Table S2: Volume of changed test medium in each Petri dish/tank during experiment 1 and experiment 2. Table S3: Average measured water parameters of the experiment 1b. Table S4: Average measured water parameters of the experiment 2. Table S5: Operating parameters of the triple quadrupole MS (Agilent 6490 QqQ) in positive mode. Table S6: Specific measurement parameters for amitriptyline with LC-QqQ in water samples. Intraday variations (RSD) is

calculated with 1 µg/L standard (10 µL injection volume and 4 replicates (n)). Limit of quantification = LOQ. Table S7: Parameters for the determination of the lipid peroxide content in the different experiments. Table S8: Used data transformations for the statistical analysis. Table S9: Summary of all p-values of the single comparisons of the different endpoints. CRED reporting. Raw data experiment 1. Raw data experiment 2.

### **Acknowledgments**

We wish to thank Martin Jekel for the initiation and coordination of the MiWa project. For the scanning electron microscope analysis, we thank Monika Meinert and Oliver Betz. Furthermore, the authors wish to thank Michael Ziegler, Stefanie Jacob, Katharina Peschke, Simon Schwarz, Carla Lorenz, Paul Thellmann, Andreas Dieterich, Sabrina Wilhelm as well as Katharina Reitter, Lea Schuster and Aron Meral for help, discussion, and technical assistance. We acknowledge support by Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

### **Author Contributions**

Conceptualization: R.T., H.-R.K., and H.S.; methodology, H.S., S.K., S.T., A.S.R.; formal analysis, H.S.; investigation, H.S., J.K.Y.B., and S.T.; resources, H.-R.K., R.T., C.Z., and A.S.R.; data curation, H.S.; writing—original draft preparation, H.S. and S.T.; writing—review and editing, H.S., J.K.Y.B., S.K., A.S.R., S.T., C.Z., H.-R.K., and R.T.; visualization, H.S.; supervision, R.T., C.Z., and H.-R.K.; project administration, R.T.; funding acquisition, R.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### **Funding**

This research was funded by the German Federal Ministry of Education and Research, Support Code: 02WRS1378. The experiments were conducted within the joint project MiWa (Microplastics in the water cycle—sampling, sample preparation, analytics, occurrence, removal, and assessment).

### **References**

- ALLEN S., ALLEN D., PHOENIX V. R., LE ROUX G., DURÁNTEZ JIMÉNEZ P., SIMONNEAU A., BINET S. AND GALOP D. (2019). "Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment." *Nature Geoscience* **12**(5): 339-344.
- BAENA-NOGUERAS R. M., GONZÁLEZ-MAZO E. AND LARA-MARTÍN P. A. (2017). "Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: photolysis vs biodegradation." *Science of The Total Environment* **590-591**: 643-654.
- BAKER D. R. AND KASPRZYK-HORDERN B. (2013). "Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments." *Science of The Total Environment* **454-455**: 442-456.

- BAKIR A., O'CONNOR I. A., ROWLAND S. J., HENDRIKS A. J. AND THOMPSON R. C. (2016). "Relative importance of microplastics as a pathway for the transfer of hydrophobic organic chemicals to marine life." Environmental Pollution **219**: 56-65.
- BARBOZA L. G. A., VIEIRA L. R. AND GUILHERMINO L. (2018). "Single and combined effects of microplastics and mercury on juveniles of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*): Changes in behavioural responses and reduction of swimming velocity and resistance time." Environmental Pollution **236**: 1014-1019.
- BATEL A., LINTI F., SCHERER M., ERDINGER L. AND BRAUNBECK T. (2016). "Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants." Environmental Toxicology and Chemistry **35**(7): 1656-1666.
- BECKINGHAM B. AND GHOSH U. (2017). "Differential bioavailability of polychlorinated biphenyls associated with environmental particles: Microplastic in comparison to wood, coal and biochar." Environmental Pollution **220**: 150-158.
- BENJAMINI Y. AND HOCHBERG Y. (1995). "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing." Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological) **57**(1): 289-300.
- BREYER-PFAFF U. (2004). "The metabolic fate of amitriptyline, nortriptyline and amitriptylinoxide in man." Drug Metabolism Reviews **36**(3-4): 723-746.
- CHANG P.-H., JIANG W.-T., LI Z., KUO C.-Y., JEAN J.-S., CHEN W.-R. AND LV G. (2014). "Mechanism of amitriptyline adsorption on Ca-montmorillonite (SAz-2)." Journal of Hazardous Materials **277**: 44-52.
- CHEN Q., GUNDLACH M., YANG S., JIANG J., VELKI M., YIN D. AND HOLLERT H. (2017). "Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity." Science of The Total Environment **584-585**: 1022-1031.
- CHENG J., FLAHAUT E. AND CHENG S. H. (2007). "Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos." Environmental Toxicology and Chemistry **26**(4): 708-716.
- CHOCKALINGAM R., GOTT B. M. AND CONWAY C. R. (2019). Tricyclic antidepressants and monoamine oxidase Inhibitors: are they too old for a new look? Antidepressants: From Biogenic Amines to New Mechanisms of Action. M. Macaluso and S. H. Preskorn. Cham, Switzerland, Springer. **250**: 37-48.
- CLAESSENS M., MEESTER S. D., LANDUYT L. V., CLERCK K. D. AND JANSSEN C. R. (2011). "Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast." Marine Pollution Bulletin **62**(10): 2199-2204.
- CRITCHELL K. AND HOOGENBOOM M. O. (2018). "Effects of microplastic exposure on the body condition and behaviour of planktivorous reef fish (*Hoogen*)." PLOS ONE **13**(3): e0193308.
- DAVID A., LANGE A., TYLER C. R. AND HILL E. M. (2018). "Concentrating mixtures of neuroactive pharmaceuticals and altered neurotransmitter levels in the brain of fish exposed to a wastewater effluent." Science of The Total Environment **621**: 782-790.
- DE SÁ L. C., LUÍS L. G. AND GUILHERMINO L. (2015). "Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions." Environmental Pollution **196**: 359-362.
- DE SÁ L. C., OLIVEIRA M., RIBEIRO F., ROCHA T. L. AND FUTTER M. N. (2018). "Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future?" Science of The Total Environment **645**: 1029-1039.
- DEMIN K. A., KOLESNIKOVA T. O., KHATSKO S. L., MESHALKINA D. A., EFIMOVA E. V., MORZHERIN Y. Y. AND KALUEFF A. V. (2017). "Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes." Neurotoxicology and Teratology **62**: 27-33.
- DING J., ZHANG S., RAZANAJATOVO R. M., ZOU H. AND ZHU W. (2018). "Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Environmental Pollution **238**: 1-9.

- DRIS R., GASPERI J., MIRANDE C., MANDIN C., GUERROUACHE M., LANGLOIS V. AND TASSIN B. (2017). "A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments." Environmental Pollution **221**: 453-458.
- DRIS R., IMHOF H., SANCHEZ W., GASPERI J., GALGANI F., TASSIN B. AND LAFORSCH C. (2015). "Beyond the ocean: contamination of freshwater ecosystems with (micro-) plastic particles." Environmental Chemistry **12**(5): 539-550.
- EITZEN L., PAUL S., BRAUN U., ALTMANN K., JEKEL M. AND RUHL A. S. (2019). "The challenge in preparing particle suspensions for aquatic microplastic research." Environmental Research **168**: 490-495.
- ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. AND FEATHERSTONE R. M. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochemical Pharmacology **7**(2): 88-95.
- EU (2006). "Council Directive 2006/88/EC." Official Journal of the European Union **L 328**: 14-56.
- FENT K., WESTON A. A. AND CAMINADA D. (2006). "Ecotoxicology of human pharmaceuticals." Aquatic Toxicology **76**(2): 122-159.
- FERREIRA P., FONTE E., SOARES M. E., CARVALHO F. AND GUILHERMINO L. (2016). "Effects of multi-stressors on juveniles of the marine fish *Pomatoschistus microps*: Gold nanoparticles, microplastics and temperature." Aquatic Toxicology **170**: 89-103.
- FERREY M. L., HEISKARY S., GRACE R., HAMILTON M. C. AND LUECK A. (2015). "Pharmaceuticals and other anthropogenic tracers in surface water: A randomized survey of 50 Minnesota lakes." Environmental Toxicology and Chemistry **34**(11): 2475-2488.
- FONTE E., FERREIRA P. AND GUILHERMINO L. (2016). "Temperature rise and microplastics interact with the toxicity of the antibiotic cefalexin to juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Post-exposure predatory behaviour, acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation." Aquatic Toxicology **180**: 173-185.
- GRIERSON J. P. AND NEVILLE A. C. (1981). "Helicoidal architecture of fish eggshell." Tissue and Cell **13**(4): 819-830.
- GUILHERMINO L., VIEIRA L. R., RIBEIRO D., TAVARES A. S., CARDOSO V., ALVES A. AND ALMEIDA J. M. (2018). "Uptake and effects of the antimicrobial florfenicol, microplastics and their mixtures on freshwater exotic invasive bivalve *Corbicula fluminea*." Science of The Total Environment **622-623**: 1131-1142.
- GUVEN O., BACH L., MUNK P., DINH K. V., MARIANI P. AND NIELSEN T. G. (2018). "Microplastic does not magnify the acute effect of PAH pyrene on predatory performance of a tropical fish (*Lates calcarifer*)." Aquatic Toxicology **198**: 287-293.
- HANSCH C., LEO A. AND HOEKMAN D. (1995). Exploring QSAR - hydrophobic, electronic, and steric constants. Washington, DC, American Chemical Society.
- HEINRICH P., HANSLIK L., KÄMMER N. AND BRAUNBECK T. (2020). "The tox is in the detail: technical fundamentals for designing, performing, and interpreting experiments on toxicity of microplastics and associated substances." Environmental Science and Pollution Research **27**(18): 22292-22318.
- HERMES-LIMA M., WILLMORE W. G. AND STOREY K. B. (1995). "Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation." Free Radical Biology and Medicine **19**(3): 271-280.
- HUANG I. J., SIROTKIN H. I. AND MCELROY A. E. (2019). "Varying the exposure period and duration of neuroactive pharmaceuticals and their metabolites modulates effects on the visual motor response in zebrafish (*Danio rerio*) larvae." Neurotoxicology and Teratology **72**: 39-48.
- JACOB H., GILSON A., LANCTÔT C., BESSON M., METIAN M. AND LECCHINI D. (2019). "No Effect of Polystyrene Microplastics on Foraging Activity and Survival in a Post-larvae Coral-Reef Fish, *Acanthurus triostegus*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **102**(4): 457-461.

- JANG S.-W., LIU X., CHAN C.-B., WEINSHENKER D., HALL R. A., XIAO G. AND YE K. (2009). "Amitriptyline is a TrkA and TrkB receptor agonist that promotes TrkA/TrkB heterodimerization and has potent neurotrophic activity." Chemistry & Biology **16**(6): 644-656.
- KARAMI A., ROMANO N., GALLOWAY T. AND HAMZAH H. (2016). "Virgin microplastics cause toxicity and modulate the impacts of phenanthrene on biomarker responses in African catfish (*Clarias gariepinus*)."  
Environmental Research **151**: 58-70.
- KELLNER M., PORSERYD T., PORSCH-HÄLLSTRÖM I., BORG B., ROUFIDOU C. AND OLSÉN K. H. (2018). "Developmental exposure to the SSRI citalopram causes long-lasting behavioural effects in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)."  
Ecotoxicology **27**(1): 12-22.
- KILLEEN J., MCLAY H. A. AND JOHNSTON I. A. (1999). "Development in *Salmo trutta* at different temperatures, with a quantitative scoring method for intraspecific comparisons." Journal of Fish Biology **55**(2): 382-404.
- KLEMETSEN A., AMUNDSEN P.-A., DEMPSON J. B., JONSSON N., JONSSON B., O'CONNELL M. AND MORTENSEN E. (2003). "Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories." Ecology of freshwater fish **12**(1): 1-59.
- KOELMANS A. A., BAKIR A., BURTON G. A. AND JANSSEN C. R. (2016). "Microplastic as a vector for chemicals in the aquatic environment: Critical review and model-supported reinterpretation of empirical studies." Environmental Science & Technology **50**(7): 3315-3326.
- LAJEUNESSE A., GAGNON C., GAGNÉ F., LOUIS S., ČEJKA P. AND SAUVÉ S. (2011). "Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment – Evidence of biological effects." Chemosphere **83**(4): 564-571.
- LAJEUNESSE A., GAGNON C. AND SAUVÉ S. (2008). "Determination of basic antidepressants and their N-Desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry." Analytical Chemistry **80**(14): 5325-5333.
- LEI L., WU S., LU S., LIU M., SONG Y., FU Z., SHI H., RALEY-SUSMAN K. M. AND HE D. (2018). "Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*." Science of The Total Environment **619-620**: 1-8.
- LEMOINE C. M. R., KELLEHER B. M., LAGARDE R., NORTHAM C., ELEBUTE O. O. AND CASSONE B. J. (2018). "Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing zebrafish (*Danio rerio*)."  
Environ Pollut **243**(Pt A): 591-600.
- LESLIE H. A., BRANDSMA S. H., VAN VELZEN M. J. M. AND VETHAAK A. D. (2017). "Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota." Environment International **101**: 133-142.
- LI C., BUSQUETS R. AND CAMPOS L. C. (2020a). "Assessment of microplastics in freshwater systems: A review." Science of The Total Environment **707**: 135578.
- LI Y., WANG J., YANG G., LU L., ZHENG Y., ZHANG Q., ZHANG X., TIAN H., WANG W. AND RU S. (2020b). "Low level of polystyrene microplastics decreases early developmental toxicity of phenanthrene on marine medaka (*Oryzias melastigma*)."  
Journal of Hazardous Materials **385**: 121586.
- LITHNER D., DAMBERG J., DAVE G. AND LARSSON Å. (2009). "Leachates from plastic consumer products – Screening for toxicity with *Daphnia magna*." Chemosphere **74**(9): 1195-1200.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- LU K., QIAO R., AN H. AND ZHANG Y. (2018). "Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*)."  
Chemosphere **202**: 514-520.
- LU Y., ZHANG Y., DENG Y., JIANG W., ZHAO Y., GENG J., DING L. AND REN H. (2016). "Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver." Environmental Science & Technology **50**(7): 4054-4060.

- LUÍS L. G., FERREIRA P., FONTE E., OLIVEIRA M. AND GUILHERMINO L. (2015). "Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium(VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations." *Aquatic Toxicology* **164**: 163-174.
- LV G., STOCKWELL C., NILES J., MINEGAR S., LI Z. AND JIANG W.-T. (2013). "Uptake and retention of amitriptyline by kaolinite." *Journal of Colloid and Interface Science* **411**: 198-203.
- MA L.-D., LI J., LI J.-J., LIU M., YAN D.-Z., SHI W.-Y. AND XU G. (2018). "Occurrence and source analysis of selected antidepressants and their metabolites in municipal wastewater and receiving surface water." *Environmental Science: Processes & Impacts* **20**(7): 1020-1029.
- MALAFIA G., DE SOUZA A. M., PEREIRA A. C., GONÇALVES S., DA COSTA ARAÚJO A. P., RIBEIRO R. X. AND ROCHA T. L. (2020). "Developmental toxicity in zebrafish exposed to polyethylene microplastics under static and semi-static aquatic systems." *Science of The Total Environment* **700**: 134867.
- MANNERSTRÖM M., TOIMELA T., YLIKOMI T. AND TÄHTI H. (2006). "The combined use of human neural and liver cell lines and mouse hepatocytes improves the predictability of the neurotoxicity of selected drugs." *Toxicology Letters* **165**(2): 195-202.
- MARKWELL M. A. K., HAAS S. M., BIEBER L. L. AND TOLBERT N. E. (1978). "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples." *Analytical Biochemistry* **87**(1): 206-210.
- MATTSSON K., JOHNSON E. V., MALMENDAL A., LINSE S., HANSSON L.-A. AND CEDERVALL T. (2017). "Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain." *Scientific reports* **7**(1): 11452.
- MAULVAULT A. L., SANTOS L. H. M. L. M., PAULA J. R., CAMACHO C., PISSARRA V., FOGAÇA F., BARBOSA V., ALVES R., FERREIRA P. P., BARCELÓ D., RODRIGUEZ-MOZAZ S., MARQUES A., DINIZ M. AND ROSA R. (2018). "Differential behavioural responses to venlafaxine exposure route, warming and acidification in juvenile fish (*Argyrosomus regius*)." *Science of The Total Environment* **634**: 1136-1147.
- MAZURAS D., ERNANDE B., QUAZUGUEL P., SEVERE A., HUELVAN C., MADEC L., MOUCHEL O., SOUDANT P., ROBBENS J., HUVET A. AND ZAMBONINO-INFANTE J. (2015). "Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae." *Marine Environmental Research* **112**: 78-85.
- MEIJDE F. J., DA CUÑA R. H., PRIETO J. P., DORELLE L. S., BABAY P. A. AND LO NOSTRO F. L. (2018). "Effects of waterborne exposure to the antidepressant fluoxetine on swimming, shoaling and anxiety behaviours of the mosquitofish *Gambusia holbrooki*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **163**: 646-655.
- MESHALKINA D. A., KYSIL E. V., ANTONOVA K. A., DEMIN K. A., KOLESNIKOVA T. O., KHATSKO S. L., GAINETDINOV R. R., ALEKSEVA P. A. AND KALUEFF A. V. (2018). "The effects of chronic amitriptyline on zebrafish behavior and monoamine neurochemistry." *Neurochemical Research* **43**(6): 1191-1199.
- MIRANDA T., VIEIRA L. R. AND GUILHERMINO L. (2019). "Neurotoxicity, behavior, and lethal effects of cadmium, microplastics, and their mixtures on *Pomatoschistus microps* juveniles from two wild populations exposed under laboratory conditions—implications to environmental and human risk assessment." *International Journal of Environmental Research and Public Health* **16**(16): 2857.
- MOERMOND C. T. A., KASE R., KORKARIC M. AND ÅGERSTRAND M. (2016). "CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data." *Environmental Toxicology and Chemistry* **35**(5): 1297-1309.
- MOHAMMED A. (2013). Why are early life stages of aquatic organisms more sensitive to toxicants than adults? New insights into toxicity and drug testing. S. J. T. Gowder. London, IntechOpen: 49-62.
- MONSERRAT J. M., GERACTANO L. A., PINHO G. L. L., VINAGRE T. M., FALEIROS M., ALCIATI J. C. AND BIANCHINI A. (2003). "Determination of Lipid Peroxides in Invertebrates Tissues Using the Fe(III) Xylenol Orange Complex Formation." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **45**(2): 177-183.
- MUIR D., SIMMONS D., WANG X., PEART T., VILLELLA M., MILLER J. AND SHERRY J. (2017). "Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care product chemicals in fish exposed to wastewater effluent in an urban wetland." *Scientific reports* **7**(1): 16999-16999.

