

TEXTE

233/2020

Umweltqualitätsnormen für Binnengewässer

Überprüfung der Gefährlichkeit neuer bzw.
prioritärer Substanzen

TEXTE 233/2020

Ressortforschungsplan des Bundesministerium für
Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit

und

Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und
Verbraucherschutz

Forschungskennzahl 3715 24 200 0

FB000356

Umweltqualitätsnormen für Binnengewässer

Überprüfung der Gefährlichkeit neuer bzw. prioritärer Substanzen

von

Dr. Hannah Wünnemann, Dr. Klaus Weiß, Daniela Arndt, Dr. Michaela
Baumann, Rebekka Weiß, Hermann Ferling, Karin Scholz-Göppel, Karina
Bucher, Christoph Feick, Georg Hartmann, Peter Kitzing, Martin Szyja, Dr.
Julia Schwaiger

Referat 73: Aquatische Ökotoxikologie, mikrobielle Ökologie, Bayerisches
Landesamt für Umwelt, Augsburg /Wielenbach

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber

Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
buergerservice@uba.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

 [umweltbundesamt.de](https://www.facebook.com/umweltbundesamt.de)

 [umweltbundesamt](https://twitter.com/umweltbundesamt)

Durchführung der Studie:

Teilprojekt A
Bayerisches Landesamt für Umwelt
Bürgermeister-Ulrich-Straße 160
86179 Augsburg

Teilprojekt B
Bayerisches Landesamt für Umwelt
Demollstrasse 31
82407 Wielenbach

Abschlussdatum:

Mai 2020

Redaktion:

Fachgebiet II 2.4 Binnengewässer
Ingo Kirst

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, Dezember 2020

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

Kurzbeschreibung: UFOPLAN-Vorhaben Umweltqualitätsnormen für Binnengewässer - Überprüfung der Gefährlichkeit neuer bzw. prioritärer Substanzen

Zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie (2000/60/EG) sind in der Oberflächengewässer-verordnung (OGewV) für neue flussgebietsspezifische Schadstoffe Umweltqualitätsnormen (UQN, EQS) festzulegen. Für viele Spurenstoffe ist eine realitätsnahe UQN-Ableitung nicht möglich, da valide Testergebnisse fehlen. Zur Risikoabschätzung relevanter Stoffe müssen somit einerseits bereits vorhandene Daten auf Validität überprüft, andererseits Datenlücken mithilfe von Biotests geschlossen werden. Im Teilvorhaben A wurden valide Daten für ausgewählte, umweltrelevante Schadstoffe anhand von Literaturrecherchen und ökotoxikologischen Standardtests (Algen-, Daphnien-, Fischeitest) erarbeitet und Vorschläge für Umweltqualitätsstandards abgeleitet. Für die folgenden Stoffe wurden EQS vorgeschlagen: 4-Aminoantipyrin (Metabolit von Metamizol), Amisulprid, Bisoprolol, Clindamycin, Clindamycinsulfoxid und N-Desmethylclindamycin (Metaboliten), Gabapentin, Metformin und Guanylurea (Transformationsprodukt), Lamotrigin, Oxipurinol (Metabolit von Allopurinol), Torsemid, Valsartansäure, Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin (Metabolit), Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid, 1,4-Dioxan, Desethylterbutryn und Terbutrynsulfoxid (Transformationsprodukte von Terbutryn und Cybutryn). Als potenziell gewässerrelevant können die Stoffe Venlafaxin, Clindamycin, N-Desmethylclindamycin, Metformin (siehe Teilvorhaben B) und Desethylterbutryn eingestuft werden, d. h. eine Schädigung der aquatischen Biozönose ist nicht auszuschließen.