- MÜLLER T. C., ROCHA J. B. T., MORSCH V. M., NEIS R. T. AND SCHETINGER M. R. C. (2002). "Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1587**(1): 92-98.
- NEMATDOOST HAGHI B. AND BANAEI M. (2017). "Effects of micro-plastic particles on paraquat toxicity to common carp (*Cyprinus carpio*): biochemical changes." International Journal of Environmental Science and Technology **14**(3): 521-530.
- NGUYEN T., SHAPIRO D. A., GEORGE S. R., SETOLA V., LEE D. K., CHENG R., RAUSER L., LEE S. P., LYNCH K. R., ROTH B. L. AND DOWD B. F. (2001). "Discovery of a novel member of the histamine receptor family." Molecular Pharmacology **59**(3): 427.
- OECD (1998). Test no. 212: fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages.
- OLIVEIRA M., RIBEIRO A., HYLLAND K. AND GUILHERMINO L. (2013). "Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae)." Ecological Indicators **34**: 641-647.
- PAINTER M. M., BUERKLEY M. A., JULIUS M. L., VAJDA A. M., NORRIS D. O., BARBER L. B., FURLONG E. T., SCHULTZ M. M. AND SCHOENFUSS H. L. (2009). "Antidepressants at environmentally relevant concentrations affect predator avoidance behavior of larval fathead minnows (*Pimephales promelas*)." Environ Toxicol Chem **28**(12): 2677-2684.
- PEEKEN I., PRIMPKE S., BEYER B., GÜTERMANN J., KATLEIN C., KRUMPEN T., BERGMANN M., HEHEMANN L. AND GERDTS G. (2018). "Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic." Nature Communications **9**(1): 1505.
- PIEHL S., LEIBNER A., LÖDER M. G. J., DRIS R., BOGNER C. AND LAFORSCH C. (2018). "Identification and quantification of macro- and microplastics on an agricultural farmland." Scientific reports **8**(1): 17950.
- QIAO R., SHENG C., LU Y., ZHANG Y., REN H. AND LEMOS B. (2019). "Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish." Science of The Total Environment **662**: 246-253.
- QIU W., WU M., LIU S., CHEN B., PAN C., YANG M. AND WANG K.-J. (2017). "Suppressive immunoregulatory effects of three antidepressants via inhibition of the nuclear factor- $\kappa$ B activation assessed using primary macrophages of carp (*Cyprinus carpio*)." Toxicology and Applied Pharmacology **322**: 1-8.
- RAULT M., COLLANGE B., MAZZIA C. AND CAPOWIEZ Y. (2008). "Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion." Soil Biology and Biochemistry **40**(12): 3086-3091.
- REHSE S., KLOAS W. AND ZARFL C. (2018). "Microplastics reduce short-term effects of environmental contaminants. Part I: Effects of bisphenol A on freshwater zooplankton are lower in presence of polyamide particles." International Journal of Environmental Research and Public Health **15**(2): 280.
- RUDORFER M. V. AND POTTER W. Z. (1999). "Metabolism of tricyclic antidepressants." Cellular and Molecular Neurobiology **19**(3): 373-409.
- SANCHEZ-HERNANDEZ J. C., MAZZIA C., CAPOWIEZ Y. AND RAULT M. (2009). "Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **150**(4): 503-511.
- SANDERSON H., JOHNSON D. J., WILSON C. J., BRAIN R. A. AND SOLOMON K. R. (2003). "Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening." Toxicology Letters **144**(3): 383-395.
- SCHIAVO S., OLIVIERO M., ROMANO V., DUMONTET S., MANZO S. AND LIU G. (2018). "Ecotoxicological assessment of virgin plastic pellet leachates in freshwater matrices." Journal of Environmental Accounting and Management **6**: 345-353.
- SCHMIDT-POSTHAUS H., BERNET D., WAHLI T. AND BURKHARDT-HOLM P. (2001). "Morphological organ alterations and infectious diseases in brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to polluted river water." Diseases of Aquatic Organisms **44**(3): 161-170.

- SCHMIEG H., HUPPERTSBERG S., KNEPPER T. P., KRAIS S., REITTER K., REZBACH F., RUHL A. S., KÖHLER H.-R. AND TRIEBSKORN R. (2020). "Polystyrene microplastics do not affect juvenile brown trout (*Salmo trutta f. fario*) or modulate effects of the pesticide methiocarb." Environmental Sciences Europe **32**(1): 49.
- SCHWABE U., PAFFRATH D., LUDWIG W.-D. AND KLAUBER J. (2019). *Arzneiverordnungs-Report 2019 - Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Berlin, Germany, Springer.
- SEHONOVA P., HODKOVICOVA N., URBANOVA M., ÖRN S., BLAHOVA J., SVOBODOVA Z., FALDYNA M., CHLOUPEK P., BRIEDIKOVA K. AND CARLSSON G. (2019a). "Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians." Environmental Pollution **254**: 112999.
- SEHONOVA P., PLHALOVA L., BLAHOVA J., DOUBKOVA V., MARSALEK P., PROKES M., TICHY F., SKLADANA M., FIORINO E., MIKULA P., VECEREK V., FAGGIO C. AND SVOBODOVA Z. (2017). "Effects of selected tricyclic antidepressants on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio*)." Chemosphere **185**: 1072-1080.
- SEHONOVA P., ZIKOVA A., BLAHOVA J., SVOBODOVA Z., CHLOUPEK P. AND KLOAS W. (2019b). "mRNA expression of antioxidant and biotransformation enzymes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to the tricyclic antidepressant amitriptyline." Chemosphere **217**: 516-521.
- SNYDER S. H. AND YAMAMURA H. I. (1977). "Antidepressants and the muscarinic acetylcholine receptor." Archives of General Psychiatry **34**(2): 236-239.
- THOMAS K. V., DA SILVA F. M. A., LANGFORD K. H., DE SOUZA A. D. L., NIZZETO L. AND WAICHMAN A. V. (2014). "Screening for selected human pharmaceuticals and cocaine in the urban streams of Manaus, Amazonas, Brazil." JAWRA Journal of the American Water Resources Association **50**(2): 302-308.
- TOGOLA A. AND BUDZINSKI H. (2008). "Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples." Journal of Chromatography A **1177**(1): 150-158.
- TOSETTO L., WILLIAMSON J. E. AND BROWN C. (2017). "Trophic transfer of microplastics does not affect fish personality." Animal Behaviour **123**: 159-167.
- TRIEBSKORN R., BRAUNBECK T., GRUMMT T., HANSLIK L., HUPPERTSBERG S., JEKEL M., KNEPPER T. P., KRAIS S., MÜLLER Y. K., PITTROFF M., RUHL A. S., SCHMIEG H., SCHÜR C., STROBEL C., WAGNER M., ZUMBÜLTE N. AND KÖHLER H.-R. (2019). "Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review." TrAC Trends in Analytical Chemistry **110**: 375-392.
- VAN POMEREN M., BRUN N. R., PEIJNENBURG W. J. G. M. AND VIJVER M. G. (2017). "Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages." Aquatic Toxicology **190**: 40-45.
- VIANELLO A., JENSEN R. L., LIU L. AND VOLLERTSEN J. (2019). "Simulating human exposure to indoor airborne microplastics using a Breathing Thermal Manikin." Scientific reports **9**(1): 8670.
- WAGNER M., SCHERER C., ALVAREZ-MUÑOZ D., BRENNHOLT N., BOURRAIN X., BUCHINGER S., FRIES E., GROSBOIS C., KLASMEIER J., MARTI T., RODRIGUEZ-MOZAS S., URBATZKA R., VETHAAK A. D., WINTHER-NIELSEN M. AND REIFFERSCHIED G. (2014). "Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know." Environmental Sciences Europe **26**(1): 12.
- WANG F., WONG C. S., CHEN D., LU X., WANG F. AND ZENG E. Y. (2018). "Interaction of toxic chemicals with microplastics: A critical review." Water Research **139**: 208-219.
- WANG W., NDUNGU A. W., LI Z. AND WANG J. (2017). "Microplastics pollution in inland freshwaters of China: A case study in urban surface waters of Wuhan, China." Science of The Total Environment **575**: 1369-1374.
- WEN B., ZHANG N., JIN S.-R., CHEN Z.-Z., GAO J.-Z., LIU Y., LIU H.-P. AND XU Z. (2018). "Microplastics have a more profound impact than elevated temperatures on the predatory performance, digestion and energy metabolism of an Amazonian cichlid." Aquatic Toxicology **195**: 67-76.
- WU M., LIU S., HU L., QU H., PAN C., LEI P., SHEN Y. AND YANG M. (2017). "Global transcriptomic analysis of zebrafish in response to embryonic exposure to three antidepressants, amitriptyline, fluoxetine and mianserin." Aquatic Toxicology **192**: 274-283.

### Wissenschaftliche Arbeiten: Kapitel III

YANG M., QIU W., CHEN J., ZHAN J., PAN C., LEI X. AND WU M. (2014). "Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline." *Aquatic Toxicology* **151**: 68-76.

YIN L., CHEN B., XIA B., SHI X. AND QU K. (2018). "Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacobever (*Sebastes schlegelii*)." *Journal of Hazardous Materials* **360**: 97-105.

YIN L., LIU H., CUI H., CHEN B., LI L. AND WU F. (2019). "Impacts of polystyrene microplastics on the behavior and metabolism in a marine demersal teleost, black rockfish (*Sebastes schlegelii*)." *Journal of Hazardous Materials* **380**: 120861.

ZIARRUSTA H., MIJANGOS L., IZAGIRRE U., PLASSMANN M. M., BENSKIN J. P., ANAKABE E., OLIVARES M. AND ZULOAGA O. (2017). "Bioconcentration and biotransformation of amitriptyline in gilt-head bream." *Environmental Science & Technology* **51**(4): 2464-2471.

ZIEGLER M., KNOLL S., KÖHLER H. R., TISLER S., HUHN C., ZWIENER C. AND TRIEBSKORN R. (2020). "Impact of the antidepressant citalopram on the behaviour of two different life stages of brown trout." *PeerJ* **8**: e8765.

# Kapitel IV: Effects of the Antidepressant Amitriptyline on Juvenile Brown Trout and their Modulation by Microplastics

HANNAH SCHMIEG<sup>a</sup>, STEFANIE KRAIS<sup>a</sup>, KATHRIN KÜBLER<sup>a</sup>, AKI S. RUHL<sup>b,c</sup>, ISABELLE M. SCHMIDGALL<sup>a</sup>, CHRISTIAN ZWIENER<sup>d</sup>, HEINZ-R. KÖHLER<sup>a</sup> and RITA TRIEBSKORN<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, 72076 Tübingen, Germany

<sup>b</sup> Chair of Water Quality Control, Technische Universität Berlin, Sekr. KF 4, Str. des 17. Juni 135, 10623 Berlin, Germany

<sup>c</sup> German Environment Agency (UBA), Section II 3.1 (National and International Development of Drinking Water Quality and Resource Protection), Schichauweg 58, 12307 Berlin, Germany

<sup>d</sup> Environmental Analytical Chemistry, Center for Applied Geoscience, University of Tübingen, Schnarrenbergstr.94-96, 72076 Tübingen, Germany

<sup>e</sup> Steinbeis Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstr. 13, 72108 Rottenburg, Germany

Published in: Toxics (2022) **10**(12): 763, <https://doi.org/10.3390/toxics10120763>

## Abstract

Pharmaceuticals like antidepressants are designed to be bioactive at low concentrations. According to their mode of action they can also influence non-target organisms due to the phylogenetic conservation of molecular targets. Beside the pollution by environmental chemicals, the topic of microplastics (MP) in the aquatic environment came into focus of scientific and public interest. The aim of the present study was to investigate the influence of the antidepressant amitriptyline in presence and absence of irregularly shaped polystyrene MP as well as the effects of MP alone on juvenile brown trout (*Salmo trutta f. fario*). Fish were exposed to different concentrations of amitriptyline (nominal concentrations between 1 and 1,000 µg/L) and two concentrations of MP (10<sup>4</sup> and 10<sup>5</sup> particles/L; <50 µm) for three weeks. Tissue cortisol concentration, oxidative stress, the activity of two carboxylesterases and of acetylcholinesterase were assessed. Furthermore, the swimming behavior was analyzed in situations with different stress levels. Exposure to amitriptyline altered the behavior and increased the activity of acetylcholinesterase. Moreover, nominal amitriptyline concentrations above 300 µg/L caused severe acute adverse effects in fish. MP alone did not affect any of the investigated endpoints. Co-exposure caused largely similar effects like the exposure to solely amitriptyline. However, the effect of amitriptyline on the swimming behavior during the experiment was alleviated by the higher MP concentration.

## Keywords

Microplastics; Polystyrene; Antidepressant; Amitriptyline; Brown trout; Behavior; Oxidative stress; Acetylcholinesterase; Cortisol

## 1 Introduction

Depression is a common chronic disease in humans and the number of reported cases has increased dramatically worldwide in the last 30 years (LIU *et al.* 2020). Consequently, the consumption of antidepressants in OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) countries has doubled between 2000 and 2017 (OECD 2019a). Tricyclic antidepressants which are non-selective monoamine re-uptake inhibitors were among the first pharmaceuticals used to treat depressions (CHOCKALINGAM *et al.* 2019, SCHWABE *et al.* 2019). Amitriptyline is the most prescribed tricyclic antidepressant and the fifth most used antidepressant in total in Germany with a prescription rate of 80 million defined daily doses in 2018 (BREYER-PFAFF 2004, SCHWABE *et al.* 2019). Beside treating depressions, amitriptyline is used for migraine prophylaxis and treatment of chronic pain (SCHWABE *et al.* 2019). The mode of action of amitriptyline is the inhibition of the re-uptake of serotonin, noradrenaline and – considerably less effectively – dopamine, thereby increasing the time of the respective neurotransmitters in the synaptic cleft (TATSUMI *et al.* 1997). Interactions of amitriptyline with other receptors are also known, as for example with muscarinic acetylcholine receptors (SNYDER & YAMAMURA 1977), histamine receptors (NGUYEN *et al.* 2001) or neurotrophic tyrosine kinase A/B receptors (JANG *et al.* 2009).

Residues of pharmaceuticals and their metabolites enter the environment mainly via wastewater and are regularly detected in surface waters worldwide (SANDERSON *et al.* 2003, FENT *et al.* 2006). In effluents of wastewater treatment plants in the UK concentrations up to 357 ng/L amitriptyline have been measured (KASPRZYK-HORDERN *et al.* 2009). The antidepressant can also be detected worldwide in lakes and rivers in concentrations of up to 71 ng/L (LAJEUNESSE *et al.* 2008, BAKER & KASPRZYK-HORDERN 2013, THOMAS *et al.* 2014, AMINOT *et al.* 2015, FERREY *et al.* 2015, WU *et al.* 2015). In a Brazil river basin amitriptyline concentrations up to 196 ng/L were reported (PIVETTA *et al.* 2020). Furthermore, residues of the tricyclic antidepressant were detected in ground water in China (XIANG *et al.* 2018) and even in drinking water in France (TOGOLA & BUDZINSKI 2008).

Effects of pharmaceuticals in aquatic non-target organisms are likely since pharmaceuticals are often rather stable in the environment and bioactive in low concentrations (SANDERSON *et al.* 2003, FENT *et al.* 2006, BERKNER & THIERBACH 2014). Furthermore, molecular targets for pharmaceuticals are present in many species (VERBRUGGEN *et al.* 2017). Like in humans, amitriptyline was shown

to influence serotonin, noradrenalin, and dopamine levels in the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*; DEMIN *et al.* 2017, MESHALKINA *et al.* 2018). Additionally, changes in behavior have been observed in zebrafish and brown trout (*Salmo trutta f. fario*) exposed to the antidepressant: the fish showed altered resting behavior, reduced swimming activity covering less distance, and even ataxic behavior like looping. Furthermore, swimming on the side or in a vertical position occurred in amitriptyline-exposed fish (DEMIN *et al.* 2017, MESHALKINA *et al.* 2018, HUANG *et al.* 2019, SEHONOVA *et al.* 2019, SCHMIEG *et al.* 2020a). Beside these effects, the antidepressant was shown to affect the growth and development of zebrafish (YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2019), common carp (*Cyprinus carpio*; SEHONOVA *et al.* 2017), and brown trout (SCHMIEG *et al.* 2020a). Moreover, amitriptyline has been reported to modulate the immune response of fish (YANG *et al.* 2014, QIU *et al.* 2017), affecting their oxidative stress level (YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2017, SEHONOVA *et al.* 2019) and influencing their acetylcholinesterase activity (SCHMIEG *et al.* 2020a). Most of these studies have been performed with zebrafish and common carp, while little is known about possible effects in other fish species. Furthermore, the studies investigated predominantly effects *in vitro* or on early life stages while data on other life stages are limited.

In addition to dissolved chemicals, microplastics (MP) as a potential environmental stressor has moved into focus of scientific and public interest in recent years. MP are detected ubiquitously in the environment, even in areas without apparent anthropogenic influence (e.g. LESLIE *et al.* 2017, WANG *et al.* 2017, ALLEN *et al.* 2019, GRBIĆ *et al.* 2020, BERGMANN *et al.* 2022). According to LI *et al.* (2020a) worldwide concentrations between 0.00012 and 2867 particles/L have been reported in surface waters. Without further strategies to reduce the plastic emissions, the annual rate of MP entering the environment is assumed to increase during the next decades (LAU *et al.* 2020).

The environmental risk related to MP is a matter of discussion since many factors like polymer type, size, age, shape, quantity, and quality of additives influence their effects on organisms. Furthermore, the possible interactions of MP with other contaminants and the different susceptibility of different feeding types of exposed organisms are of crucial relevance for potential effects and increase the uncertainty of risk assessment for MP. Mechanical effects of MP can lead to anorexia in fish (DE SALES-RIBEIRO *et al.* 2020), to oxidative stress or inflammation (e.g. QIAO *et al.* 2019, SOLOMANDO *et al.* 2021, LIU *et al.* 2022). Current opinion assigns most environmental relevance to small MP or even nano-sized particles, as they can be taken up by cells (TRIEBSKORN *et al.* 2019, BATEL *et al.* 2020). Moreover, MP have also been considered as a source of soluble contaminants since additives or residual monomers can leak from the particles (LITHNER *et al.* 2009, SCHIAVO *et al.* 2018). Furthermore, MP have been shown to amplify effects of dissolved environmental chemicals, as e.g. of paraquat (NEMATDOOST HAGHI & BANAEI 2017),

butylated hydroxyanisole (ZHAO *et al.* 2020) or pyrene (OLIVEIRA *et al.* 2013). On the other hand, sorption of pollutants onto or within MP can also reduce the bioavailability of chemicals, which then can lead to reduced effects on the environment (CHEN *et al.* 2017, REHSE *et al.* 2018, LI *et al.* 2020b).

By the usual means the determined environmental risk of MP is classified as rather low at present (BURNS & BOXALL 2018, VÖLKER *et al.* 2020, CATARINO *et al.* 2021). However, long-term ecotoxicological experiments as well as data on feral freshwater organisms with irregularly shaped MP are still rare and interference of MP with other chemicals is still not fully understood (BURNS & BOXALL 2018, CATARINO *et al.* 2021). Thus, experiments addressing these gaps of knowledge are urgently needed to decrease the uncertainty in environmental risk assessment of MP.

On this background, the aim of the present study was to investigate effects from the biochemical to the individual level in juvenile brown trout after exposure to different amitriptyline and MP concentrations and to reveal whether effects induced by amitriptyline are influenced by co-exposure with MP.

## **2 Materials and Methods**

### *2.1 Test organism*

Juvenile brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) were purchased from a commercial trout farm (Forellenzucht Lohmühle, Alpirsbach-Ehlenbogen, Germany). The breeding facility is regularly controlled and classified as category I, disease-free (Council Directive 2006/88/EC; EU 2006). Fish were acclimatized to lab conditions for at least one week before the experiments.

### *2.2 Test substance*

Amitriptyline hydrochloride was purchased from Sigma Aldrich (CAS number: 549-18-8; chemical formula:  $C_{20}H_{23}N \cdot HCl$ ). All given amitriptyline concentrations refer to the pure amitriptyline portion. No organic solvent was used in both experiments. For the first experiment two stock solutions were prepared with bi-distilled water: stock solution I contained 100 mg/L amitriptyline and for stock solution II, stock solution I was diluted to a concentration of 1 mg/L. For the second experiment a stock solution with a concentration of 25 mg/L amitriptyline was prepared.

Irregularly shaped PS-MP were produced according to the methods of EITZEN *et al.* (2019). Transparent PS pellets were purchased (Polystyrol 158 K, BASF, Germany, density 1.05 g/mL) and cryogenically milled (CryoMill, Retsch, Germany). The PS-MP were suspended in ultra-pure

water without adding any surfactant. The particle concentration (56,240 particles/mL) in the pure suspension was determined with a particle counter (SVSS, PAMAS, Germany) by light extinction in a laser-diode sensor (type HCB-LD-50/50). The size distribution of the particles is given in Table S1 and Figure S1 in the supplement. For more information on the PS particles see SCHMIEG *et al.* (2020a) and SCHMIEG *et al.* (2020b). The particles were fractionated to a nominal size below 50 µm with a micro-sieve (polyamide monofilament). The smallest and therefore possibly biologically relevant particles took the largest share in terms of number.