Im Teilvorhaben B wurden Untersuchungen zu chronischen, subletalen Wirkungen des Antidiabetikums Metformin sowie Guanylurea an Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) durchgeführt. In zwei separaten Versuchsansätzen wurden subadulte Regenbogenforellen über 28 Tage Konzentrationen von 0,1-1.000 µg/L der jeweiligen Testsubstanz ausgesetzt. Im Anschluss an die Exposition erfolgten eine Bestimmung von Biomarkern und klinisch-chemischen Parametern sowie hämatologische Untersuchungen zur Erfassung des allgemeinen Gesundheitszustandes der Fische. Ausgewählte Organe der Testtiere wurden einer histopathologischen Untersuchung unterzogen. Zudem erfolgte eine histologische Bestimmung der Reifegrade männlicher Gonaden. In einem dritten Versuch wurden juvenile Regenbogenforellen im Alter von 44 Tagen nach dem Schlupf Konzentrationen von 0,1-1.000 µg/L Metformin ausgesetzt. Schwerpunkt dieser Studie war die Überprüfung eines möglichen Effektes von Metformin auf die Gonadenentwicklung in dieser hierfür besonders sensiblen Lebensphase.

Die Untersuchungsergebnisse weisen auf eine Beeinflussung des Hormonsystems subadulter, männlicher Regenbogenforellen nach Metformin-Exposition hin. Von den Veränderungen wird insbesondere der Nachweis einer zwar geringen, aber signifikante Induktion von Vitellogenin als ein eindeutig auf die Metformin-Exposition zurückzuführender Effekt interpretiert.

Nach Exposition in Guanylurea wurden bei adulten Regenbogenforellen beiderlei Geschlechts signifikante Veränderungen der Sexualhormone nachgewiesen. Die Werte ließen jedoch keine klare Tendenz oder Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen, sodass sie im Rahmen einer Risikobewertung keine Berücksichtigung finden. Weder Metformin, noch Guanylurea führten zu pathologischen Veränderung der Fischorgane oder zu eindeutigen, auf die Testsubstanzen zurückzuführende hämatologische und klinisch-chemische Veränderungen. Eine Metformin-Exposition juveniler Lebensstadien von Regenbogenforellen hatte keinen eindeutigen Einfluss auf die Geschlechtsdifferenzierung und Gonadenentwicklung der Tiere.

Zusammenfassend ergaben die im Rahmen der Studie erhobenen Befunde Hinweise auf eine negative Beeinflussung der Fischgesundheit durch Metformin und Guanylurea. Zur Ableitung eines ökotoxikologischen Schwellenwertes für Metformin werden die Veränderungen der Vitellogenin-Konzentrationen bei männlichen Regenbogenforellen herangezogen. Die NOEC hinsichtlich der

Vitellogenin-Induktion lag mit 50 µg/L im Bereich der maximal in Oberflächengewässern gemessenen Metformin-Konzentrationen. Damit ist Metformin als gewässerrelevanter Spurenstoff einzustufen.

Abstract: Environmental Quality Standards in inland waters – Evaluation of risks of emerging and priority substances

For the implementation of the Water Framework Directive (2000/60/EG), Environmental Quality Standards (EQS) for emerging pollutants have to be assessed for surface waters. Yet, a realistic derivation of EQS is not reliable for various trace substances, as valid test results are missing. For a risk assessment of relevant substances, available data have to be proved with regard to validity. Furthermore, remaining gaps of knowledge have to be filled by means of bioassays.

In subproject A, valid data of selected, environmentally relevant substances were evaluated on both, literature data as well as on ecotoxicological standard tests (algae, daphnia, fish embryo tests). Recommendations of EQS were derived for following substances: 4-aminoantipyrine (metamizole metabolite), amisulpride, bisoprolol, clindamycin, clindamycin sulfoxide and N-desmethyl clindamycin (metabolites), gabapentin, metformin and guanylsurea (transformation product), lamotrigine, oxipurinol (metabolite of allopurinol), toremide, valsartanic acid, venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine (metabolite), (methoxymethyl)triphenylphosphonium chloride, 1,4-dioxane, terbutryn-desethyl and terbutryn sulfoxide (degradation product of terbutryn and cybutryn). Results of venlafaxine, clindamycin, N-desmethylclindamycin, metformin (see subproject B) and terbutryn-desethyl demonstrated clearly, that these substances are potential harmful for water bodies and aquatic organisms.