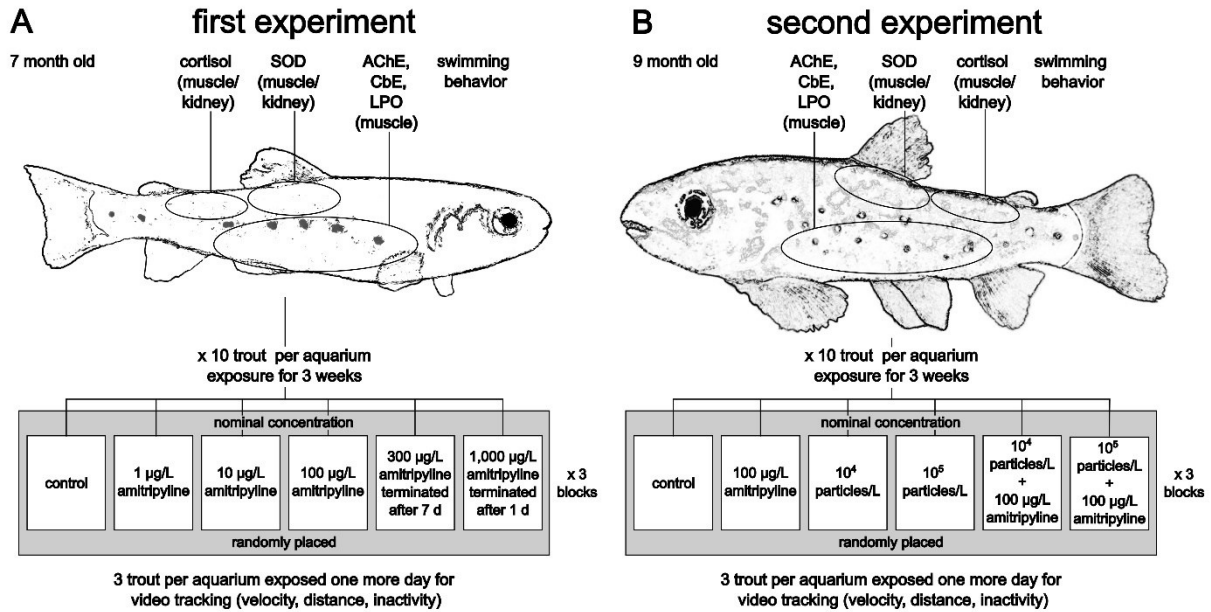
### 2.3 Experiments with juvenile trout

The experiments were conducted in two runs. Brown trout were exposed to defined amitriptyline and particle concentrations in a semi-static three block design (triplicates) for three weeks in each run. Experiments took place in a thermostat-controlled chamber set to 7 °C and a light/dark cycle of 10/14 h. Glass aquaria with 15 L test media were placed in randomized order in each block to account for potential confounding factors. Each tank was equipped with a glass pipette connected to compressed air via silicone tubes for aeration and shaded from direct light. Per tank, 10 fish were exposed (thus 30 fish per treatment group). Trout were fed daily approximately 3% of their body weight (0.8 mm size, Incio Plus, Biomar, Brande, Denmark). 50% of the water were exchanged twice a week. Amitriptyline stock solutions were freshly prepared immediately before the water exchanges. Vials containing MP stock suspensions were rinsed four times to avoid incomplete transfer of particles. To adjust the final amitriptyline and MP concentrations, stock solutions and stock suspensions were diluted with filtered and aerated tap water (after pretreatment with iron filter, particle filter and activated carbon filter; Filwatec, Bad Liebenzell, Germany). Mortality and abnormal behavior were recorded daily, and dead fish were removed immediately.

In the first experiment, 7 months old trout were exposed to nominal 0, 1, 10, 100, 300, and 1,000 µg/L amitriptyline (Figure 1 A). Fish exposed to nominal 300 µg/L and 1,000 µg/L showed severe effects and had to be euthanized after 7 d and 24 h, respectively. At the beginning and the end of the experiment physico-chemical water parameters were recorded (average values: pH = 7.5 ± 0.2, temperature = 6.6 ± 0.3 °C, conductivity = 481.5 ± 3.1 µS/cm, oxygen concentration = 11.2 ± 0.1 mg/L, oxygen saturation = 96 ± 1%; see supplement Table S2). In all aquaria nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) concentration did not exceed 0.1 mg/L.

In the second experiment, effects of amitriptyline and MP were investigated in 9 months old trout (Figure 1 B). Beside a control group, fish were exposed to nominal 100 µg/L amitriptyline, 10<sup>4</sup> particles/L PS-MP (MP<sub>tt</sub>), 10<sup>5</sup> particles/L PS-MP (MP<sub>nt</sub>) and the mixtures 100 µg/L amitriptyline + 10<sup>4</sup> particles/L (MIX<sub>tt</sub>), and 100 µg/L amitriptyline + 10<sup>5</sup> particles/L (MIX<sub>nt</sub>). The amitriptyline

concentration was chosen since the nominal concentration of 100 µg/L caused effects in brown trout in the first experiment, but no concerns for animal welfare. The PS-MP concentrations were chosen based on used particle concentrations in other exposure studies with MP. Physico-chemical water parameters were measured at the beginning and the end of the experiment (average values: pH = 7.6 ± 0.1, temperature = 6.4 ± 0.2 °C, conductivity = 480.2 ± 4.7 µS/cm, oxygen concentration = 11.2 ± 0.3 mg/L, oxygen saturation = 95 ± 2%, total hardness = 15.1 ± 0.5; see supplement Table S3). Measured NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentrations were equal or less than 0.1 mg/L.



**Figure 1:** Overview of the experimental designs of the first (A) and second (B) experiment. Grey boxes indicate one block (SOD: superoxide dismutase; AChE: acetylcholinesterase; CbE: carboxylesterases; LPO: lipid peroxidase).

At the end of the experiments, fish were euthanized by an overdose of 1 g/L MS222 (tricaine methanesulfonate) adjusted to pH 7 with NaHCO<sub>3</sub> and death was guaranteed by severance of the spine. Length and weight of each animal were measured. Fish were dissected, and samples for lipid peroxidation (LPO; muscle), superoxide dismutase (SOD; muscle/kidney), cortisol (muscle/kidney), acetylcholinesterase (AChE; muscle), and carboxylesterases (CbE; muscle) quantification were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further analyses (Figure 1). Samples for determination of SOD activity were rinsed in phosphate buffered saline (pH 7.4) before freezing.

In both experiments, three remaining fish per tank were continuously exposed and used one day later for quantitative assessment of their swimming behavior by a video tracking system (described in section 2.6.) and dissected afterwards.

#### *2.4 Chemical analyses*

Water samples were taken at the beginning and the end of both experiments as well as before and after a water exchange. Water samples of the three replicates of each treatment group were pooled and stored (~2.5 years) at -20 °C prior to analyses. The concentrations of amitriptyline were determined with a 1290 Infinity HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and a triple quadrupole mass spectrometer (MS, 6490 iFunnel Triple Quadrupole LC/MS, Agilent Technologies) in ESI (+) mode. For separation, an Agilent Poroshell-120-EC-C18 (2.7 µm, 2.1 × 100 mm) column at a flow rate of 0.4 mL/min was applied. The column temperature was maintained at 40 °C. Eluent A was water (containing 0.1% formic acid) and eluent B acetonitrile (containing 0.1% formic acid). Gradient elution was used: 0-1 min 5% B, linear increase to 100% B within 7 min, hold for 7 min at 100% B. After switching back to the starting conditions, reconditioning time of 3 min was employed. Samples were kept in the autosampler at 10 °C, the injection volume was 10 µL. Samples were measured undiluted or after a 50-fold dilution. The detection limit of amitriptyline (mass transition  $m/z$  278.2 → 117.1) was 100 ng/L. More details on operating parameters of the triple quadrupole MS are listed in the supplement (Table S4 and S5). For calculating mean exposure concentrations values below the limit of quantification (LoQ) were substituted with  $LoQ/\sqrt{2}$ . Despite the recommendation of the OECD test guideline no. 203 (OECD 2019b), nominal concentrations are used to report the results, due to uncertainties concerning the amitriptyline concentrations.

#### *2.5 Behavior during exposure*

The position of the fish in the tank (upper or lower half of the aquaria) were recorded daily from the second day on in the first experiment and from the sixth day on in the second experiment. For that purpose, the covers of the exposure tanks were removed, and a white sheet of paper was placed behind the aquaria to improve contrast. After 5 min of acclimatization to the light conditions, 3 pictures (5 min between each) were taken with a Panasonic DMC-TZ56 camera. Each image was visually assessed with regard to the number of individuals present in the upper and in the lower half of the tanks. Subsequently, the data recorded for each individual tank at the same day were averaged.

#### *2.6 Video tracking of swimming behavior*

For video tracking of the swimming behavior at the end of the experiments, three fish of each tank were transferred into small aquaria (17.0 cm x 17.0 cm x 8.5 cm) filled with one liter of the corresponding test medium. Four aquaria were recorded simultaneously. Each aquarium was equipped with a camera (Basler acA 1300-60 gm, 1.3-megapixel resolution, Basler AG,

Ahrensburg, Germany, lens: 4.5-12.5 mm; 1:1.2; IR 1/2") fixed 32 cm above the water surface. Subsequently, the four aquaria in their entirety were surrounded with white polystyrene plates. Four lamps (2700 K, 1521 lm each) were placed inside the enclosure facing the top plate to provide indirect illumination. The swimming behavior was recorded for 20 min whereby the first 2 min were regarded as acclimatization phase and therefore not analyzed. In the remaining 18 min of recordings, trout were individually center-point tracked and the total distance moved, the average velocity, and the time of no movement were analyzed with EthoVision 12 XT (Noldus Information Technology bv, Wageningen, Netherlands). To avoid failures of automated tracking as for example swaps between the individuals, the whole footage was sighted afterwards and manually corrected if necessary.

### 2.7 AChE and CbE activity

To determine the acetylcholinesterase (AChE) and carboxylesterase (CbE) activities, muscle tissue was homogenized with TRIS buffer (20 mM TRIS<sub>base</sub>, 20 mM NaCl, inhibitor mix, pH 7.3) in a ratio of 1:5 (w/v). Following, the samples were centrifuged (5,000 rcf, 10 min, 4 °C) and 50% glycerol (1/4 of the volume of the supernatant) was added to the supernatant. Samples were stored at -20 °C until the final analysis. To determine the total protein content in the samples, the method of LOWRY *et al.* (1951) modified by MARKWELL *et al.* (1978) was used. AChE activity was analyzed spectrophotometrically according to the method of ELLMAN *et al.* (1961) modified by RAULT *et al.* (2008). The method described by SANCHEZ-HERNANDEZ *et al.* (2009) was used to measure the activity of two carboxylesterases CbE with the substrates 5 mM 4-nitrophenyl acetate (NPA) and 5 mM 4-nitrophenyl valerate (NPV). In all plates the absorbance was measured at 405 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski VT, USA) and all samples were analyzed in triplicates. The specific activities of the enzymes are given per mg protein content. One micromole substrate hydrolyzed per min has been defined as one unit.

### 2.8 Cortisol level

The cortisol level was measured in selected muscle/kidney samples with the commercially available fish cortisol ELISA Kit by Cusabio Technology LCC (Huston, Texas, USA). From the first experiment, tissue samples of 8 fish per replica (24 per treatment) of all treatment groups were analyzed. From the second experiment, 7-8 fish per replica were analyzed from each group. Since no effect occurred in MP<sub>ht</sub> and MIX<sub>ht</sub>, the lowest MP group (MP<sub>tt</sub>) and the co-exposure of amitriptyline and the lowest MP group (MIX<sub>tt</sub>) were not analyzed. The tissue samples were homogenized in phosphate-buffered saline (1:11 w/v). Subsequently, after two freeze-thaw cycles to break the cell membranes, samples were centrifuged (5,000 rcf, 5 min, 4 °C). Prior to the analysis, supernatants were stored at -20 °C. For the assay, supernatants were diluted (1:10

v/v) with the sample buffer included in the kit. In the pre-coated 96-well plate 50 µL antibody (specific for cortisol and horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat-anti-rabbit antibody) and 50 µL of either standard or sample was pipetted. Samples were analyzed in duplicates. In the following, the plates were incubated at 37 °C for 40 min and subsequently 3 washing cycles were performed. 100 µL HRP-conjugate was added in each well and the plate was incubated for another 30 min at 37 °C. After 5 washing cycles, 90 µL 3,3',5,5'-Tetramethyl[1,10-biphenyl]-4,4'-diamine substrate was added, and the plates were incubated for 20 min at 37 °C. After that, the reaction was stopped with 50 µL of a stopping solution and photometrical measurements were conducted at 450 nm and 570 nm for wavelength correction.

### 2.9 Lipid peroxide level

The lipid peroxide content was determined with the ferrous oxidation xylenol orange (FOX) assay according to HERMES-LIMA *et al.* (1995) and MONSERRAT *et al.* (2003) and adjusted for 96-well plates. Muscle samples were homogenized with HPLC-grade methanol (tissue to methanol ratio 1:6 w/v) and centrifuged (15,000 rcf, 5 min, 4 °C). In a pretest, sample volume and incubation time were adjusted for optimal results. Subsequently, 50 µL of 0.75 mM FeSO<sub>4</sub>, 75 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.3 mM xylenol orange solution, 30 µL and 40 µL supernatant (for the first experiment and second experiment respectively) were added in each well of a 96-well plate. Samples were analyzed in triplicates. To consider potential Fe in the samples, a sample blank in which the FeSO<sub>4</sub> solution was replaced by bi-distilled water was performed. In the following, bi-distilled water was used to adjust the volume of each well to 200 µL. Plates were incubated for 165 min and 180 min (for the first experiment and second experiment respectively). After incubation, the absorbance at 570 nm (ABS570) was measured in an automated plate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski VT, USA). Afterwards, 1 µL of 1 mM cumene hydroperoxide (CHP) solution was added to each well. The plates were incubated for 30 min at room temperature and the absorbance at 570 nm was measured for a second time. Sample values were corrected with the corresponding sample blanks. CHP equivalents per mg wet weight (CHPequiv.) were calculated using the following equation:

$$CHPequiv. = \frac{ABS570 \text{ sample}}{ABS570 \text{ sample and CHP}} * CHP (1 \mu L) * \frac{\text{total volume in well (200 } \mu L)}{\text{sample volume}} * \text{dilution factor} \quad (1)$$

### 2.10 Activity of superoxide dismutase

Tissue samples (muscle/kidney) were homogenized in 20 mM HEPES buffer (1 mM EGTA, 210 mM mannitol and 70 mM sucrose, pH 7.2) in a ratio of 1:5 (w/v). Subsequently, samples were centrifuged (1,500 rcf, 4 °C, 5 min) and the supernatant was stored at -80 °C until further analyses. Superoxide dismutase activity was analyzed with the Cayman Chemical superoxide

dismutase assay kit (item no. 706002, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA). Prior to the assay the supernatant was diluted 5:150 (v/v) with 50 mM TRIS-HCl buffer (pH 8.0). In this assay kit, tetrazolium salt is utilized to assess superoxide radicals generated by hypoxanthine and xanthine oxidase. Superoxide dismutase (SOD) reduces the amount of the superoxide radicals. The assay can detect Cu/Zn-SOD, Mn-SOD and Fe-SOD. Absorbance was measured at 450 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski VT, USA). All samples were analyzed in duplicates.

### 2.11 Statistical analysis

For statistical purposes the software R (version 3.6.2; R CORE TEAM 2019) was used. Due to their different exposure times (earlier termination for animal welfare reasons), the treatment groups with nominal 300 µg/L and nominal 1,000 µg/L amitriptyline in the first experiment were not included into the statistical analyses. The  $\alpha$ -level was set to 0.05. To analyze the data on mortality, a mixed effect Cox model (package *coxme*; THERNEAU 2020) with treatment as fixed effect and aquarium ID as random effect was used. Data for length, weight (second experiment), AChE, CbE-NPA, CbE-NPV, SOD, velocity at last minute of recording (first experiment) and total distance moved were analyzed with a linear mixed model (package *lme4*; BATES *et al.* 2015) with treatment as fixed and aquarium ID as random effect. For the analysis of the cortisol level in the second experiment, "inclusion of fish in video tracking" was used as additional fixed effect, since potential stress caused by the video tracking could influence the cortisol level. To analyze the mean velocity and time of no movement during the video tracking, recording time beside treatment was included as fixed factor. If necessary, data were transformed to gain normal distribution and homogeneity of variances (see supplement Table S6). Data for weight (first experiment) could not be transformed to homogeneity of variances, so a Welch-ANOVA was performed. Data of the cortisol level and time of no movement at last minute of the recording in the first experiment and of LPO level in both experiments were not normally distributed. Therefore, these endpoints were analyzed with a Kruskal-Wallis test and Conover's many-to-one post hoc test, if significant. Multiple comparisons were corrected using the method of Benjamini and Hochberg (BENJAMINI & HOCHBERG 1995). The position of the fish in the aquaria during the experiments were analyzed with generalized linear mixed models with treatment group and days of exposure as fixed factors and aquarium ID as random factor. In the second experiment the package *glmmTMB* (BROOKS *et al.* 2017) was used to handle zero inflated data since no fish of the control group,  $MP_{tt}$  and  $MP_{ht}$  stayed in the upper half of the aquaria. In the first experiment, Dunnett's test was used as a post hoc test to compare the treatment groups with the control group whereas in the second experiment Tukey's all-pair comparisons were applied to be able to compare results of all groups (Table S7).

### 2.12 Animal welfare

All experiments were performed according to German legislation and were approved by the regional council of Tübingen, Germany (authorization number ZO 2/16).

### 2.13 Credibility of data

MOERMOND *et al.* (2016) proposed criteria for reporting and evaluation of ecotoxicity data (CRED). Details on the fulfillment of these criteria are provided in the supplement.

## 3 Results

### 3.1 Amitriptyline concentrations

In both experiments, no amitriptyline was detected in the control groups or treatment groups which solely contained MP at any investigated time point. In the first experiment, the measured amitriptyline concentrations at the start of the experiment were only between 8% and 14% of the nominal concentration (Table 1).

**Table 1:** Nominal and measured amitriptyline concentrations of the first experiment (limit of quantification (LoQ) 0.1 µg/L; n.a.: not analyzed; for calculation of mean exposure concentrations values below the limit of quantification were substituted with  $LoQ/\sqrt{2}$ ).

Nominal concentration [µg/L]	Start of the experiment [µg/L]	Before water exchange [µg/L]	After water exchange [µg/L]	End of the experiment [µg/L]	Calculated mean of measured concentration [µg/L]
0	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0
1	0.10	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.08
10	1.25	0.45	0.71	0.82	0.8
100	48.90	< 0.1	< 0.1	< 0.1	12
300	25.00	12.48	22.97	n.a.	20
1,000	135.18	n.a.	n.a.	n.a.	135

The concentrations of the groups which contained nominally 300 µg/L and 10 µg/L were relatively consistent at the different time points. In contrast, concentrations of the two treatment groups with the nominal level of 100 µg/L and 1 µg/L dropped under the limit of quantification (LoQ: 0.1 µg/L).

In the second experiment, the measured amitriptyline concentrations were between 5.7 µg/L and below the limit of quantification, i.e. 0.1 µg/L (Table 2). At the end of the experiment, the amitriptyline concentrations of the three groups with amitriptyline were between 0.6 µg/L and 0.1 µg/L. To understand the reasons for the discrepancy of nominal and measured amitriptyline concentrations and to exclude storage affected the measured concentrations samples of the stock solutions were analyzed. In the stock solution with nominal 1,000 µg/L amitriptyline the measured amitriptyline concentration was 209 µg/L whereas in the stock solution with nominal

25,000 µg/L the detected amitriptyline concentration was 2,545 µg/L (circa 21% and 10% of the nominal concentrations). Due to the uncertainties concerning the amitriptyline concentrations in both experiments, nominal concentrations were used to report results.

**Table 2:** Measured amitriptyline concentrations of the second experiment (limit of quantification (LoQ) 0.1 µg/L; for calculation of mean exposure concentrations values below the limit of quantification were substituted with  $LoQ/\sqrt{2}$ ; MP<sub>tt</sub>: 10<sup>4</sup> particles/L PS-MP; MP<sub>ht</sub>: 10<sup>5</sup> particles/L PS-MP; MIX<sub>tt</sub>: amitriptyline + 10<sup>4</sup> particles/L; MIX<sub>ht</sub>: amitriptyline + 10<sup>5</sup> particles/L).

Abbreviation treatment group	Nominal concentration [µg/L]	Start of the experiment [µg/L]	Before water exchange [µg/L]	After water exchange [µg/L]	End of the experiment [µg/L]	Calculated mean of measured concentration [µg/L]
Control	0	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0
Amitriptyline	100	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.18	0.10
MP <sub>tt</sub>	0	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0
MP <sub>ht</sub>	0	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0
MIX <sub>tt</sub>	100	< 0.1	< 0.1	5.73	0.13	1.50
MIX <sub>ht</sub>	100	5.52	< 0.1	< 0.1	0.59	1.56

### 3.2 Mortality and biometric values

At the end of the first experiment, fish were on average,  $6.1 \pm 0.6$  cm long and weighed  $2.2 \pm 0.7$  g (Table 3). The two months older fish in the second experiment had a length and weight of  $7.0 \pm 0.7$  cm and  $3.1 \pm 0.9$  g (Table 4). The overall mortality rate was 17.5% in the first experiment while no fish died during the second experiment (Table 3 and Table 4). No significant differences in the mortality rate, the length, and the body mass of trout between all treatment groups occurred in both experiments (first experiment: mortality  $\chi^2 = 1.3398$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.720$ ; weight  $F = 1.4473$ ,  $df = 3/50.03$ ,  $p = 0.240$ ; length  $F = 0.0809$ ,  $df = 3/95$ ,  $p = 0.970$ ; second experiment: weight  $F = 2.0216$ ,  $df = 5/173$ ,  $p = 0.078$ ; length  $F = 1.4296$ ,  $df = 5/173$ ,  $p = 0.216$ ). The nominal concentration of 1,000 µg/L amitriptyline caused severe effects on behavior and respiration within one day of exposure. For animal welfare, the treatment group was terminated immediately after occurrence of these effects. Fish of the treatment group with nominal concentration of 300 µg/L amitriptyline had to be euthanized after one week since behavioral effects met termination criteria (see Table S8 for further results of the two treatment groups).

### 3.3 Behavior during exposure

Trout exposed to nominal 300 µg/L of amitriptyline showed ataxic movement like side or vertically swimming. This behavior intensified with increasing exposure time. For animal welfare reasons fish of this group were euthanized after one week. Fish exposed to nominal 100 µg/L amitriptyline showed also abnormal behavior like swimming upside down, on the side or vertically. However, this behavior always only occurred for a short time which is why the test

did not have to be terminated earlier. In the second experiment, the described behavior was observed sporadically in fish exposed to amitriptyline and in the MIX<sub>tt</sub> group.

**Table 3:** Results of the first experiment. If significant differences occurred, *p* values compared to the control group are mentioned. Significant differences to the control group are indicated with an asterisk and highlighted in bold.

	Control	1 µg/L Amitriptyline	10 µg/L Amitriptyline	100 µg/L Amitriptyline
<b>Mortality [%]</b>	17 ± 12	20 ± 14	13 ± 19	20 ± 0
<b>Length [cm]</b>	6.1 ± 0.4	6.1 ± 0.6	6.1 ± 0.8	6.1 ± 0.6
<b>Body mass [g]</b>	2.22 ± 0.37	2.31 ± 0.68	2.41 ± 0.83	2.01 ± 0.63
<b>Fish in upper half of the tank [%]</b>	1 ± 4	1 ± 2 <i>p</i> = 0.671	1 ± 3 <i>p</i> = 0.814	<b>37</b> <b>± 25</b> <b>*<i>p</i> &lt; 0.001</b>
<b>Total distance moved [cm]</b>	1,101 ± 528	1,864 ± 1,039 <i>p</i> = 0.561	<b>486</b> <b>± 615</b> <b>*<i>p</i> = 0.027</b>	786 ± 652 <i>p</i> = 0.577
<b>Mean velocity [cm/s]</b>	1.02 ± 0.49	1.73 ± 0.96 <i>p</i> = 1	<b>0.45</b> <b>± 0.57</b> <b>*<i>p</i> = 0.009</b> <b>(end of recording)</b>	<b>0.73</b> <b>± 0.60</b> <b>*<i>p</i> = 0.045</b> <b>(end of recording)</b>
<b>No movement [s]</b>	892 ± 116	721 ± 216 <i>p</i> = 0.862	<b>1,010</b> <b>± 133</b> <b>*<i>p</i> = 0.001</b> <b>(end of recording)</b>	<b>954</b> <b>± 153</b> <b>*<i>p</i> = 0.006</b> <b>(end of recording)</b>
<b>Lipid peroxidation [CHP-equiv.]</b>	28.80 ± 13.79	29.86 ± 12.73	27.10 ± 13.34	30.48 ± 15.77
<b>SOD [U/mL]</b>	85.69 ± 30.99	93.13 ± 29.27	86.70 ± 28.07	84.32 ± 27.95
<b>Cortisol level [ng/mL]</b>	11.53 ± 21.13	16.16 ± 23.26	20.19 ± 32.72	28.16 ± 39.20
<b>AChE activity [µu/mg protein]</b>	96.53 ± 20.66	94.77 ± 28.28 <i>p</i> = 0.946	86.41 ± 21.45 <i>p</i> = 0.361	<b>120.35</b> <b>± 33.37</b> <b>*<i>p</i> = 0.033</b>
<b>CbE-NPA activity [µu/mg protein]</b>	130.84 ± 23.38	122.71 ± 30.09	107.52 ± 24.60	116.78 ± 32.42
<b>CbE-NPV activity [µu/mg protein]</b>	98.24 ± 22.13	88.98 ± 27.04	70.29 ± 22.29	79.88 ± 32.18

Trout in the control groups and the two groups with solely MP swam and rested mostly or exclusively in the lower part of the tanks during the entire experiment (Figure 2). Prolonged exposure to amitriptyline significantly increased the percentage of fish that stayed in the upper half of the aquaria. With maximal 69% compared to maximal 23% of fish in the upper half of the tank the effect on the behavior was considerably more pronounced in the first experiment than in the second. The effect on the position of fish in the aquaria was also observed in trout co-exposed to 10<sup>4</sup> particles/L and amitriptyline (MIX<sub>tt</sub>). In contrast, less fish exposed to the mixture of amitriptyline and 10<sup>5</sup> particles/L (MIX<sub>ht</sub>) swam in the upper part of the aquarium and no significant difference between this group and either amitriptyline treatment group or the

control group occurred (first experiment: treatment:  $F = 19.066$ ,  $df = 3$ ; days of exposure:  $F = 34.248$ ,  $df = 1$ ; second experiment: treatment:  $\chi^2 = 30.037$ ,  $df = 5$ ,  $p < 0.001$ ; days of exposure:  $\chi^2 = 14.320$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ; amitriptyline/MIX<sub>ht</sub>  $p = 0.190$ ).

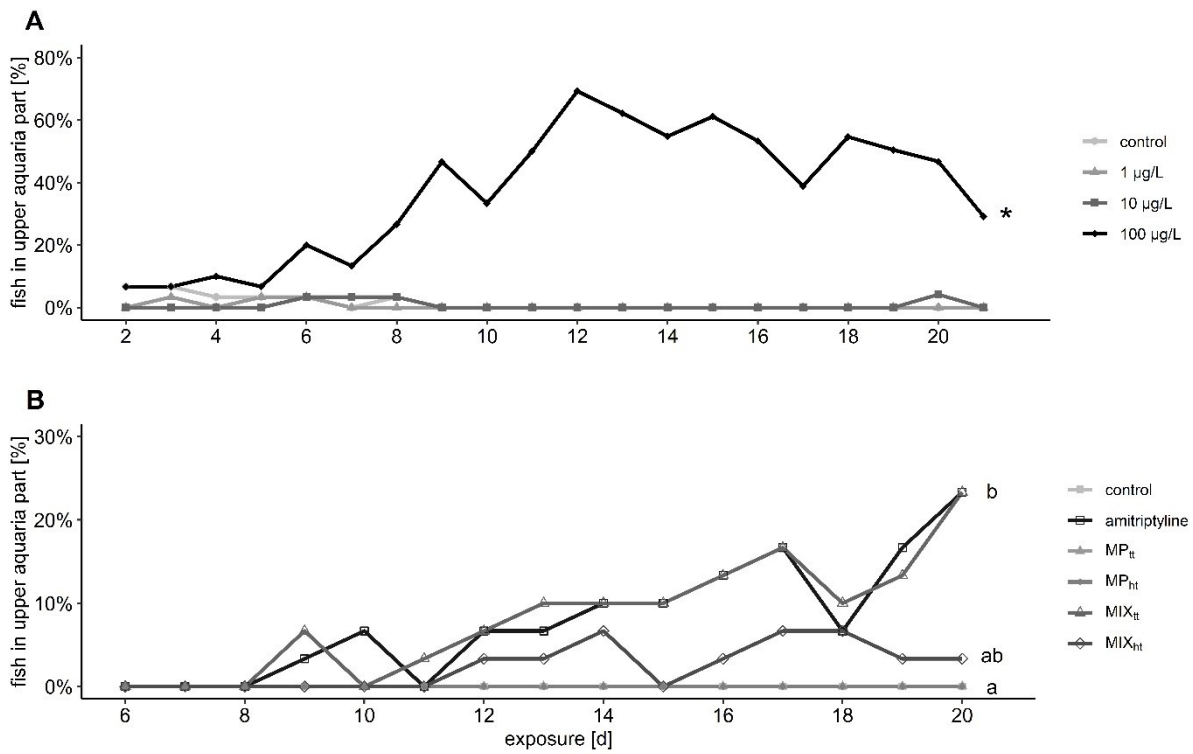
**Table 4:** Summary of the results of the second experiment (MP<sub>tt</sub>: 10<sup>4</sup> particles/L PS-MP; MP<sub>ht</sub>: 10<sup>5</sup> particles/L PS-MP; MIX<sub>tt</sub>: amitriptyline + 10<sup>4</sup> particles/L; MIX<sub>ht</sub>: amitriptyline + 10<sup>5</sup> particles/L; n.a.: not analyzed). If significant differences occurred  $p$  values compared to the control group are mentioned. Significant differences to the control group are indicated with an asterisk and highlighted in bold. For significant differences between the treatment groups see Table S7.

	Control	Amitriptyline	MP <sub>tt</sub>	MP <sub>ht</sub>	MIX <sub>tt</sub>	MIX <sub>ht</sub>
<b>Mortality</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>Length [cm]</b>	7.0 ± 0.6	6.9 ± 0.6	6.9 ± 0.6	7.2 ± 0.6	6.8 ± 0.7	7.2 ± 0.8
<b>Body mass [g]</b>	3.09 ± 0.75	3.14 ± 1.43	3.02 ± 0.81	3.39 ± 0.87	2.88 ± 0.78	3.31 ± 1.00
<b>Fish in upper half of the tank [%]</b>	0 ± 0	<b>8</b> <b>± 10</b> <b>*<math>p = 0.009</math></b>	0 ± 0 $p = 1$	0 ± 0 $p = 1$	<b>8</b> <b>± 11</b> <b>*<math>p = 0.006</math></b>	2 ± 6 $p = 0.862$
<b>Total distance moved [cm]</b>	1,733 ± 1,134	<b>609</b> <b>± 677</b> <b>*<math>p = 0.034</math></b>	1,746 ± 1,021 $p = 1$	1,506 ± 780 $p = 0.9997$	<b>549</b> <b>± 579</b> <b>*<math>p = 0.014</math></b>	<b>240</b> <b>± 217</b> <b>*<math>p &lt; 0.001</math></b>
<b>Mean velocity [cm/s]</b>	1.60 ± 1.05	<b>0.56</b> <b>± 0.63</b> <b>*<math>p = 0.035</math></b>	1.62 ± 0.95 $p = 0.993$	1.39 ± 0.72 $p = 0.958$	<b>0.51</b> <b>± 0.54</b> <b>*<math>p = 0.014</math></b>	<b>0.22</b> <b>± 0.20</b> <b>*<math>p &lt; 0.001</math></b>
<b>No movement [s]</b>	752 ± 246	<b>1,000</b> <b>± 155</b> <b>*<math>p = 0.105</math></b>	742 ± 222 $p = 0.992$	798 ± 157 $p = 0.943$	<b>999</b> <b>± 128</b> <b>*<math>p = 0.012</math></b>	<b>1,062</b> <b>± 28</b> <b>*<math>p &lt; 0.001</math></b>
<b>Lipid peroxidation [CHP-equiv.]</b>	23.36 ± 8.78	23.93 ± 9.15	27.33 ± 7.54	25.06 ± 9.15	26.18 ± 10.21	22.49 ± 8.76
<b>SOD [U/mL]</b>	109.62 ± 37.39	109.42 ± 37.43	110.01 ± 34.91	108.05 ± 37.18	112.48 ± 42.76	108.96 ± 40.70
<b>Cortisol level [ng/mL]</b>	40.60 ± 31.25	41.36 ± 29.15	n.a.	34.21 ± 35.77	n.a.	50.93 ± 31.63
<b>AChE activity [mu/mg protein]</b>	122.73 ± 39.06	131.47 ± 44.14	134.05 ± 54.36	122.59 ± 26.03	132.23 ± 38.72	127.52 ± 49.12
<b>CbE-NPA activity [mu/mg protein]</b>	87.59 ± 15.15	86.82 ± 27.89	93.26 ± 25.70	84.72 ± 15.29	90.74 ± 22.89	78.97 ± 15.67
<b>CbE-NPV activity [mu/mg protein]</b>	50.66 ± 12.25	50.74 ± 23.55	59.35 ± 21.81	54.00 ± 21.00	54.47 ± 17.62	45.92 ± 15.52

### 3.4 Video tracking

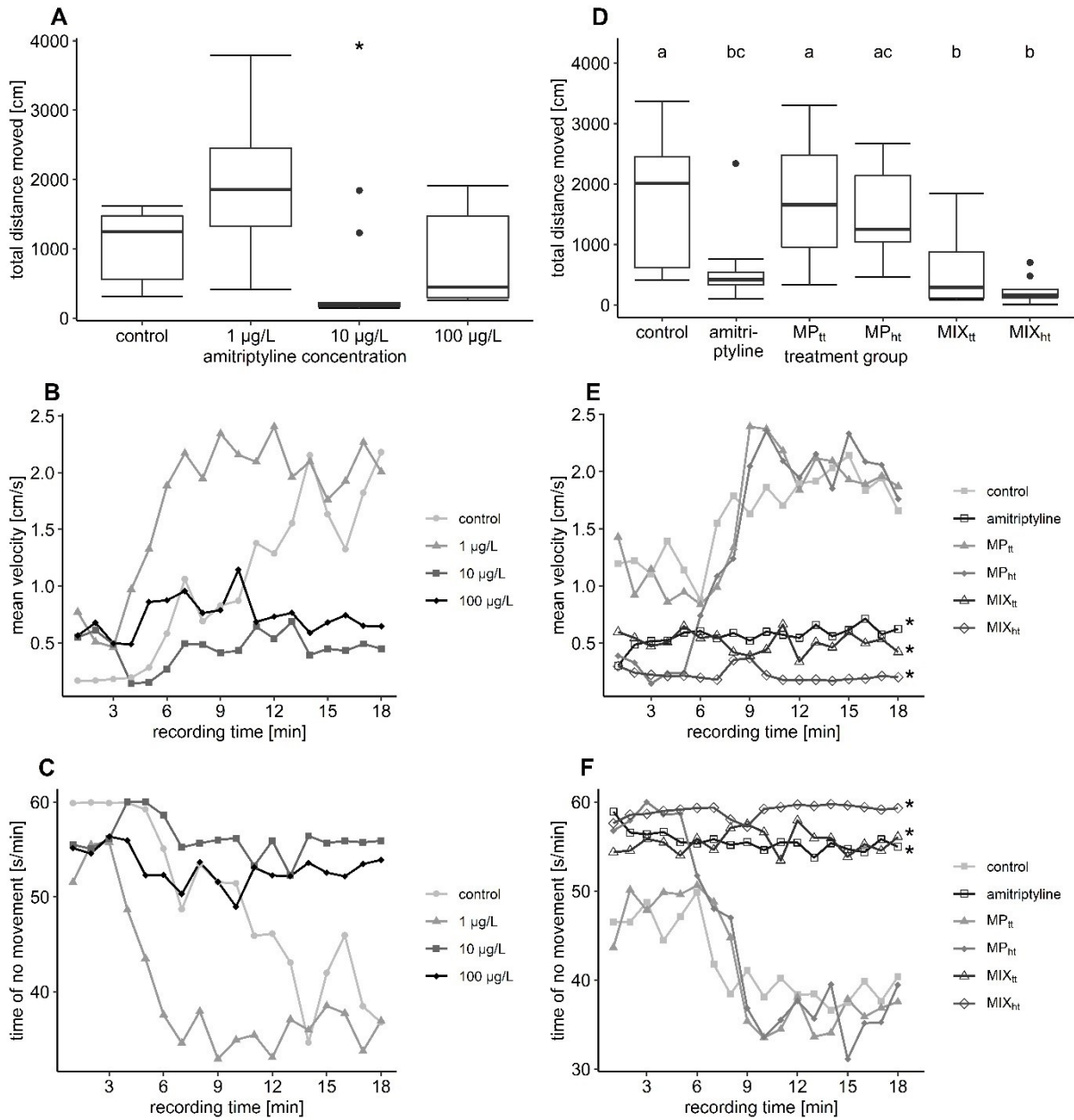
In the first experiment, the distance covered during the video tracking in the control group was 1,101 ± 528 cm. The covered distance increased by 69% after exposure to nominal 1 µg/L amitriptyline and reached 1,864 ± 1,039 cm. In contrast, exposure to nominal 10 µg/L and to 100 µg/L amitriptyline reduced the covered distance by 56% and 29% to 486 ± 615 cm and 786 ± 652 cm, respectively (Table 3). However, data were very variable and therefore only the difference between the control group and the group treated with 10 µg/L was statistically significant (Figure 3 A; first experiment: distance moved  $F = 4.904$ ,  $df = 3/8$ ,  $p = 0.032$ ). In the

second experiment, fish exposed to amitriptyline, or the two mixtures covered significantly less distance (between 65-86%) than the control group, while MP had no effect on the fish's behavior (Figure 3 D, Table 4; second experiment: distance moved  $F = 7.9203$ ,  $df = 5/12.01$ ,  $p = 0.002$ ).



**Figure 2:** Percentage of fish present in the upper half of the aquaria during the exposure to different amitriptyline concentrations in the first experiment (A) and the second experiment (B) to amitriptyline or  $10^4$  particles/L PS-MP (MP<sub>tt</sub>),  $10^5$  particles/L PS-MP (MP<sub>ht</sub>) or the mixtures amitriptyline +  $10^4$  particles/L (MIX<sub>tt</sub>), and amitriptyline +  $10^5$  particles/L (MIX<sub>ht</sub>). Fig. 2 A: Significant differences towards the control group are indicated with an asterisk. Fig. 2 B: Significant differences between the treatment groups are displayed with different letters. Further statistical information is provided in the supplement Table S7.