In subproject B investigations were carried out on chronic, sublethal effects in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylsurea. During two independent experiments, subadult rainbow trout were exposed for 28 days to the respective test substance in a concentration range of 0.1 to 1.000 µg/L, respectively. After the exposure, biomarkers and clinical-chemical parameters were determined and haematological examinations were performed to record the general health status of fish. Selected organs from the test animals were subjected to histopathological examination. In addition, the maturity levels of male gonads were determined histologically. In a third experiment, juvenile rainbow trout were exposed to concentrations of 0.1 to 1.000 µg/L metformin at the age of 44 days after hatching. The focus of this study was the examination of a possible effect of metformin on the gonadal development in this particularly sensitive phase of life.

The results of the investigation indicate an influence on the hormonal system of subadult, male rainbow trout after exposure to metformin. Among the changes identified, the detection of a slight but significant induction of vitellogenin, can be interpreted as an effect that can clearly be attributed to the metformin exposure.

After exposure to guanylsurea, significant changes in sex hormones were detected in adult rainbow trout of both sexes. However, the values showed no clear trend or dose-response relationship, so that they are not taken into account in a risk assessment. Neither metformin nor guanylsurea led to pathological changes in the fish organs or to clear hematological and clinical-chemical changes related to the test substances. Metformin exposure of juvenile life stages of rainbow trout had no clear influence on the sex differentiation and gonadal development of the animals.

In summary, the findings in the present study did not provide any evidence of a negative impact on fish health by metformin and guanylsurea. The changes in the vitellogenin concentrations in male rainbow trout are used to derive an ecotoxicological threshold value for metformin. With regard to vitellogenin induction a NOEC of 50 µg/L has to be established, which is in the range of the maximum concentrations of metformin measured in surface waters. Metformin is therefore classified as a water-relevant trace substance.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis.....	13
Abkürzungsverzeichnis.....	17
Zusammenfassung	20
Summary	26
1 Einleitung	31
2 Teilprojekt A.....	33
2.1 Veranlassung.....	33
2.2 Methoden	33
2.3 Ergebnisse.....	34
2.3.1 Datenblatt Amisulprid (Kurzfassung)	35
2.3.2 Datenblatt Torsemid (Kurzfassung)	36
2.3.3 Datenblatt Valsartansäure (Kurzfassung)	37
2.3.4 Datenblatt Gabapentin (Kurzfassung).....	38
2.3.5 Datenblatt Lamotrigin (Kurzfassung)	39
2.3.6 Datenblatt Venlafaxin und O-Desmethylylvenlafaxin (Kurzfassung)	40
2.3.7 Datenblatt Clindamycin, N-Desmethylclindamycin und Clindamycinsulfoxid (Kurzfassung)	42
2.3.8 Datenblatt Guanylurea und Metformin (Kurzfassung)	44
2.3.9 Datenblatt Bisoprolol (Kurzfassung)	45
2.3.10 Datenblatt 4-Aminoantipyrin (Kurzfassung)	47
2.3.11 Datenblatt Oxipurinol (Kurzfassung).....	48
2.3.12 Datenblatt Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid (Kurzfassung)	49
2.3.13 Datenblatt Desethylterbutryn und Terbutryn-Sulfoxid (Kurzfassung)	50
2.3.14 Datenblatt 1,4-Dioxan (Kurzfassung)	52
3 Teilprojekt B: chronische Fischtoxizität von Metformin und Guanylurea	53
3.1 Hintergrund	53
3.2 Material und Methoden	56
3.2.1 Herkunft und Haltung der Versuchsfische	56
3.2.2 Voruntersuchungen bei den Versuchsfischen	56
3.2.3 Expositionsbedingungen.....	58
3.2.3.1 Expositionsanlage	58
3.2.3.2 Testsubstanzen	61