The mean velocity changed significantly over time in both experiments (mean velocity<sub>recording time</sub>: first experiment  $F = 84.6495$ ,  $df = 1/635$ ,  $p < 0.001$ ; second experiment  $F = 72.6361$ ,  $df = 1/953.11$ ,  $p < 0.001$ ). After a short phase with relative low mean velocity, fish of the control groups swam with a relatively high velocity of 2.18 cm/s (first experiment) and 1.66 cm/s (second experiment) at the end of the video tracking (Figure 3 B and E). The initial phase with lower velocity was considerably longer in the control group of the first than in the second experiment. Fish exposed to MP showed the same behavioral pattern as the control group. Fish exposed to amitriptyline in contrast swam with a comparatively low velocity during the whole recording. Despite the behavioral pattern of the control group being more similar to the behavior of fish exposed to amitriptyline in the first experiment, a trend towards reduced mean velocity in treatment groups with amitriptyline occurred over the complete recording time (mean velocity<sub>treatment</sub>:  $F = 3.8452$ ,  $df = 3/8$ ,  $p = 0.057$ ).



**Figure 3:** Results of the video tracking analysis. In plots A-C the results of the first experiment are depicted, in plots D-F the results of the second experiment (MP<sub>tt</sub>: 10<sup>4</sup> particles/L PS-MP; MP<sub>ht</sub>: 10<sup>5</sup> particles/L PS-MP; MIX<sub>tt</sub>: amitriptyline + 10<sup>4</sup> particles/L; MIX<sub>ht</sub>: amitriptyline + 10<sup>5</sup> particles/L). The boxplots display the median, the 25th and 75th percentiles as well as minimum and maximum values (whiskers) whereas dots indicate outliers. Significant differences towards the control group (complete recording time) are indicated by asterisks. Significant differences between the treatment groups are indicated by different letters. Plot 3 B and 3 C: significant differences between the control group and 10 as well as 100 µg/L occurred at the end of recording time. Further statistical information is provided in the supplement Table S7.

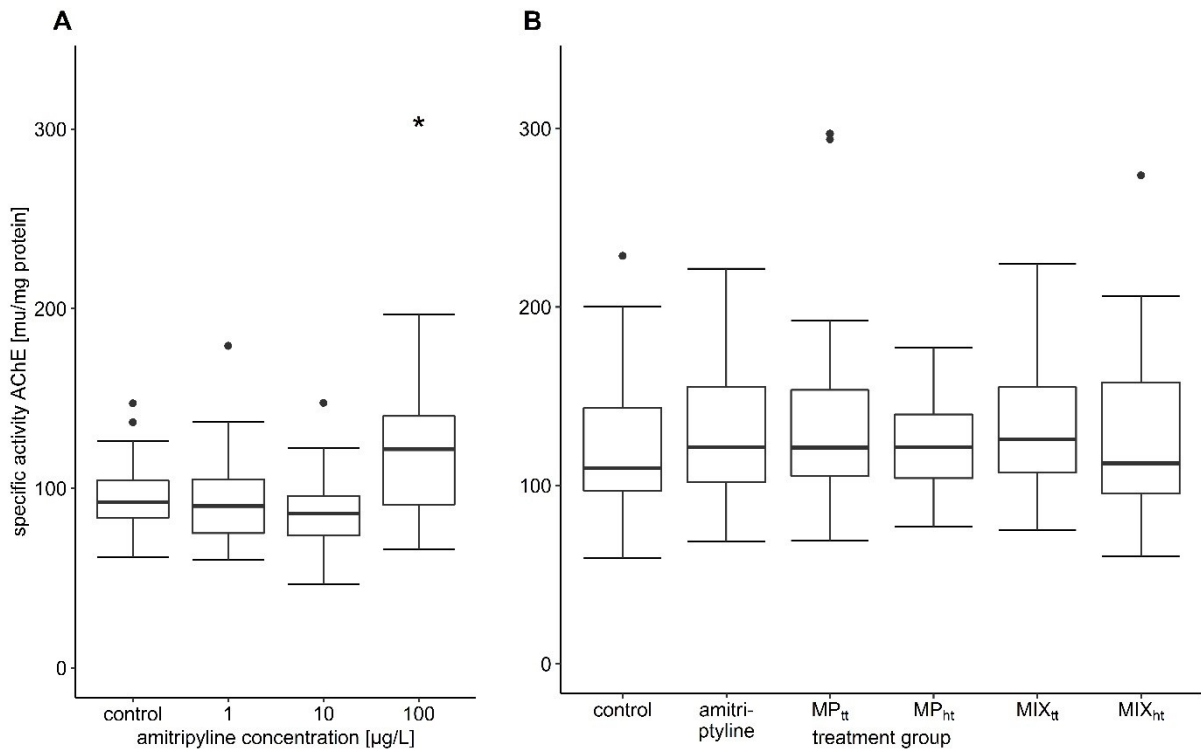
At the end of the recording mean velocity of the treatment groups with 10 and 100 µg/L amitriptyline were significantly reduced compared to the velocity of the control group (Table 3;  $F = 4.8169$ ,  $df = 3/8$ ,  $p = 0.034$ ). In the second experiment trout exposed to amitriptyline or the mixture of amitriptyline and MP (MIX<sub>tt</sub> and MIX<sub>ht</sub>) swam over the whole time span with a significant reduced mean velocity compared to the control group (Table 4; mean velocity<sub>treatment</sub>:  $F = 6.2046$ ,  $df = 5/12.43$ ,  $p = 0.004$ ).

Trout were relatively inactive at the start but moved significantly more over the recording (Figure 3 C and 3 F; no movement<sub>recording time</sub>: first experiment  $F = 76.6406$ ,  $df = 1/635$ ,  $p < 0.001$ ; second experiment  $F = 70.3521$ ,  $df = 1/952.92$ ,  $p < 0.001$ ). MP did not change the level of inactivity. Comparable to the mean velocity, fish exposed to amitriptyline in the first experiment showed only a trend towards a higher level of inactivity over the whole recording time (no movement<sub>treatment</sub>:  $F = 3.2578$ ,  $df = 3/8$ ,  $p = 0.081$ ). Nevertheless, at the end of the video tracking fish exposed to 10 µg/L and 100 µg/L amitriptyline moved significantly less compared to the control group (Table 3;  $\chi^2 = 15.923$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.001$ ). In the second experiment, time spent in inactivity of the amitriptyline treatment group, MIX<sub>tt</sub>, and MIX<sub>ht</sub> was, compared to the control group, significantly higher over the complete recording time (Table 4; no movement<sub>treatment</sub>:  $F = 6.1867$ ,  $df = 5/12.25$ ,  $p = 0.004$ ).

### 3.5 Biochemical responses

The activity of AChE was significantly increased by 25% in fish exposed to nominal 100 µg/L amitriptyline compared to the control group in the first experiment (Table 3; Figure 4 A;  $F = 5.5384$ ,  $df = 3/7.5527$ ,  $p = 0.026$ ). Trout exposed to 300 µg/L amitriptyline had also a considerably higher activity of AChE. However, the different exposure times of the treatment groups with 300 µg/L and 1,000µg/L amitriptyline did not allow a statistical comparison with the control (Table S8). In the second experiment, the exposure to amitriptyline as well as MP and the mixtures did not affect the AChE activity of brown trout (Table 4; Figure 4 B;  $F = 0.3154$ ,  $df = 5/174$ ,  $p = 0.903$ ). Amitriptyline and MP had no significant influence on the activity of the two tested CbEs (Table 3 and 4; first experiment: CbE-NPA  $F = 0.6629$ ,  $df = 3/8.0916$ ,  $p = 0.598$ , CbE-NPV  $F = 1.6918$ ,  $df = 3/8.0474$ ,  $p = 0.245$ ; second experiment: CbE-NPA  $F = 1.6001$ ,  $df = 5/173$ ,  $p = 0.163$ , CbE-NPV  $F = 1.8906$ ,  $df = 5/174$ ,  $p = 0.098$ ).

Neither amitriptyline nor MP or the mixture of both influenced the activity of SOD, the degree of LPO or the cortisol level (Table 3 and 4; first experiment: SOD  $F = 0.4596$ ,  $df = 3/9.7439$ ,  $p = 0.717$ , LPO  $\chi^2 = 1.5698$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.666$ , cortisol  $\chi^2 = 5.3672$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.147$ ; second experiment: SOD  $F = 0.0336$ ,  $df = 5/174$ ,  $p = 0.999$ , LPO  $\chi^2 = 4.081$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0.538$ , cortisol  $F = 1.3774$ ,  $df = 3/83$ ,  $p = 0.255$ , effect of video tracking on cortisol level  $F = 0.7279$ ,  $df = 1/83$ ,  $p = 0.396$ ).



**Figure 4:** Specific activity of AChE. (A) first experiment: control  $n = 25$ , 1 µg/L and 100 µg/L amitriptyline  $n = 24$ , 10 µg/L  $n = 26$ ; (B) second experiment: all treatment groups  $n = 30$  (MP<sub>tt</sub>:  $10^4$  particles/L PS-MP; MP<sub>ht</sub>:  $10^5$  particles/L PS-MP; MIX<sub>tt</sub>: amitriptyline +  $10^4$  particles/L; MIX<sub>ht</sub>: amitriptyline +  $10^5$  particles/L). In the boxplots the median, the 25th and 75th percentiles as well as minimum and maximum values (whiskers) are displayed; the dots indicate outliers. Significant difference compared to the control group is indicated with an asterisk.

## 4 Discussion

We investigated the effects of the tricyclic antidepressant amitriptyline, PS-MP and their interaction on juvenile brown trout in two experiments.

### 4.1 Amitriptyline concentrations

The analyzed amitriptyline concentrations in both experiments were considerably lower than the targeted concentrations, often below the LoQ. A calibration with external standards was used for the analyses of the amitriptyline concentrations without addition of an internal standard. The sample matrix did not affect the quantification in the aqueous samples (spiked water samples compared to pure analytical standard). Deviation of the nominal and measured amitriptyline concentrations already occurred in the stock solutions. No incomplete dissolution or precipitation were observed in the stock solutions, however, cannot be excluded. Prior to the experiments, the tanks were filled with amitriptyline solutions in the corresponding concentrations to saturate sorptive surfaces to reduce losses of the antidepressant by sorption. At the start of the experiments, the test media were exchanged. Since the discrepancy of nominal and measured concentrations occurred already at the beginning of the experiments, nonetheless a sorption of

amitriptyline to the glass walls of the bottles of the stock solution, vials used for sampling and the aquaria or incomplete dissolution is likely. LV *et al.* (2013) and CHANG *et al.* (2014) observed an instantaneous uptake of a significant amount of amitriptyline to kaolinite and Ca-montmorillonite, respectively. Furthermore, amitriptyline was shown to adsorb considerably to polyamide (PA) MP (WAGSTAFF *et al.* 2022). BAENA-NOGUERAS *et al.* (2017) investigated the degradation kinetics of pharmaceuticals and found hydrolysis and biodegradation of amitriptyline negligible. Furthermore, in our experiment photolysis of amitriptyline was unlikely due to the chosen illumination (BAENA-NOGUERAS *et al.* 2017). Uptake and metabolization of test media by trout can also be considered as a reason for the reduction of the amitriptyline concentrations in the water phase during the experiments. Bioaccumulation of amitriptyline were reported for several fish species (LAJEUNESSE *et al.* 2011, MEADOR *et al.* 2016, MUIR *et al.* 2017, ZIARRUSTA *et al.* 2017, DAVID *et al.* 2018). Amitriptyline was shown to bioaccumulate in the brain, the target organ of the pharmaceutical, as well as gills, liver, plasma, bile, and to a low extent in the muscle. In addition, ZIARRUSTA *et al.* (2017) identified 33 possibly toxicological relevant metabolites of amitriptyline in gilt-head bream (*Sparus aurata*) after exposure to the antidepressant. Due to financial restrictions residue analyses in fish were not included in our study. However, since already the low amitriptyline concentrations caused severe effects in the exposed fish, the aims of our study to investigate the effects of the antidepressant and the possible modulation of these effects by co-exposure of amitriptyline and PS-MP were not affected. Due to uncertainties concerning the amitriptyline concentrations in our experiments the lowest observed effect concentration (LOEC), however, could not be determined.

#### 4.2 Mortality

Concentrations of 300 µg/L and 1,000 µg/L amitriptyline (measured concentrations: 20 µg/L and 135 µg/L) caused severe reactions which made it necessary to terminate the affected treatment group earlier than the other exposure groups. No other apparent changes on mortality were caused by amitriptyline, MP or the mixtures of both which is in line with results of SCHMIEG *et al.* (2020a). Effects on the survival caused by exposure to high amitriptyline concentrations have been shown e.g. for zebrafish (LC<sub>50</sub> = 1.4 mg/L, 120 h / 3 mg/L, 144 h) and common carp (500 µg/L, 30 d; YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2017, SEHONOVA *et al.* 2019). One explanation for the rapidly impaired condition of brown trout exposed to 1,000 µg/L might be the serotonin syndrome, since high doses of tricyclic antidepressants are known to potentially cause this life-threatening condition in humans (BOYER & SHANNON 2005, DEMIN *et al.* 2017). In contrast, the effects observed in the other treatment groups in our experiments increased over the exposure time. This might reflect the often occurring delay of two weeks or longer until antidepressants have a therapeutic effect in humans (QUITKIN *et al.* 1984).

#### 4.3 Behavior during exposure

Antidepressants are designed to alter behavior in humans. Therefore, effects on the behavior of non-target organisms which possess similar molecular targets for the respective drugs are plausible. In the present study, nominal concentrations of 100 µg/L amitriptyline and higher caused ataxic movement like side or upside-down swimming in brown trout. Similar effects on the behavior were reported for zebrafish exposed to 10 mg/L amitriptyline for 20 min (DEMIN *et al.* 2017). In both of our experiments, amitriptyline exposure increased the percentage of fish that stayed in the upper half of the tank significantly. The effect was considerably more pronounced in the first than in the second experiment. Beside the different ages of the fish and the lower measured amitriptyline concentrations in the second experiment, biological variability might explain the observed difference. Comparable to our results, zebrafish exposed for 20 min to 1 mg/L and 5 mg/L amitriptyline or 2 weeks to 10 µg/L or 50 µg/L amitriptyline spend more time in the top of a novel tank and showed a significantly reduced latency to enter the top half of a novel tank (DEMIN *et al.* 2017, MESHALKINA *et al.* 2018). The co-exposure of fish to amitriptyline and 10<sup>4</sup> particles/L PS-MP did not alter this effect of amitriptyline, whereas co-exposure to amitriptyline and 10<sup>5</sup> particles/L PS-MP mitigated the effect. Anxiolytic substances have been shown to increase the time spend in the upper half of the aquaria in a novel tank experiment. The reduced anxiety lead to an increase in the exploration behavior (STEWART *et al.* 2012). Furthermore, preference of brighter compartments was described as antianxiety behavior in fish (MAXIMINO *et al.* 2010). In our experiments, the behavioral observations were not performed in a novel tank test, but during the exposure. However, the water column and water surface were brighter illuminated than the dark bottom of the aquaria. Therefore, the higher percentage of fish swimming in the upper half of the tanks should be interpreted as an anxiolytic effect of the antidepressant.

MP alone did not result in any changes of behavior. In zebrafish and marine medaka (*Oryzias melastigma*) exposure to polyethylene (PE) MP and polyvinyl chloride (PVC) MP did also not influence the time the fish spent in the top zone of a novel tank (CORMIER *et al.* 2021).

#### 4.4 Video tracking of swimming behavior

In the first experiment, fish were less active starting with 10 µg/L amitriptyline. This became obvious for the distance moved, but also for the inactivity and medium velocity at the end of the video tracking. Both exposure to amitriptyline and co-exposure to amitriptyline and PS-MP in the second experiment significantly altered the fish's behavior: trout treated with amitriptyline covered significantly less distance, swam with a lower velocity, and the time of inactivity was increased. Differences in the behavior between the two experiments can be partly explained by

biological variance. The conditions during the video recording are stressful for the trout due to bright illumination and limited amount of water in the recording aquaria (ZIEGLER *et al.* 2020). Therefore, the activity of the control group can be interpreted as a period of freezing behavior followed by a flight response. There are two main explanations for the reduced level of activity in amitriptyline treated trout: either the treatment causes anxiety and thereby increased freezing bouts (STEWART *et al.* 2012) or, more likely, the behavior reflects the anxiolytic and sedative effects of the antidepressant and reduces the flight reflex. In accordance with the results of the present study reduced covered distance and swimming velocity caused by amitriptyline exposure have been reported for brown trout larvae (SCHMIEG *et al.* 2020a) and for adult zebrafish (DEMIN *et al.* 2017, MESHALKINA *et al.* 2018). Furthermore, amitriptyline is described to decrease the swimming activity of zebrafish larvae in different exposure scenarios (HUANG *et al.* 2019) and reduce the swimming distance under dark conditions and at high concentrations of 3 mg/L amitriptyline under dark as well as under light conditions (SEHONOVA *et al.* 2019).

No effect of MP on the swimming behavior of fish was found in the present study. Likewise, in different fish species no or only minimal MP effects on swimming, exploration, or foraging behavior as well as shoaling or aggressive behavior and the boldness of fish or their predation risk have been found (CHEN *et al.* 2017, TOSETTO *et al.* 2017, CRITCHELL & HOOGENBOOM 2018, GUVEN *et al.* 2018, JACOB *et al.* 2019, LE BIHANIC *et al.* 2020, SCHMIEG *et al.* 2020a, YANG *et al.* 2020, CORMIER *et al.* 2021, SANTOS *et al.* 2021). However, in other studies effects of MP on risk-taking behavior (McCORMICK *et al.* 2020), the feeding behavior (WEN *et al.* 2018, YIN *et al.* 2018), the social behavior (YIN *et al.* 2018, YIN *et al.* 2019, RIOS-FUSTER *et al.* 2021) and the post-exposure predatory performance (DE SÁ *et al.* 2015, MIRANDA *et al.* 2019) were reported. PS and PE-MP were found to cause reduced velocity and range of movement (CHOI *et al.* 2018, YIN *et al.* 2018, YIN *et al.* 2019) but in other cases PS-MP and high-density PE-MP led to increased activity and swimming distance (LIMONTA *et al.* 2019, CHEN *et al.* 2020, McCORMICK *et al.* 2020). Behavior is a sensitive endpoint which is affected by many parameters and the chosen experimental design. This as well as the different fish species, different MP types, and particle concentrations can explain the different results in articles mentioned above.

#### 4.5 Biochemical responses

In none of the treatment groups any effect on the oxidative stress level of juvenile brown trout was found. Consistently, amitriptyline exposure did not affect the oxidative stress level of early life stages of brown trout (SCHMIEG *et al.* 2020a). In contrast, influences of amitriptyline on the oxidative stress level were observed in common carp (SEHONOVA *et al.* 2017) and zebrafish (YANG *et al.* 2014, SEHONOVA *et al.* 2019). The results show that oxidative stress responses induced by

amitriptyline are species-specific. Moreover, it is likely that higher concentrations of amitriptyline cause oxidative stress in fish while lower concentrations only cause moderate effects or even improve the antioxidant capacity.

Many studies investigated possible effects of PS-MP on different parameters indicating oxidative stress in fish with considerably varying results (LU *et al.* 2016, CHEN *et al.* 2017, QIAO *et al.* 2019, CHEN *et al.* 2020, DING *et al.* 2020, SCHMIEG *et al.* 2020a, SCHMIEG *et al.* 2020b, YANG *et al.* 2020, HUANG *et al.* 2021, LIU *et al.* 2022). However, it remains unclear under which conditions exposure to PS-MP causes oxidative stress in fish. The results of all these studies show that effects are not just related to one parameter like the size of the particles, but interdependences must be more complex. Possible explanations for the apparently contradictory results besides the size and shape of the MP are different experimental conditions and fish species or additives in the used polymers.

The hormone cortisol is known to be increased in reaction to stress in fish (WENDELAAR BONGA 1997), and antidepressants were shown to reduce their cortisol level after handling stress (KEYSOMI *et al.* 2013). In our experiment, the cortisol level of brown trout was not influenced by the exposure to amitriptyline, PS-MP or the mixture. Consistently with the results of our experiment, JAKUBOWSKA *et al.* (2020) found no significant effect of PS, polyethylene terephthalate (PET) or PE-MP on sea trout (*Salmo trutta* f. *trutta*). Likewise, no effect on the cortisol level was found in juvenile brown trout after exposure to up to 1,000 µg/L citalopram or 100 µg/L venlafaxine, two antidepressants ZIEGLER *et al.* (2021).

Amitriptyline can bind to muscarinic acetylcholine receptors and was shown to reduce the AChE activity in human erythrocyte membrane and serum (SNYDER & YAMAMURA 1977, MÜLLER *et al.* 2002). This mode of action might be the mechanistic explanation for AChE activity being affected by amitriptyline in brown trout in the present study: 100 µg/L amitriptyline caused a significant increase of AChE while the activity of the two tested CbEs was slightly but not significantly decreased in the first experiment. However, in the second experiment no significant effect of amitriptyline on the activity of AChE and CbEs was found. The lower amitriptyline concentrations in the second experiment might explain why no influence on AChE activity was observed. Accordingly, brown trout larvae exposed to higher amitriptyline concentrations (~48 µg/L) had a significantly higher activity of AChE and a significantly decreased activity of CbEs (SCHMIEG *et al.* 2020a). Furthermore, the activity of AChE was in general higher in the two months older trout of the second experiment, which could also indicate different sensitivities to neurotoxic effects at different life stages.

PS-MP had no influence on the AChE or CbE activity. These results are consistent with other studies investigating effects of PS-MP in juvenile and early life stages of brown trout (SCHMIEG *et al.* 2020a, SCHMIEG *et al.* 2020b), zebrafish larvae (CHEN *et al.* 2017) or goldfish (YANG *et al.* 2020). In red tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposure to different sizes of PS-MP caused either an increase or decrease of AChE activity after different times of exposure (DING *et al.* 2020). Moreover, HUANG *et al.* (2021) reported that AChE activity in the brain of red tilapia were significantly reduced after a 14 d treatment with 5 µm PS-MP.

#### 4.6 Co-exposure of amitriptyline and MP

After co-exposure to amitriptyline and PS-MP, effects observed in fish did not differ much from those which occurred in fish exposed to amitriptyline alone. Only the highest concentration of MP slightly reduced the influence of the antidepressant on the swimming behavior during the experiment. One possible reason for this could be that the high MP concentration reduced the bioavailability of amitriptyline in the water. WAGSTAFF *et al.* (2022) showed that significant adsorption of amitriptyline to PA-MP occurs within 24 h at 20 °C (MP-wastewater distribution coefficient 749 L/kg).

Generally, it was shown in the past that different concentrations of MP can modulate the toxicity of chemicals in different ways. In larvae of marine medaka, the co-exposure to phenanthrene and PS-MP alleviated the teratogenicity and lethality of phenanthrene (LI *et al.* 2020b). However, the effect did not occur at higher MP concentrations and the phenanthrene concentration in the water was not changed (LI *et al.* 2020b). A similar effect was observed by CHEN *et al.* (2017): co-exposure of zebrafish to PS-MP and low concentrations of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2) reduced the effects of EE2 on the locomotion of the fish. In contrast, mixtures of PS-MP with higher EE2 concentrations even enhanced the effect of EE2 on the locomotion of zebrafish (CHEN *et al.* 2017). The study of HUANG *et al.* (2021) showed complex interactions of the co-exposure to virgin or altered PS-MP with two pharmaceuticals in red tilapia (*Oreochromis niloticus*). For example, the inhibitory effect on AChE activity caused by the antibiotic sulfamethoxazole was alleviated by co-exposure to aged PS-MP (HUANG *et al.* 2021). In these studies, the authors hypothesized that the described effects were caused by a reduction of bioavailability of the tested substances due to adsorption to the MP (CHEN *et al.* 2017, LI *et al.* 2020b, HUANG *et al.* 2021).

## 5 Conclusions

The highest tested amitriptyline concentration of 1,000 µg/L (measured concentration 135 µg/L) caused life-threatening conditions in brown trout within one day and significant behavioral changes occurred at low amitriptyline concentrations in the magnitude of µg/L. To assess the risk of the antidepressant also mixture toxicity should be taken into consideration: most of the used pharmaceuticals to treat depression share the same mode of action and increase the serotonin, noradrenaline, and dopamine concentrations in the synaptic cleft. Therefore, it can be anticipated that if trout are exposed to different antidepressants the effects of the substances affect the organisms in an additive way.

In contrast PS-MP did not influence any of the investigated parameters at high concentrations of  $10^4$  and  $10^5$  particles/L. Furthermore, MP did not modulate most of the effects caused by amitriptyline exposure. However, the effects of MP on fish in general and possible modulations by MP of effects resulting from other pollutants should not be underestimated and underlying mechanisms should be further investigated.

## Supplementary Materials

The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/toxics10120763/s1>, Table S1: Size ranges and counted particle numbers of PS particles in an exemplarily measured stock suspension; Figure S1: Histogram of size ranges and counted particle numbers of PS-MP in an exemplarily measured stock suspension; Table S2: Water parameters first experiment; Table S3: Water parameters second experiment; Table S4: Operating parameters of the triple quadrupole MS (Agilent 6490 QqQ) in positive mode (ESI+); Table S5: Specific measurement parameters for amitriptyline with LC-QqQ in water samples. Intraday variation (RSD) is calculated with a 1 µg/L standard (10 µL injection volume and 4 replicates); Table S6: Used data transformations; Table S7: Further statistical information on the second experiment; Table S8: Results of the treatment groups with 300 µg/L and 1000 µg/L amitriptyline; CRED Reporting; Data first experiment; Data second experiment.

## Acknowledgments

Particular thanks go to Martin Jekel for the initiation and coordination of the MiWa project. Moreover, the authors wish to thank Michael Ziegler, Katharina Peschke, Stefanie Jacob, Sabrina Wilhelm, Helene Eckstein and Antonia Kiefer for help, discussion, and technical assistance. We acknowledge support by the Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

### Author Contributions

Conceptualization, R.T., H.-R.K. and H.S.; methodology, H.S., S.K., A.S.R. and C.Z.; formal analysis, H.S.; investigation, H.S., K.K., I.M.S. and C.Z.; resources, A.S.R., C.Z., H.-R.K. and R.T.; data curation, H.S.; writing—original draft preparation, H.S. and C.Z.; writing—review and editing, H.S., S.K., K.K., A.S.R., I.M.S., C.Z., H.-R.K. and R.T.; visualization, H.S.; supervision, C.Z., H.-R.K. and R.T.; project administration, R.T.; funding acquisition, R.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### Funding

This research was funded by the German Ministry of Education and Research, support code 02WRS1378. The experiments were conducted within the joint project MiWa (Microplastics in the water cycle—sampling, sample preparation, analytics, occurrence, removal, and assessment).

### References

- ALLEN S., ALLEN D., PHOENIX V. R., LE ROUX G., DURÁNTEZ JIMÉNEZ P., SIMONNEAU A., BINET S. AND GALOP D. (2019). "Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment." Nat. Geosci. **12**(5): 339-344.
- AMINOT Y., LITRICO X., CHAMBOLLE M., ARNAUD C., PARDON P. AND BUDZINDKI H. (2015). "Development and application of a multi-residue method for the determination of 53 pharmaceuticals in water, sediment, and suspended solids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Analytical and Bioanalytical Chemistry **407**(28): 8585-8604.
- BAENA-NOGUERAS R. M., GONZÁLEZ-MAZO E. AND LARA-MARTÍN P. A. (2017). "Degradation kinetics of pharmaceuticals and personal care products in surface waters: photolysis vs biodegradation." Science of The Total Environment **590-591**: 643-654.
- BAKER D. R. AND KASPRZYK-HORDERN B. (2013). "Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments." Science of The Total Environment **454-455**: 442-456.
- BATEL A., BAUMANN L., CARTENY C. C., CORMIER B., KEITER S. H. AND BRAUNBECK T. (2020). "Histological, enzymatic and chemical analyses of the potential effects of differently sized microplastic particles upon long-term ingestion in zebrafish (*Danio rerio*)." Marine Pollution Bulletin **153**: 111022.
- BATES D., MÄCHLER M., BOLKER B. AND WALKER S. (2015). "Fitting Linear Mixed-Effects Models using lme4." J. Stat. Softw. **67**(1): 1 - 48.
- BENJAMINI Y. AND HOCHBERG Y. (1995). "Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing." J. R. Stat. Soc., B: Stat. Methodol. **57**(1): 289-300.
- BERGMANN M., COLLARD F., FABRES J., GABRIELSEN G. W., PROVENCHER J. F., ROCHMAN C. M., VAN SEBILLE E. AND TEKMAN M. B. (2022). "Plastic pollution in the Arctic." Nat. Rev. Earth Environ.
- BERKNER S. AND THIERBACH C. (2014). "Biodegradability and transformation of human pharmaceutical active ingredients in environmentally relevant test systems." ESPR **21**(16): 9461-9467.
- BOYER E. W. AND SHANNON M. (2005). "The Serotonin Syndrome." New England Journal of Medicine **352**(11): 1112-1120.
- BREYER-PFAFF U. (2004). "The metabolic fate of amitriptyline, nortriptyline and amitriptylinoxide in man." Drug Metabolism Reviews **36**(3-4): 723-746.

- BROOKS M. E., KRISTENSEN K., BENTHEM K. J. V., MAGNUSSON A., BERG C. W., NIELSEN A., SKAUG H. J., MÄCHLER M. AND BOLKER B. M. (2017). "glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling." R.J. **9**(2): 378-400.
- BURNS E. E. AND BOXALL A. B. A. (2018). "Microplastics in the aquatic environment: Evidence for or against adverse impacts and major knowledge gaps." Environmental Toxicology and Chemistry **37**(11): 2776-2796.
- CATARINO A. I., KRAMM J., VÖLKER C., HENRY T. B. AND EVERAERT G. (2021). "Risk posed by microplastics: Scientific evidence and public perception." Curr. Opin. Green Sustain. Chem. **29**: 100467.
- CHANG P.-H., JIANG W.-T., LI Z., KUO C.-Y., JEAN J.-S., CHEN W.-R. AND LV G. (2014). "Mechanism of amitriptyline adsorption on Ca-montmorillonite (SAz-2)." Journal of Hazardous Materials **277**: 44-52.
- CHEN Q., GUNDLACH M., YANG S., JIANG J., VELKI M., YIN D. AND HOLLERT H. (2017). "Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity." Science of The Total Environment **584-585**: 1022-1031.
- CHEN Q., LACKMANN C., WANG W., SEILER T.-B., HOLLERT H. AND SHI H. (2020). "Microplastics lead to hyperactive swimming behaviour in adult zebrafish." Aquatic Toxicology **224**: 105521.
- CHOCKALINGAM R., GOTT B. M. AND CONWAY C. R. (2019). Tricyclic antidepressants and monoamine oxidase Inhibitors: are they too old for a new look? Antidepressants: From Biogenic Amines to New Mechanisms of Action. M. Macaluso and S. H. Preskorn. Cham, Switzerland, Springer. **250**: 37-48.
- CHOI J. S., JUNG Y.-J., HONG N.-H., HONG S. H. AND PARK J.-W. (2018). "Toxicological effects of irregularly shaped and spherical microplastics in a marine teleost, the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*)." Marine Pollution Bulletin **129**(1): 231-240.
- CORMIER B., LE BIHANIC F., CABAR M., CREBASSA J.-C., BLANC M., LARSSON M., DUBOCQ F., YEUNG L., CLÉRANDÉAU C., KEITER S. H., CACHOT J., BÉGOUT M.-L. AND COUSIN X. (2021). "Chronic feeding exposure to virgin and spiked microplastics disrupts essential biological functions in teleost fish." Journal of Hazardous Materials **415**: 125626.
- CRITCHELL K. AND HOOGENBOOM M. O. (2018). "Effects of microplastic exposure on the body condition and behaviour of planktivorous reef fish (*Acanthochromis polyacanthus*)." PloS One **13**(3): e0193308.
- DAVID A., LANGE A., TYLER C. R. AND HILL E. M. (2018). "Concentrating mixtures of neuroactive pharmaceuticals and altered neurotransmitter levels in the brain of fish exposed to a wastewater effluent." Science of The Total Environment **621**: 782-790.
- DE SÁ L. C., LUÍS L. G. AND GUILHERMINO L. (2015). "Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions." Environmental Pollution **196**: 359-362.
- DE SALES-RIBEIRO C., BRITO-CASILLAS Y., FERNANDEZ A. AND CABALLERO M. J. (2020). "An end to the controversy over the microscopic detection and effects of pristine microplastics in fish organs." Scientific reports **10**(1): 12434.
- DEMIN K. A., KOLESNIKOVA T. O., KHATSKO S. L., MESHALKINA D. A., EFIMOVA E. V., MORZHERIN Y. Y. AND KALUEFF A. V. (2017). "Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes." Neurotoxicology and Teratology **62**: 27-33.
- DING J., HUANG Y., LIU S., ZHANG S., ZOU H., WANG Z., ZHU W. AND GENG J. (2020). "Toxicological effects of nano- and micro-polystyrene plastics on red tilapia: Are larger plastic particles more harmless?" Journal of Hazardous Materials **396**: 122693.
- EITZEN L., PAUL S., BRAUN U., ALTMANN K., JEKEL M. AND RUHL A. S. (2019). "The challenge in preparing particle suspensions for aquatic microplastic research." Environmental Research **168**: 490-495.
- ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. AND FEATHERSTONE R. M. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochemical Pharmacology **7**(2): 88-95.
- EU (2006). "Council Directive 2006/88/EC." OJEU L **328**: 14-56.

- FENT K., WESTON A. A. AND CAMINADA D. (2006). "Ecotoxicology of human pharmaceuticals." *Aquatic Toxicology* **76**(2): 122-159.
- FERREY M. L., HEISKARY S., GRACE R., HAMILTON M. C. AND LUECK A. (2015). "Pharmaceuticals and other anthropogenic tracers in surface water: A randomized survey of 50 Minnesota lakes." *Environmental Toxicology and Chemistry* **34**(11): 2475-2488.
- GRBIĆ J., HELM P., ATHEY S. AND ROCHMAN C. M. (2020). "Microplastics entering northwestern Lake Ontario are diverse and linked to urban sources." *Water Research* **174**: 115623.
- GUVEN O., BACH L., MUNK P., DINH K. V., MARIANI P. AND NIELSEN T. G. (2018). "Microplastic does not magnify the acute effect of PAH pyrene on predatory performance of a tropical fish (*Lates calcarifer*)." *Aquatic Toxicology* **198**: 287-293.
- HERMES-LIMA M., WILLMORE W. G. AND STOREY K. B. (1995). "Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation." *Free Radical Biology and Medicine* **19**(3): 271-280.
- HUANG I. J., SIROTKIN H. I. AND MCELROY A. E. (2019). "Varying the exposure period and duration of neuroactive pharmaceuticals and their metabolites modulates effects on the visual motor response in zebrafish (*Danio rerio*) larvae." *Neurotoxicology and Teratology* **72**: 39-48.
- HUANG Y., DING J., ZHANG G., LIU S., ZOU H., WANG Z., ZHU W. AND GENG J. (2021). "Interactive effects of microplastics and selected pharmaceuticals on red tilapia: Role of microplastic aging." *Science of The Total Environment* **752**: 142256.
- JACOB H., GILSON A., LANCTÔT C., BESSON M., METIAN M. AND LECCHINI D. (2019). "No effect of polystyrene microplastics on foraging activity and survival in a post-larvae coral-reef fish, *Acanthurus triostegus*." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **102**(4): 457-461.
- JAKUBOWSKA M., BIAŁOWAŚ M., STANKEVIČIŪTĖ M., CHOMICZEWSKA A., PAŽUSIENĖ J., JONKO-SOBUŠ K., HALLMANN A. AND URBAN-MALINGA B. (2020). "Effects of chronic exposure to microplastics of different polymer types on early life stages of sea trout *Salmo trutta*." *Science of The Total Environment* **740**: 139922.
- JANG S.-W., LIU X., CHAN C.-B., WEINSHENKER D., HALL R. A., XIAO G. AND YE K. (2009). "Amitriptyline is a TrkA and TrkB receptor agonist that promotes TrkA/TrkB heterodimerization and has potent neurotrophic activity." *Chemistry & Biology* **16**(6): 644-656.
- KASPRZYK-HORDERN B., DINDALE R. M. AND GUWY A. J. (2009). "The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters." *Water Research* **43**(2): 363-380.
- KEYSOMI E. M., SUDAGAR M. AND ASL N. (2013). "Effect of citalopram on reducing transportation stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *J. Aquac. Res. Dev.* **4**(3).
- LAJEUNESSE A., GAGNON C., GAGNÉ F., LOUIS S., ČEJKA P. AND SAUVÉ S. (2011). "Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment – Evidence of biological effects." *Chemosphere* **83**(4): 564-571.
- LAJEUNESSE A., GAGNON C. AND SAUVÉ S. (2008). "Determination of basic antidepressants and their N-Desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry." *Analytical Chemistry* **80**(14): 5325-5333.
- LAU W. W. Y., SHIRAN Y., BAILEY R. M., COOK E., STUCHTEY M. R., KOSKELLA J., VELIS C. A., GODFREY L., BOUCHER J., MURPHY M. B., THOMPSON R. C., JANKOWSKA E., CASTILLO CASTILLO A., PILDITCH T. D., DIXON B., KOERSELMAN L., KOSIOR E., FAVOINO E., GUTBERLET J., BAULCH S., ATREYA M. E., FISCHER D., HE K. K., PETIT M. M., SUMAILA U. R., NEIL E., BERNHOFEN M. V., LAWRENCE K. AND PALARDY J. E. (2020). "Evaluating scenarios toward zero plastic pollution." *Science* **369**(6510): 1455-1461.
- LE BIHANIC F., CLÉRANDEAU C., CORMIER B., CREBASSA J.-C., KEITER S. H., BEIRAS R., MORIN B., BÉGOUT M.-L., COUSIN X. AND CACHOT J. (2020). "Organic contaminants sorbed to microplastics affect marine medaka fish early life stages development." *Marine Pollution Bulletin* **154**: 111059.