3.2.3.3	Besatz der Expositionsaquarien mit den Versuchsfischen.....	62
3.2.3.4	Expositionsdauer	63
3.2.3.5	Fütterung während der Expositionsphase	63
3.2.4	Versuchsbeobachtungen	63
3.2.5	Versuchsauflösung.....	63
3.2.6	Berechnung biologischer Indices	66
3.2.7	Klinische Chemie.....	66
3.2.8	Hämatologie	66
3.2.9	Serologische Untersuchungen (Biomarker)	68
3.2.10	Qualitative und semiquantitative Histopathologie	68
3.2.11	Stereologische Untersuchungen (Quantitative histologische Untersuchung)	70
3.2.11.1	Stereologische Untersuchung der Hoden	70
3.2.11.2	Stereologische Untersuchung der Niere	74
3.2.12	Statistische Auswertung	79
3.3	Ergebnisse.....	80
3.3.1	Teilversuch Nr. 1: Exposition von subadulten Regenbogenforellen in Guanylurea	80
3.3.1.1	Chemisch-physikalische Wasserparameter	80
3.3.1.2	Chemische Analyse der Testsubstanz Guanylurea.....	80
3.3.1.3	Versuchsbeobachtungen	81
3.3.1.4	Biometrische Daten	81
3.3.1.5	Biologische Indices.....	84
3.3.1.6	Klinische Chemie.....	85
3.3.1.7	Hämatologie	86
3.3.1.8	Serologische Untersuchungen (Biomarker)	86
3.3.1.9	Qualitative und semiquantitative Histopathologie.....	90
3.3.1.10	Quantitative Histopathologie die Niere (Stereologie)	91
3.3.2	Teilversuch Nr. 2: Exposition von subadulten Regenbogenforellen in Metformin	95
3.3.2.1	Chemisch-physikalische Wasserparameter	95
3.3.2.2	Chemische Analyse der Testsubstanz Metformin.....	95
3.3.2.3	Versuchsbeobachtungen	96
3.3.2.4	Biometrische Daten	96
3.3.2.5	Biologische Indices.....	98
3.3.2.6	Klinische Chemie.....	100
3.3.2.7	Hämatologie	100

3.3.2.8	Serologische Untersuchungen (Biomarker)	100
3.3.2.9	Qualitative und semiquantitative Histopathologie	105
3.3.2.10	Quantitative Histologie des Hodens (Stereologie)	105
3.3.3	Teilversuch Nr. 3: Exposition von juvenilen Regenbogenforellen in Metformin	108
3.3.3.1	Chemisch-physikalische Wasserparameter	108
3.3.3.2	Chemische Analyse der Testsubstanz Metformin	108
3.3.3.3	Versuchsbeobachtungen	109
3.3.3.4	Mortalität	109
3.3.3.5	Scoring äußerlicher Veränderungen	110
3.3.3.6	Biometrische Daten	110
3.3.3.7	Biologische Indices	111
3.3.3.8	Qualitative und semiquantitative Histologie	112
3.3.3.9	Genetische Geschlechtsbestimmung	115
3.4	Diskussion	116
3.4.1	Versuchsbedingungen	116
3.4.2	Toxische Wirkungen von Metformin	116
3.4.3	Endokrine Wirkung von Metformin	119
3.4.4	Toxische Wirkungen von Guanylurea	126
3.4.5	Endokrine Wirkung von Guanylurea	128
4	Literaturverzeichnis	130
A	Anhang 1 Teilprojekt A: Übersicht Datenblätter	141
B	Anhang 2 Teilprojekt B	144
B.1	Aufzuchtbedingungen (Teilversuche Nr. 1-3)	144
B.2	Methodik für die genetische Geschlechtsbestimmung	145
B.3	Übersicht verwendeter Testkits für die Blutuntersuchungen (Teilversuche Nr. 1 und 2) ..	146
B.4	Übersicht Endpunkte und Probenmaterial (Teilversuche Nr. 1-3)	147
B.5	Tabellarische Ergebnisse Teilversuch Nr. 1 (Guanylurea)	149
B.6	Tabellarische Ergebnisse Teilversuch Nr. 2 (Metformin)	172
B.7	Tabellarische Ergebnisse Teilversuch Nr. 3 (Metformin)	192

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung einer Gelelektrophorese für die genetische Geschlechtsbestimmung	58
Abbildung 2:	Ökotoxikologischen Expositionsanlage der Dienststelle Wielenbach.....	59
Abbildung 3:	Wasserführung in der ökotoxikologischen Expositionsanlage.	60
Abbildung 4:	Technische Ausstattung der Expositionsaquarien	60
Abbildung 5:	Expositionsaquarien mit Edelstahl-Einsätzen für den Teilversuch Nr. 3 (Metformin)	61
Abbildung 6:	Chemische Struktur der Testsubstanzen	61
Abbildung 7:	Situs einer Regenbogenforelle	64
Abbildung 8:	Hodenreife bei subadulten, männlichen Regenbogenforellen	65
Abbildung 9:	Gonadenpräparation bei juvenile Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	70
Abbildung 10:	Probenahme von fixierten Hoden für die stereologische Auswertung	71
Abbildung 11:	Schätzung des Volumenanteils (V_v) von Hodenzellen	72
Abbildung 12:	Probenahme für die stereologische Untersuchung der Niere .	75
Abbildung 13:	Schätzung der Volumendichte (V_v) der verschiedenen Nierenzelltypen	77
Abbildung 14:	Schätzung des Nierenvolumens für die stereologische Auswertung	78
Abbildung 15:	Geschlechtsreife männlicher subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	82
Abbildung 16:	Gonadengewichte subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	83
Abbildung 17:	Korpulenzfaktoren subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	84
Abbildung 18:	Gonadosomatische Indices subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	85
Abbildung 19:	Vitellogenin-Konzentration bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea).....	87
Abbildung 20:	Biomarker bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	87
Abbildung 21:	Hormonquotienten von Estradiol/Testosteron bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea).....	88
Abbildung 22:	Biomarker bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	89
Abbildung 23:	Hormonquotienten von Estradiol/Testosteron bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea).....	89
Abbildung 24:	Reifegrade der Hoden (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	90
Abbildung 25:	Absolutvolumina (V) der Nierenkompartimente subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea).....	92

Abbildung 26:	Absolutvolumina (V) der exkretorischen Niere subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylyurea).....	93
Abbildung 27:	Absolutvolumina (V) neuer Nephronen subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylyurea).....	94
Abbildung 28:	Geschlechtsreife männlicher subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	97
Abbildung 29:	Gonadengewichte subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2).....	98
Abbildung 30:	Gonadosomatische Indices subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	99
Abbildung 31:	Vitellogenin-Konzentration bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin).....	101
Abbildung 32:	17 β -Estradiol bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	101
Abbildung 33:	Aromatase bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	102
Abbildung 34:	Testosteron und 11-Ketotestosteron bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin).....	102
Abbildung 35:	Hormonquotienten bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	103
Abbildung 36:	Biomarker bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	104
Abbildung 37:	Hormonquotienten bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	104
Abbildung 38:	Schätzvolumina (V_v) verschiedener Hodenzelltypen bei pubertären, subadulten Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	106
Abbildung 39:	Absolutvolumina (V) verschiedener Hodenzelltypen bei pubertären, subadulten Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	107
Abbildung 40:	Körpergewichte juveniler Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	110
Abbildung 41:	Gesamtlängen juveniler Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	111
Abbildung 42:	Korpulenzfaktoren juveniler Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	112
Abbildung 43:	Histologisches Geschlecht juveniler Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	113
Abbildung 44:	Histologische Untersuchung der Gonaden (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	114
Abbildung 45:	Reifestadien juveniler, weiblicher Regenbogenforellen in der histologischen Untersuchung (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	114