- LESLIE H. A., BRANDSMA S. H., VAN VELZEN M. J. M. AND VETHAAK A. D. (2017). "Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota." Environment International **101**: 133-142.
- LI C., BUSQUETS R. AND CAMPOS L. C. (2020a). "Assessment of microplastics in freshwater systems: A review." Science of the Total Environment **707**: 135578.
- LI Y., WANG J., YANG G., LU L., ZHENG Y., ZHANG Q., ZHANG X., TIAN H., WANG W. AND RU S. (2020b). "Low level of polystyrene microplastics decreases early developmental toxicity of phenanthrene on marine medaka (*Oryzias melastigma*)." Journal of Hazardous Materials **385**: 121586.
- LIMONTA G., MANCIA A., BENKHALQUI A., BERTOLUCCI C., ABELLI L., FOSSI M. C. AND PANTI C. (2019). "Microplastics induce transcriptional changes, immune response and behavioral alterations in adult zebrafish." Scientific Reports **9**(1): 15775.
- LITHNER D., DAMBERG J., DAVE G. AND LARSSON Å. (2009). "Leachates from plastic consumer products – Screening for toxicity with *Daphnia magna*." Chemosphere **74**(9): 1195-1200.
- LIU Q., HE H., YANG J., FENG X., ZHAO F. AND LYU J. (2020). "Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study." Journal of Psychiatric Research **126**: 134-140.
- LIU Y., JIA X., ZHU H., ZHANG Q., HE Y., SHEN Y., XU X. AND LI J. (2022). "The effects of exposure to microplastics on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) at the physiological, biochemical, and transcriptomic levels." Chemosphere **286**: 131831.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. AND RANDALL R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- LU Y., ZHANG Y., DENG Y., JIANG W., ZHAO Y., GENG J., DING L. AND REN H. (2016). "Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver." Environmental Science & Technology **50**(7): 4054-4060.
- LV G., STOCKWELL C., NILES J., MINEGAR S., LI Z. AND JIANG W.-T. (2013). "Uptake and retention of amitriptyline by kaolinite." Journal of Colloid and Interface Science **411**: 198-203.
- MARKWELL M. A. K., HAAS S. M., BIEBER L. L. AND TOLBERT N. E. (1978). "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples." Analytical Biochemistry **87**(1): 206-210.
- MAXIMINO C., MARQUES DE BRITO T., DIAS C. A. G. D. M., GOUVEIA A. AND MORATO S. (2010). "Scototaxis as anxiety-like behavior in fish." Nature Protocols **5**(2): 209-216.
- MCCORMICK M. I., CHIVERS D. P., FERRARI M. C. O., BLANDFORD M. I., NANNINGA G. B., RICHARDSON C., FAKAN E. P., VAMVOUNIS G., GULIZIA A. M. AND ALLAN B. J. M. (2020). "Microplastic exposure interacts with habitat degradation to affect behaviour and survival of juvenile fish in the field." Proc. R. Soc. B: Biol. Sci. **287**(1937): 20201947.
- MEADOR J. P., YEH A., YOUNG G. AND GALLAGHER E. P. (2016). "Contaminants of emerging concern in a large temperate estuary." Environmental Pollution **213**: 254-267.
- MESHALKINA D. A., KYSIL E. V., ANTONOVA K. A., DEMIN K. A., KOLESNIKOVA T. O., KHATSKO S. L., GAINETDINOV R. R., ALEKSEEVA P. A. AND KALUEFF A. V. (2018). "The effects of chronic amitriptyline on zebrafish behavior and monoamine neurochemistry." Neurochemical Research **43**(6): 1191-1199.
- MIRANDA T., VIEIRA L. R. AND GUILHERMINO L. (2019). "Neurotoxicity, behavior, and lethal effects of cadmium, microplastics, and their mixtures on *Pomatoschistus microps* juveniles from two wild populations exposed under laboratory conditions—implications to environmental and human risk assessment." International Journal of Environmental Research and Public Health **16**(16): 2857.
- MOERMOND C. T. A., KASE R., KORKARIC M. AND ÅGERSTRAND M. (2016). "CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data." Environmental Toxicology and Chemistry **35**(5): 1297-1309.

- MONSERRAT J. M., GERACITANO L. A., PINHO G. L. L., VINAGRE T. M., FALEIROS M., ALCIATI J. C. AND BIANCHINI A. (2003). "Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **45**(2): 177-183.
- MUIR D., SIMMONS D., WANG X., PEART T., VILLELLA M., MILLER J. AND SHERRY J. (2017). "Bioaccumulation of pharmaceuticals and personal care product chemicals in fish exposed to wastewater effluent in an urban wetland." Scientific reports **7**(1): 16999-16999.
- MÜLLER T. C., ROCHA J. B. T., MORSCH V. M., NEIS R. T. AND SCHETINGER M. R. C. (2002). "Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity." Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. **1587**(1): 92-98.
- NEMATDOOST HAGHI B. AND BANAEI M. (2017). "Effects of micro-plastic particles on paraquat toxicity to common carp (*Cyprinus carpio*): biochemical changes." International Journal of Environmental Science and Technology **14**(3): 521-530.
- NGUYEN T., SHAPIRO D. A., GEORGE S. R., SETOLA V., LEE D. K., CHENG R., RAUSER L., LEE S. P., LYNCH K. R., ROTH B. L. AND DOWD B. F. (2001). "Discovery of a novel member of the histamine receptor family." Molecular Pharmacology **59**(3): 427.
- OECD (2019a). Health at a Glance 2019.
- OECD (2019b). Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test.
- OLIVEIRA M., RIBEIRO A., HYLLAND K. AND GUILHERMINO L. (2013). "Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae)." Ecological Indicators **34**: 641-647.
- PIVETTA R. C., RODRIGUES-SILVA C., RIBEIRO A. R. AND RATH S. (2020). "Tracking the occurrence of psychotropic pharmaceuticals in Brazilian wastewater treatment plants and surface water, with assessment of environmental risks." Science of The Total Environment **727**: 138661.
- QIAO R., SHENG C., LU Y., ZHANG Y., REN H. AND LEMOS B. (2019). "Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish." Science of The Total Environment **662**: 246-253.
- QIU W., WU M., LIU S., CHEN B., PAN C., YANG M. AND WANG K.-J. (2017). "Suppressive immunoregulatory effects of three antidepressants via inhibition of the nuclear factor- $\kappa$ B activation assessed using primary macrophages of carp (*Cyprinus carpio*)." Toxicology and Applied Pharmacology **322**: 1-8.
- QUITKIN F. M., RABKIN J. G., ROSS D. AND STEWART J. W. (1984). "Identification of true drug response to antidepressants: Use of pattern analysis." Archives of General Psychiatry **41**(8): 782-786.
- R CORE TEAM (2019). "R: A language and environment for statistical computing". R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- RAULT M., COLLANGE B., MAZZIA C. AND CAPOWIEZ Y. (2008). "Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion." Soil Biology and Biochemistry **40**(12): 3086-3091.
- REHSE S., KLOAS W. AND ZARFL C. (2018). "Microplastics reduce short-term effects of environmental contaminants. Part I: Effects of bisphenol A on freshwater zooplankton are lower in presence of polyamide particles." International Journal of Environmental Research and Public Health **15**(2): 280.
- Rios-Fuster B., Arechavala-Lopez P., García-Marcos K., Alomar C., Compa M., Álvarez E., Julià M. M., Solomando Martí A., Sureda A. and Deudero S. (2021). "Experimental evidence of physiological and behavioral effects of microplastic ingestion in *Sparus aurata*." Aquatic Toxicology **231**: 105737.
- SANCHEZ-HERNANDEZ J. C., MAZZIA C., CAPOWIEZ Y. AND RAULT M. (2009). "Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications." Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. **150**(4): 503-511.

- SANDERSON H., JOHNSON D. J., WILSON C. J., BRAIN R. A. AND SOLOMON K. R. (2003). "Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening." Toxicology Letters **144**(3): 383-395.
- SANTOS D., LUZIO A., MATOS C., BELLAS J., MONTEIRO S. M. AND FÉLIX L. (2021). "Microplastics alone or co-exposed with copper induce neurotoxicity and behavioral alterations on zebrafish larvae after a subchronic exposure." Aquatic Toxicology **235**: 105814.
- SCHIAVO S., OLIVIERO M., ROMANO V., DUMONTET S., MANZO S. AND LIU G. (2018). "Ecotoxicological assessment of virgin plastic pellet leachates in freshwater matrices." J. Environ. Account. Manag. **6**: 345-353.
- SCHMIEG H., BURMESTER J. K., KRAIS S., RUHL A. S., TISLER S., ZWIENER C., KÖHLER H.-R. AND TRIEBSKORN R. (2020a). "Interacting effects of polystyrene microplastics and the antidepressant amitriptyline on early life stages of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)." Water **12**(9): 2361.
- SCHMIEG H., HUPPERTSBERG S., KNEPPER T. P., KRAIS S., REITTER K., REZBACH F., RUHL A. S., KÖHLER H.-R. AND TRIEBSKORN R. (2020b). "Polystyrene microplastics do not affect juvenile brown trout (*Salmo trutta f. fario*) or modulate effects of the pesticide methiocarb." ESEU **32**(1): 49.
- SCHWABE U., PAFFRATH D., LUDWIG W.-D. AND KLAUBER J. (2019). Arzneiverordnungs-Report 2019 - Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare. Berlin, Germany, Springer.
- SEHONOVA P., HODKOVICOVA N., URBANOVA M., ÖRN S., BLAHOVA J., SVOBODOVA Z., FALDYNA M., CHLOUPEK P., BRIEDIKOVA K. AND CARLSSON G. (2019). "Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians." Environmental Pollution **254**: 112999.
- SEHONOVA P., PLHALOVA L., BLAHOVA J., DOUBKOVA V., MARSALEK P., PROKES M., TICHY F., SKLADANA M., FIORINO E., MIKULA P., VECEREK V., FAGGIO C. AND SVOBODOVA Z. (2017). "Effects of selected tricyclic antidepressants on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio*)." Chemosphere **185**: 1072-1080.
- SNYDER S. H. AND YAMAMURA H. I. (1977). "Antidepressants and the muscarinic acetylcholine receptor." Archives of General Psychiatry **34**(2): 236-239.
- SOLOMANDO A., CAPÓ X., ALOMAR C., COMPA M., VALENCIA J. M., SUREDA A. AND DEUDERO S. (2021). "Assessment of the effect of long-term exposure to microplastics and depuration period in *Sparus aurata* Linnaeus, 1758: Liver and blood biomarkers." Science of The Total Environment **786**: 147479.
- STEWART A., GAIKWAD S., KYZAR E., GREEN J., ROTH A. AND KALUEFF A. V. (2012). "Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review." Neuropharmacology **62**(1): 135-143.
- TATSUMI M., GROSHAN K., BLAKELY R. D. AND RICHELSON E. (1997). "Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters." European Journal of Pharmacology **340**(2): 249-258.
- THERNEAU T. M. (2020). "coxme: Mixed Effects Cox Models." R package Version: 2.2-16. Retrieved 13 September 2022, 2022, Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/coxme/index.html>.
- THOMAS K. V., DA SILVA F. M. A., LANGFORD K. H., DE SOUZA A. D. L., NIZZETO L. AND WAICHMAN A. V. (2014). "Screening for selected human pharmaceuticals and cocaine in the urban streams of Manaus, Amazonas, Brazil." JAWRA **50**(2): 302-308.
- TOGOLA A. AND BUDZINSKI H. (2008). "Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples." Journal of Chromatography A **1177**(1): 150-158.
- TOSETTO L., WILLIAMSON J. E. AND BROWN C. (2017). "Trophic transfer of microplastics does not affect fish personality." Animal Behaviour **123**: 159-167.
- TRIEBSKORN R., BRAUNBECK T., GRUMMT T., HANSLIK L., HUPPERTSBERG S., JEKEL M., KNEPPER T. P., KRAIS S., MÜLLER Y. K., PITTROFF M., RUHL A. S., SCHMIEG H., SCHÜR C., STROBEL C., WAGNER M., ZUMBÜLTE N. AND KÖHLER H.-R. (2019). "Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review." Trends in Analytical Chemistry **110**: 375-392.

- VERBRUGGEN B., GUNNARSSON L., KRISTIANSSON E., ÖSTERLUND T., OWEN S. F., SNAPE J. R. AND TYLER C. R. (2017). "ECOdrug: a database connecting drugs and conservation of their targets across species." Nucleic Acids Research **46**(D1): D930-D936.
- VÖLKER C., KRAMM J. AND WAGNER M. (2020). "On the creation of risk: Framing of microplastics risks in science and media." Global Challenges **4**(6): 1900010.
- WAGSTAFF A., LAWTON L. A. AND PETRIE B. (2022). "Polyamide microplastics in wastewater as vectors of cationic pharmaceutical drugs." Chemosphere **288**: 132578.
- WANG W., NDUNGU A. W., LI Z. AND WANG J. (2017). "Microplastics pollution in inland freshwaters of China: A case study in urban surface waters of Wuhan, China." Science of The Total Environment **575**: 1369-1374.
- WEN B., ZHANG N., JIN S.-R., CHEN Z.-Z., GAO J.-Z., LIU Y., LIU H.-P. AND XU Z. (2018). "Microplastics have a more profound impact than elevated temperatures on the predatory performance, digestion and energy metabolism of an Amazonian cichlid." Aquatic Toxicology **195**: 67-76.
- WENDELAAR BONGA S. E. (1997). "The stress response in fish." Physiological Reviews **77**(3): 591-625.
- WU M., XIANG J., QUE C., CHEN F. AND XU G. (2015). "Occurrence and fate of psychiatric pharmaceuticals in the urban water system of Shanghai, China." Chemosphere **138**: 486-493.
- XIANG J., WU M., LEI J., FU C., GU J. AND XU G. (2018). "The fate and risk assessment of psychiatric pharmaceuticals from psychiatric hospital effluent." Ecotoxicology and Environmental Safety **150**: 289-296.
- YANG H., XIONG H., MI K., XUE W., WEI W. AND ZHANG Y. (2020). "Toxicity comparison of nano-sized and micron-sized microplastics to goldfish *Carassius auratus* larvae." Journal of Hazardous Materials **388**: 122058.
- YANG M., QIU W., CHEN J., ZHAN J., PAN C., LEI X. AND WU M. (2014). "Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline." Aquatic Toxicology **151**: 68-76.
- YIN L., CHEN B., XIA B., SHI X. AND QU K. (2018). "Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacobever (*Sebastes schlegelii*)." Journal of Hazardous Materials **360**: 97-105.
- YIN L., LIU H., CUI H., CHEN B., LI L. AND WU F. (2019). "Impacts of polystyrene microplastics on the behavior and metabolism in a marine demersal teleost, black rockfish (*Sebastes schlegelii*)." Journal of Hazardous Materials **380**: 120861.
- ZHAO H.-J., XU J.-K., YAN Z.-H., REN H.-Q. AND ZHANG Y. (2020). "Microplastics enhance the developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants by disturbing the thyroid function and metabolism in developing zebrafish." Environment International **140**: 105750.
- ZIARRUSTA H., MIJANGOS L., IZAGIRRE U., PLASSMANN M. M., BENSKIN J. P., ANAKABE E., OLIVARES M. AND ZULOAGA O. (2017). "Bioconcentration and biotransformation of amitriptyline in gilt-head bream." Environmental Science & Technology **51**(4): 2464-2471.
- ZIEGLER M., BANET M., BAUER R., KÖHLER H.-R., STEPINSKI S., TISLER S., HUHN C., ZWIENER C. AND TRIEBSKORN R. (2021). "Behavioral and developmental changes in brown trout after exposure to the antidepressant venlafaxine." Front. Environ. Sci. **8**(289).
- ZIEGLER M., KNOLL S., KÖHLER H. R., TISLER S., HUHN C., ZWIENER C. AND TRIEBSKORN R. (2020). "Impact of the antidepressant citalopram on the behaviour of two different life stages of brown trout." PeerJ **8**: e8765.

## Anhang

### Embryotest

Kunstwasser:

294 mg/L CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O  
 + 123,25 mg/L MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O  
 + 64,75 mg/L NaHCO<sub>3</sub>  
 + 5,75 mg/L KCl  
 Ad 1 L Aqua dest.

### Histologische Proben

**Tabelle A1:** Schritte zur Dehydrierung und Infiltration der histologischen Gewebeproben.

Schritt	Lösung	Dauer
Dehydrierung	70 % Ethanol	30 min
	70 % Ethanol	1 h 30 min
	80 % Ethanol	1 h
	90 % Ethanol	1 h
	96 % Ethanol	1 h
	100 % Ethanol	1 h
	100 % Ethanol	1 h
Intermedium 1	Isopropanol	1 h 30 min
	Isopropanol	2 h
Intermedium 2	Isopropanol/Paraffin (1:2)	3 h
Infiltration	Paraffin	3 h
	Paraffin	8 h

### Hämatoxylin-Eosin Färbung

Hämatoxylin:

Fertiglösung Hämalaun nach Mayer  
 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe,  
 Deutschland)

Eosin:

3,75 g Eosin  
 + 750 ml destilliertes Wasser +  
 8 Tropfen 100 % Essigsäure

Roti®-Histol:

Fertiglösung (Carl Roth GmbH + Co. KG,  
 Karlsruhe, Deutschland)

**Tabelle A2:** Hämatoxylin-Eosin Färbung.

<b>Medium</b>	<b>Dauer</b>
Roti – Histol	5 min
Roti – Histol	5 min
100 % Ethanol	5 min
90 % Ethanol	5 min
80 % Ethanol	5 min
70 % Ethanol	5 min
Aqua dest.	5 min
Hämatoxylin	4 min
Aqua dest.	4 s
Fließendes Leitungswasser	20 min
Eosin	5 min
70 % Ethanol	10 s
80 % Ethanol	5 min
90 % Ethanol	5 min
96 % Ethanol	5 min
100 % Ethanol	5 min
Roti®-Histol	5 min
Roti®-Histol	5 min

### Perjodsäure Schiff'sreagenz Alcianblau (PAS-Alcianblau) Färbung

1 % Perjodsäure:	7,5 g Perjodsäure + 750 mL Aqua dest.
Alcianblau:	10 g Alcianblau + 1 L 3 % Essigsäure
Sulfitwasser:	2227,5 mL Aqua dest. + 22,5 ml 1 M Salzsäure + 11,25 g Natriumdisulfit
Schiff'sches Reagenz:	Fertiglösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Roti®-Histol:	Fertiglösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

**Tabelle A3:** PAS- Alcianblau Färbung.

Medium	Dauer
Roti®-Histol	3 min
96 % Ethanol	2 min
80 % Ethanol	2 min
60 % Ethanol	2 min
Aqua dest.	5 min
3 % Essigsäure	3 min
Alcianblau	30 min
3 % Essigsäure	4 s
Aqua dest.	5 min
1 % Perjodsäure	10 min
Aqua dest.	5 s
Aqua dest.	5 s
Aqua dest.	5 s
Schiffssches Reagenz	5 min
Sulfitwasser	2 min
Sulfitwasser	2 min
Sulfitwasser	2 min
Fließendes Leitungswasser	15 min
Aqua dest.	5 s
70 % Ethanol	5 min
80 % Ethanol	5 min
90 % Ethanol	5 min
100%iges Ethanol	5 min
Roti®-Histol	5 min

## Stressprotein-Analyse

### Homogenisieren der Proben

Extraktionspuffer:

3,9 g Kaliumacetat  
+ 540 mg Magnesiumacetat +  
2,4 g HEPES ad 0,5 L Aqua bidest.  
auf pH 7,5 einstellen

SDS-Puffer:

20 mL Glycerin  
+ 3 g Natriumdodecylsulfat  
+ 300 µL β-Mercaptoethanol  
+ 140 mg Tris<sub>HCl</sub>  
+ 20 mg Tris<sub>Base</sub>  
+ 5 mg Bromphenolblau  
ad 100 ml Aqua bidest.

### Bradford-Assay

Bradford-Reagenz:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250  
+ 50 mL 95 % Ethanol  
+ 100 mL 85 % Phosphorsäure  
ad 1 L Aqua bidest.

## Gelelektrophorese

30 % Acrylamid/Bisacrylamid:	30 g Acrylamid + 300 mg N,N'-Bisacrylamid ad 100 ml Aqua bidest.
4 x Trenngelpuffer:	18,5 g Tris <sub>HCl</sub> + 76,95 g Tris <sub>Base</sub> + 2 g SDS ad 0,5 L Aqua bidest. pH auf 8,8 einstellen
4 x Sammelgelpuffer:	17,55 g Tris <sub>HCl</sub> + 1,68 g Tris <sub>Base</sub> + 2 g SDS ad 0,5 Aqua bidest. auf pH 6,8 einstellen
10 % Ammoniumpersulfat (APS):	1 g Ammoniumpersulfat ad 10 ml Aqua bidest.
TEMED:	Fertiglösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Trenngel ansetzen (für 2 Gele):	2,65 mL bidestilliertes Wasser + 3 mL Acrylamid/Bisacrylamid + 1,87 mL Trenngelpuffer + 40 µL Starter APS + 20 µL TEMED
Sammelgel ansetzen (für 2 Gele):	1,4 mL Aqua bidest. + 1 mL Acrylamid/Bisacrylamid + 0,6 mL Sammelgelpuffer + 10 µL Starter APS + 10 µL TEMED
10 x E-Puffer + SDS:	143 g Glycin + 30,3 g Tris <sub>Base</sub> + 10 g SDS ad 1 L Aqua bidest.