Abbildung 46:	Unterschiede bezüglich der Geschlechteridentifikation in Abhängigkeit von der Nachweismethode (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	115
---------------	--	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Qualitätsstandards für Amisulprid.....	35
Tabelle 2:	Qualitätsstandards für Torsemid	36
Tabelle 3:	Qualitätsstandards für Valsartansäure	37
Tabelle 4:	Qualitätsstandards für Gabapentin	38
Tabelle 5:	Qualitätsstandards für Lamotrigin.....	39
Tabelle 6:	Qualitätsstandards für Venlafaxin und O- Desmethylvenlafaxin	40
Tabelle 7:	Qualitätsstandards für Clindamycin, Clindamycinsulfoxid und N-Desmethylclindamycin.....	42
Tabelle 8:	Qualitätsstandards für Guanylurea und Metformin	44
Tabelle 9:	Qualitätsstandards für Bisoprolol.....	45
Tabelle 10:	Qualitätsstandards für 4-Aminoantipyrin.....	47
Tabelle 11:	Qualitätsstandards für Oxipurinol	48
Tabelle 12:	Qualitätsstandards für Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid	49
Tabelle 13:	Qualitätsstandards für Desethylterbutryn und Terbutrynsulfoxid	50
Tabelle 14:	Qualitätsstandards für 1,4-Dioxan.....	52
Tabelle 15:	Scoring äußerliche Veränderungen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	64
Tabelle 16:	Berechnung biologischer Indices	66
Tabelle 17:	Formeln zur Berechnung der Erythrozytenindices	67
Tabelle 18:	Zählprotokoll für Blutzellen	68
Tabelle 19:	HSV-Schwellenwerte zur Volumenbestimmung von Melanomakrophagen	77
Tabelle 20:	Chemisch-physikalische Wasserparameter (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea).....	80
Tabelle 21:	Reale Testkonzentrationen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea) ...	81
Tabelle 22:	Chemisch-physikalische Wasserparameter (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	95
Tabelle 23:	Reale Testkonzentrationen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	96
Tabelle 24:	Chemisch-physikalische Wasserparameter (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	108
Tabelle 25:	Reale Testkonzentrationen (Teilversuch Nr. 3, Metformin) ..	109
Tabelle 26:	Mortalität (Teilversuch Nr. 3, Metformin).....	109
Tabelle 27:	Übersicht Datenblätter.....	141
Tabelle 28:	Chemisch-physikalische Wasserparameter, Wielenbacher Quellwasser (vor Kaskade)	144
Tabelle 29:	Chemisch-physikalische Wasserparameter, Bruthaus.....	144
Tabelle 30:	PCR-Protokoll genetische Geschlechtsbestimmung	145
Tabelle 31:	Primer für die genetische Geschlechtsbestimmung	145
Tabelle 32:	Übersicht verwendeter Testkits für die klinische Chemie	146

Tabelle 33:	Übersicht verwendeter Testkits für die serologische Untersuchung	146
Tabelle 34:	Übersicht Endpunkte und Probenmaterial (Teilversuche Nr. 1-3)	147
Tabelle 35:	Wasserparameter in den Versuchsaquarien (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	149
Tabelle 36:	Atemfrequenzen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	150
Tabelle 37:	Körpergewichte und Gewichtszunahmen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	150
Tabelle 38:	Standardlängen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	151
Tabelle 39:	Hodengewichte der pubertären, männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	151
Tabelle 40:	Hodengewichte der Gesamtanzahl männlicher Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	152
Tabelle 41:	Ovariengewichte (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	152
Tabelle 42:	Lebergewichte (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	153
Tabelle 43:	Biologische Indices (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	153
Tabelle 44:	Klinische Chemie (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	154
Tabelle 45:	Hämatologie (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	156
Tabelle 46:	Vitellogenin bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch 1, Guanylurea)	159
Tabelle 47:	Biomarker bei männlichen, pubertären Regenbogenforellen (Teilversuch 1, Guanylurea)	159
Tabelle 48:	Biomarker bei der Gesamtanzahl männlicher Regenbogenforellen (Teilversuch 1, Guanylurea)	160
Tabelle 49:	Biomarker bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch 1, Guanylurea)	160
Tabelle 50:	Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch 1, Guanylurea)	161
Tabelle 51:	Semiquantitative Auswertung der Leber (Karmin nach Best) (Teilversuch 1, Guanylurea)	166
Tabelle 52:	Semiquantitative Auswertung der Reifegrade der Hoden (Teilversuch 1, Guanylurea)	166
Tabelle 53:	Validität der Berechnung der Schätzvolumina (V_V) der Nierenzellkompartimente, Protokoll A (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)	167
Tabelle 54:	Übersicht Schätzvolumina (V_V) der verschiedenen Nierenkompartimente, Protokoll A (Teilversuch 1, Guanylurea)	167
Tabelle 55:	Schätzvolumina (V_V) der exkretorischen Niere, Protokoll A (Teilversuch 1, Guanylurea)	168
Tabelle 56:	Absolutes und Relatives Nierenvolumen (Teilversuch 1, Guanylurea)	169

Tabelle 57:	Übersicht Absolutvolumina (V) der verschiedenen Nierenkompartimente, Protokoll A (Teilversuch 1, Guanylurea).....	169
Tabelle 58:	Absolutvolumina (V) der exkretorischen Niere, Protokoll A (Teilversuch 1, Guanylurea).....	170
Tabelle 59:	Neue Nephronen bei subadulten Regenbogenforellen, Protokoll B (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea).....	171
Tabelle 60:	Wasserparameter in den Versuchsaquarien (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	172
Tabelle 61:	Atemfrequenzen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	173
Tabelle 62:	Körpergewichte und Gewichtszunahmen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	173
Tabelle 63:	Gesamtlängen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	174
Tabelle 64:	Hodengewichte pubertärer Männchen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	174
Tabelle 65:	Hodengewichte der Gesamtanzahl der Männchen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	175
Tabelle 66:	Ovariengewichte (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	175
Tabelle 67:	Lebergewichte (Teilversuch Nr. 2, Metformin).....	176
Tabelle 68:	Biologische Indices (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	176
Tabelle 69:	Klinische Chemie (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	177
Tabelle 70:	Hämatologie (Teilversuch Nr. 2, Metformin).....	179
Tabelle 71:	Vitellogenin bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	182
Tabelle 72:	Biomarker bei männlichen, pubertären Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	182
Tabelle 73:	Biomarker bei der Gesamtanzahl männlicher Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin).....	183
Tabelle 74:	Biomarker bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	183
Tabelle 75:	Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	184
Tabelle 76:	Semiquantitative Auswertung der Leber (Karmin nach Best) (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	189
Tabelle 77:	Reifegrade der Gonaden (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	189
Tabelle 78:	Validität der Berechnung der Schätzvolumina (V _v) der Hodenzelltypen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	190
Tabelle 79:	Schätzvolumina (V _v) verschiedener Hodenzelltypen bei subadulten, pubertären Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	190
Tabelle 80:	Absolutvolumina (V) verschiedener Hodenzelltypen bei subadulten, pubertären Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)	191

Tabelle 81:	Wasserparameter in den Versuchsaquarien (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	192
Tabelle 82:	Verabreichte Gesamtfuttermengen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	193
Tabelle 83:	Körpergewichte und Gesamtlängen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	193
Tabelle 84:	Korpulenzfaktoren (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	194
Tabelle 85:	Gesamtanzahl Tiere auswertbar für Histologie (Teilversuch Nr. 3, Metformin)	194