## Proteintransfer

10 x Transferpuffer:	9,5 g Tris <sub>HCl</sub> + 63,4 g Tris <sub>Base</sub> + 36,3 g Glycin + 4,6 g SDS ad 1 L Aqua bidest. auf pH 9 einstellen
1 x Transferpuffer:	80 mL 10 x Transferpuffer + 720 mL Aqua bidest. + 200 mL Methanol auf pH 9 einstellen

## Antikörper-Inkubation

10 x TBS:	88 g NaCl + 63,5 g Tris <sub>HCl</sub> + 11,8 g Tris <sub>Base</sub> ad 1 L Aqua bidest. auf pH 7,5 einstellen
1 x TBS:	100 mL 10 x TBS ad 1 L Aqua bidest. auf pH 7,5 einstellen
Absättigungslösung:	5 mL Pferdeserum + 5 mL TBS
1. Antikörperlösung:	4,5 mL TBS + 0,5 mL Pferdeserum + 1 µL 1. Antikörper (mouse anti-human Hsp70)
2. Antikörperlösung:	4,5 mL TBS + 0,5 mL Pferdeserum + 5 µL 2. Antikörper (goat anti-mouse IgG Peroxidase Konjugat)

## Färbung der Membranen

30 mM Tris:	0,66 g Tris <sub>HCl</sub> + 1,31 g Tris <sub>Base</sub> ad 0,5 L Aqua bidest. auf pH 8,5 einstellen
Färbelösung (für 2 Filter):	4,5 mg 4-Chlor(1)naphtol + 1,5 mL Methanol + 25 mL 30 mM Tris + 40 µL 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## Cortisolgehalt

PBS-Puffer:	12,01 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat + 1,79 g Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat + 1 L Aqua bidest. pH auf 7,6 einstellen
-------------	---

## Superoxiddismutase-Aktivität

PBS-Puffer:	11,18 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat + 2,62 g Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat + 1 L Aqua bidest., pH auf 7,4 einstellen
HEPES-Puffer:	190 mg Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) + 19,127 g Mannitol + 11,981 g Saccharose + 0,5 L Aqua bidest. pH auf 7,2 einstellen

## Anhang

Probenpuffer:	7,88 g Tris <sub>HCl</sub> + 1 L Aqua bidest. pH auf 8 einstellen
Assay-Puffer:	7,88 g Tris <sub>HCl</sub> + 39,3 mg Diethylentriaminpentaessigsäure + 13,6 mg Hypoxanthin + 1 L Aqua bidest. pH auf 8 einstellen

## Lipidperoxid-Analyse

FeSO <sub>4</sub> -Lösung:	208,515 mg ad 1 L Aqua bidest.
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Lösung:	3,99 mL ad 1 L Aqua bidest.
Xylenolorange-Lösung:	228,174 mg ad 1 L Aqua bidest.
Cumolhydroperoxid-Lösung:	75 µl + 0,5 L Aqua bidest.

## B-Esterasen-Aktivität

### Homogenisierung der Proben

Aprotinin:	5 mg Aprotinin + 1 mL Aqua bidest.
Leupeptin:	5 mg Leupeptin + 1 mL Aqua bidest.
Pepstatin:	5 mg Pepstatin + 500 µL Aqua bidest. + 500 µL 100 % Ethanol
Antipain:	1 mg Antipain + 1 mL Aqua bidest.
Trypsin:	100 mg Trypsin + 1 mL Aqua bidest
Inhibitor Mix:	100 µL Aptotinin + 100 µL Leupeptin + 100 µL Pepstatin + 100 µL Antipain + 100 µL Trypsin
2 x Tris-LS:	1,21 g Tris <sub>Base</sub> + 0,584 g Natriumchlorid + 0,5 L Aqua bidest. pH auf 7,3 einstellen
Extraktionslösung:	5 ml 2x Tris-LS Puffer + 5 mL Aqua bidest. + 50 µL Inhibitor Mix

## Lowry Assay

Lösung A:	20 g Natriumcarbonat + 4 g Natriumhydroxid + 1,6 g Natriumtartrate + 10 g Natriumdodecylsulfat + 1 L Aqua bidest.
Lösung B:	4 g Kupfersulfat-Pentahydrat + 100 mL Aqua bidest.
Lösung C:	19,8 mL Lösung A + 200 µL Lösung B

## Acetylcholinesterase-Aktivität

Natriumhydrogenphosphat-Puffer:	34,5 g Natriumhydrogenphosphat-monohydrat ad 0,5 L Aqua bidest.
DTNB Lösung:	594,6 mg 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure + 223 mg Natriumhydrogencarbonat + 4 mL Natriumhydrogenphosphat Puffer + 100 mL Aqua bidest.
Ellman-Puffer:	4 mL Natriumhydrogenphosphatpuffer + 0,5 mL DTNB Lösung + 13,1 mL Aqua bidest.
AcSCh Substratlösung:	867,6 mg Acetylthiocholiniodid + 100 mL Aqua bidest.

## CbE-Aktivität mit NPA-Substrat

Tris-EDTA Puffer:	1,21 g Tris <sub>Base</sub> + 0,186 g Ethylendiamintetraessigsäure + 0,5 L Aqua bidest. pH auf 8 einstellen
NPA-Substratlösung:	181,5 mg 4-Nitrophenylacetat + 10 mL Ethanol

## CbE-Aktivität mit NPV-Substrat

Tris-HCl Puffer:	3,02 g Tris <sub>Base</sub> + 0,5 L Aqua bidest. pH auf 7,5 einstellen
NPV-Substratlösung: + 45 mL Ethanol	1 g 4-Nitrophenylvalerat

## Publikationsliste und Konferenzbeiträge

### Schriftliche Publikationen (chronologisch absteigend)

SCHMIEG H., FERLING H., BUCHER K. A., JACOB S., REGNERY J., SCHRADER H., SCHWAIGER J., FRIESEN A. (2025). Brodifacoum Causes Coagulopathy, Hemorrhages, and Mortality in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) at Environmentally Relevant Hepatic Residue Concentrations". Ecotoxicology and Environmental Safety. **289**: 117629, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.117629>

REGNERY J., SCHMIEG H., SCHRADER H., ZINKE O., GETHÖFFER F., DAHL S.-A., SCHAFFER M., BACHTIN J., MÖHLENKAMP C., FRIESEN A. (2024). "Rodenticide contamination of cormorants and mergansers feeding on wild fish." Environmental Chemistry Letters. **22**: 2611–2617, <https://doi.org/10.1007/s10311-024-01762-y>

SCHMIEG H., KRAIS S., KÜBLER K., RUHL A. S., SCHMIDGALL I. M., ZWIENER C., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2022). "Effects of the Antidepressant Amitriptyline on Juvenile Brown Trout and their Modulation by Microplastics." Toxics. **10**(12): 763, <https://doi.org/10.3390/toxics10120763>

KRAIS S., ANTHES N., HUPPERTSBERG S., KNEPPER T. P., PESCHKE K., RUHL A. S., SCHMIEG H., SCHWARZ T., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2022). "Polystyrene Microplastics Modulate the Toxicity of the Hydrophilic Insecticide Thiachloprid for Chironomid Larvae and Also Influence Their Burrowing Behavior. Microplastics." Microplastics, **1** (3): 505-519. <https://doi.org/10.3390/microplastics1030036>

SCHMIEG H., BURMESTER J. K.Y., KRAIS S., RUHL A. S., TISLER S., ZWIENER C., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2020). "Interacting Effects of Polystyrene Microplastics and the Antidepressant Amitriptyline on Early Life Stages of Brown Trout (*Salmo trutta* f. *fario*)." Water, **12** (9): 2361, <https://doi.org/10.3390/w12092361>

SCHMIEG H., HUPPERTSBERG S., KNEPPER T. P., KRAIS S., REITTER K., REZBACH F., RUHL A. S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2020). "Polystyrene microplastics do not affect juvenile brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) or modulate effects of the pesticide methiocarb." Environmental Sciences Europe, **32**: 49, <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00327-4>

## Publikationsliste und Konferenzbeiträge

JEKEL M., ANGER P., BANNICK C. G., BARTHEL A.-K., BRAUN U., BRAUNBECK T., DITTMAR S., EISENTRAUT P., ELSNER M., GNIRB R., GRUMMT T., HANSLIK L., HUPPERTSBERG S., IVLEVA N. P., KLÖCKNER P., KNEPPER T. P., KÖHLER H.-R., KRAIS S., KUCKELKORN J., MAY E. C., MÜLLER Y. K., NIEBNER R., OBERMAIER N., OEHLMANN J., PITTRUFF M., REEMTSMA T., SCHMIEG H., SCHMITT T., SCHÜR C., STORCK F. R., STROBEL C., TRIEBSKORN R., WAGNER S., WAGNER M., WITZIG C. S., ZUMBÜLTE N., RUHL A. S. (2020). „Mikroplastik im Wasserkreislauf – Probennahme, Probenaufbereitung, Analytik, Vorkommen und Bewertung (MiWa).“ Universitätsverlag der TU Berlin, Berlin, ISBN 978-3-7983-3163-1, <http://dx.doi.org/10.14279/depositonce-10406>

TRIEBSKORN R., BRAUNBECK T., GRUMMT T., HANSLIK L., HUPPERTSBERG S., JEKEL M., KNEPPER T. P., KRAIS S., MÜLLER Y. K., PITTRUFF M., RUHL A. S., SCHMIEG H., SCHÜR C., STROBEL C., WAGNER M., ZUMBÜLTE N., KÖHLER H.-R. (2019). “Relevance of nano- and microplastics for freshwater ecosystems: A critical review.” Trends in Analytical Chemistry **110**: 375-392, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.023>

SCHWARZ S., SCHMIEG H., SCHEURER M., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2017). “Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta f. fario*.” Science of the Total Environment, **607-608**: 1026-1036, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.042>

TRIEBSKORN R., SCHWARZ S., SCHMIEG H., KÖHLER H.-R., JUNGMANN D., BERG K., BUCHBERGER A., FREY M., SCHEURER M., SACHER F., OETKEN M., OEHLMANN J. (2017). “EFF-Pharm: Effects of pharmaceuticals (nonsteroidal anti-inflammatory drugs and beta-blockers) in fish and invertebrates and their detection by newly developed in vitro-bioassays. UBA-Texte, **44/2017**

TRIEBSKORN R., BERG K., EBERT I., FREY M., JUNGMANN D., OEHLMANN J., OETKEN M., SACHER F., SCHEURER M., SCHMIEG H., SCHWARZ S., KÖHLER H.-R. (2015) Monitoring Primary Effects of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment with Mode of Action-Specific *in Vitro* Biotests. Environmental Science & Technology, **49**: 2594-2595

## Konferenzbeiträge und Fachvorträge (chronologisch absteigend)

REGNERY J., SCHMIEG H., SCHRADER H., ZINKE O., BACHTIN J., MÖHLENKAMP C., JACOB S., FRIESEN A. (2024): "Exposure of piscivorous avian predators to second-generation anticoagulant rodenticides." Präsentiert von H. Schmiege, Posterbeitrag zur Umwelt 2024 in Gießen

SCHMIEG H., SCHRADER H., FERLING H., REGNERY J., FRIESEN A., SCHWAIGER J. (2024) „Auswirkungen von antikoagulanten Rodentiziden auf Regenbogenforellen“ Vortrag zur Wasser 2024 in Limburg an der Lahn

SCHMIEG H., SCHRADER H., REGNERY J., FERLING H., JACOB S., FRIESEN A., SCHWAIGER J. (2023): "Linking Hepatic Residues of Anticoagulant Rodenticides in Wild Freshwater Fish with *in vivo* Determined Effect Levels" Posterbeitrag zur Umwelt 2023 in Muttenz

REGNERY J. UND SCHMIEG H. UND FRIESEN A. (2023): „Rattengift in Gewässern, Fischen und Fischottern – Vom Target Monitoring zum Non-Target-Effekt.“ Vortrag für das Fachbereichs IV Seminar des UBA in Dessau

SCHMIEG H., SCHRADER H., REGNERY J., FERLING H., JACOB S., FRIESEN A., SCHWAIGER J. (2023): "Linking Hepatic Residues of Anticoagulant Rodenticides in Wild Freshwater Fish with *in vivo* Determined Effect Levels" Posterbeitrag zur 33. SETAC Europe Jahrestagung in Dublin

SCHMIEG H., KRAIS S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2019): „Effekte von Mikroplastik alleine und in Kombination mit Schadstoffen.“ Vortrag auf der Abschlusskonferenz MiWa in Karlsruhe

KRAIS S., SCHMIEG H., MAY E. C., SCHWARZ T., RUHL A. S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2019): "Do polystyrene microplastic particles modulate the toxicity of pesticides? Mortality and biochemical responses of the snail *Marisa cornuarietis* and the non-biting midge *Chironomus riparius*." Posterbeitrag zur Abschlusskonferenz MiWa in Karlsruhe

SCHMIEG H., KRAIS S., RUHL A. S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2019): "Effects of polystyrene microplastics and two organic pollutants in different life stages of brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*)." Posterbeitrag zur 29. SETAC Europe Jahrestagung in Helsinki

KRAIS S., SCHMIEG H., RUHL A. S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2019): "Influence of polystyrene microplastic particles on the toxicity of thiacloprid and methiocarb to the non-biting midge *Chironomus riparius*." Posterbeitrag zur 29. SETAC Europe Jahrestagung in Helsinki

## Publikationsliste und Konferenzbeiträge

SCHMIEG H., KRAIS S., REZBACH F., RUHL A. S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2018): "Effect of polystyrene microplastics in different life stages of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)."  
Posterbeitrag zur 28. SETAC Europe Jahrestagung in Rom

KRAIS S., SCHMIEG H., MAY E. C., RUHL A. S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2018): "Influence of polystyrene microplastics in combination with organic pesticides on the giant ramshorn snail *Marisa cornuarietis*: behavioral and biochemical responses." Posterbeitrag zur 28. SETAC Europe Jahrestagung in Rom

SCHMIEG H., KRAIS S., BURMESTER J., REITTER K., RETZBACH F., RUHL A. S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2018): "Effects of polystyrene microplastics in different life stages of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)."  
Vortrag zur Micro 2018 auf Lanzarote

KRAIS S., SCHMIEG H., MAY E. C., SCHWARZ T., RUHL A. S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2018) "Do polystyrene microplastic particles modulate the toxicity of pesticides? Mortality and biochemical responses of the snail *Marisa cornuarietis* and the non-biting midge *Chironomus riparius*"  
Posterbeitrag zur Micro 2018 auf Lanzarote

SCHMIEG H., KRAIS S., BURMESTER J., REITTER K., RETZBACH F., RUHL A. S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2018): „Auswirkung von Mikroplastik auf verschiedene Lebensstadien der Bachforelle“ Vortrag zur Umwelt 2018 in Münster

REITTER K., SCHMIEG H., KRAIS S., RETZBACH F., RUHL A. S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2018): „Welchen Einfluss hat Mikroplastik auf juvenile Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) und kann es die Wirkung von Pestiziden verändern?“ Posterbeitrag zur Umwelt 2018 in Münster

MAY E. C., KRAIS S., SCHMIEG H., RUHL A. S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2018) "Biochemische Effekte von Mikroplastik und Methiocarb bei der Paradiesschnecke *Marisa cornuarietis*." Posterbeitrag zur Umwelt 2018 in Münster

SCHMIEG H., KRAIS S., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2017): "Effect of microplastic on the development of the giant ramshorn snail (*Marisa cornuarietis*) and the brown trout (*Salmo trutta f. fario*)."  
Posterbeitrag zur 27. SETAC Europe Jahrestagung in Brüssel

KRAIS S. UND SCHMIEG H., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2016): „Wirkungen von Mikroplastik auf Paradiesschnecken (*Marisa cornuarietis*) und Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*).“ Posterbeitrag zur 21. SETAC GLB Jahrestagung in Tübingen

## Publikationsliste und Konferenzbeiträge

SCHWARZ S., SCHMIEG H., SCHEURER M., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2016): „Effekte des Beta-Blockers Metoprolol und des NSAIDs Diclofenac auf die Embryonalentwicklung und den Gesundheitszustand der Bachforelle *Salmo trutta f. fario*.“ Vortrag gehalten von S. Schwarz zur 21. SETAC GLB Jahrestagung in Tübingen

SCHWARZ S., SCHMIEG H., SCHEURER M., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2016): “Effects of the NSAID diclofenac on the survival, health and behaviour of embryonic and juvenile brown trout *Salmo trutta f. fario*.” Vortrag gehalten von S. Schwarz zur 26. SETAC Europe Jahrestagung in Nantes

SCHMIEG H., SCHWARZ S., SCHEURER M., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2016): Effects of the beta-blocker metoprolol and the NSAID diclofenac on the embryonic development and health of brown trout *Salmo trutta f. fario*. Posterbeitrag zur 26. SETAC Europe Jahrestagung in Nantes

SCHMIEG H., SCHWARZ S., SCHEURER M., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2015): “Effects of the beta-blocker metoprolol on the embryonic development and health of brown trout *Salmo trutta f. fario*.” Posterbeitrag zur 20. SETAC-GLB Jahrestagung in Zürich

SCHWARZ S., SCHMIEG H., SCHEURER M., SACHER F., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. (2015): “Effects of the betablocker metoprolol and the NSAID diclofenac on the embryonic development and health of brown trout *Salmo trutta f. fario*.” Posterbeitrag zur 25. SETAC Europe Jahrestagung in Barcelona

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Rita Triebkorn für die Möglichkeit meine Doktorarbeit im Projekt MiWa anzufertigen, für die stete Unterstützung bei Fragen und Problemen und die Betreuung meiner Arbeit bedanken. Auch Prof. Dr. Heinz Köhler gilt mein Dank für Denksätze, Rat und Hilfe während meiner Promotion. Darüber hinaus möchte ich Prof. Dr. Miriam Langer für die Begutachtung meiner Arbeit danken. Ich danke Herrn Prof. Dr. Jekel für die Koordination des MiWa Projekts sowie meinen Projektpartnern insbesondere Dr. Aki S. Ruhl, Prof. Dr. Thomas Braunbeck und Dr. Sven Huppertsberg für die enge und immer freundliche Zusammenarbeit. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Christian Zwiener für die Analyse von Amitriptylin und die hilfreichen Diskussionen. Besonderer Dank gilt meiner Co-Doktorandin Stefanie Kraiss nicht nur für ihre Hilfe, sondern auch für die schöne gemeinsame Zeit.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen der physiologischen Ökologie der Tiere, die mir bei der Durchführung der Experimente und meiner Arbeit im Labor geholfen haben: Janne Burmester, Helene Eckstein, Christine Hepper, Kathrin Kübler, Elisabeth May, Aron Meral, Katharina Reitter, Felizitas Rezbach, Isabelle Schmidgall und Lea Schuster. Besonders hervorheben möchte ich meine Kolleginnen und Kollegen, die ich im Laufe meiner Promotion als Freunde gewinnen konnte: Dr. Simon Schwarz, Dr. Stefanie Jacob, Dr. Michael Ziegler, Dr. Sabrina Wilhelm, Stefanie Kraiss, Dr. Katharina Peschke, Dr. Carla Lorenz, Dr. Paul Thellmann und Dr. Andreas Dieterich.

Ich danke meinen Freundinnen und Freunden für ihre Aufmunterung und Motivation. Marine, Benni, Nina und Max, welche mich während meines Studiums begleitet haben und ohne die ich nicht wäre, wer ich heute bin. Und Oleg der immer Teil von uns sein wird, auch wenn er dies wahrscheinlich albern fände. Mein Dank geht an Steffi, Katha, Franzi und Laurin für ihre Freundschaft seit über 20 Jahren. Ein großer Dank auch an meine Theatergruppe Scenario mit all ihren wunderbaren Menschen, Daniela für ihre Unterstützung und Sebastian für die Geduld, Aufmunterung und Motivation. Ich möchte mich zudem bei meinen Geschwistern Amrei, Sophie und Jonathan bedanken, die mich alle auf ihre Art immer unterstützen und dafür, dass ich dank ihnen weiß, was das Wort „Lambiole“ bedeutet. Vor allem möchte ich meinen Eltern Cornelia und Johannes danken. Für die beständige Hilfe und der Unterstützung während meines gesamten Studiums – sei es bei dem zuverlässigen Finden von Tipp- und Kommafehlern, der kunstvollen Bearbeitung von Bildern oder dem Lösen mathematischer oder physikalischer Fragen. Euch verdanke ich meine Begeisterung für die Naturwissenschaft. Danke. Für Alles.