Abkürzungsverzeichnis

11-KT	11-Ketotestosteron
AA	Annual Average (engl. für Jahresdurchschnitt)
ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMPK	Adenosinmonophosphat-Kinase
AST	Aspartat-Aminotransferase
Bp	Basenpaare
BUN	Blut-Harnstoff-Stickstoff
CE	Coefficient of Error (engl. für Fehlerkoeffizient)
cm	Zentimeter
d	Konfidenzintervall
dL	Deziliter
dpf	Days post fertilization (Tage nach der Befruchtung)
E2	17 β -Estradiol
EC_x	Effect Concentration X %
E_rC_x	EC-Wert bezogen auf die Hemmung der Wachstumsrate
E_yC_x	EC-Wert bezogen auf die Hemmung der Biomasseentwicklung (Yield)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (engl. für enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ELS	Early Life Stage (engl. für frühes Entwicklungsstadium)
EQS	Environmental Quality Standard (engl. für Umweltqualitätsnorm)
g	Gramm
γ-GT	γ -Glutamyl-Transferase
GG	Gonadengewicht
GSI	Gonadosomatischer Index
h	Stunde
HDL	High-Density-Lipoprotein (engl. für Lipoprotein hoher Dichte)
HSI	Hepatosomatischer Index
JD	Jahresdurchschnitt
K	Korpulenzfaktor
KA	Kläranlage
Kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
L	Länge
LC-MS	Liquid-Chromatographie-mass spectrometry (engl. für Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)
LC_x	Lethal Concentration X% (engl. für letale Konzentration)
LDH	Laktat-Dehydrogenase

LDL	Low-Density-Lipoprotein (engl. für Lipoprotein niedriger Dichte)
LG	Lebergewicht
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration (engl. für niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung)
M	Anzahl ausgewerteter Gesichtsfelder
MAC	Maximum Acceptable Concentration (engl. für maximal zulässige Konzentration)
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin (engl. für mittleres korpuskuläres Hämoglobin)
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (engl. für mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration)
MCV	Mean Corpuscular Volume (engl. für mittleres korpuskuläres Volumen)
n. d.	Nicht durchgeführt
n. E.	Nach Exposition
nm	Nanometer
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
min	Minute
mm	Millimeter
mOsm	Milliosmol
NG	Nachweisgrenze
NOEC	No Observed Effect Concentration (engl. für höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete Wirkung)
OGewV	Oberflächengewässerverordnung
OGW	Oberflächengewässer
P_c	Point Count (Gesamtpunktzahl)
pg	Pikogramm
PNEC	Predicted No Observed Effect Concentration (engl. für vorausgesagte Konzentration ohne beobachtete Wirkung)
QS	Quality Standard (engl. für Qualitätsstandard)
s	Sekunde
SD	Standard derivation (engl. für Standardabweichung)
SF	Sicherheitsfaktor
t	Irrtumswahrscheinlichkeit
T	Intervallabstand, Lamellendicke
Ts	Testosteron
TGD-EQS	Technical guidance document for deriving environmental quality standards (engl. für „technischer Leitfaden zur Ableitung von Umweltqualitätsnormen“)
U	Units (engl. für Einheiten)
UBA	Umweltbundesamt, Dessau

UQN	Umweltqualitätsnorm
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
v. E.	Vor Exposition
W_A	Organgewicht bei Luft
VTG	Vitellogenin
W_L	Organgewicht im Wasser
V_v	Schätzvolumen
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie
ZHK	Zulässige Höchstkonzentration

Zusammenfassung

Zahlreiche Monitoring-Untersuchungen belegen das Vorkommen von anthropogen bedingten Stoffen in Gewässern, die meist über den Abwasserpfad eingetragen werden. Zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie (2000/60/EG) in der Oberflächengewässerverordnung sind für neue flussgebietsspezifische Stoffe Umweltqualitätsnormen (QS) festzulegen. Viele dieser Stoffe sind bislang jedoch noch nicht oder nur unzureichend auf ihr ökotoxikologisches Potenzial untersucht worden.

Ziel des Projektes ist es, die verfügbare Datenlage zu ökotoxikologischen Wirkungen flussgebietsrelevanter Stoffe zu erweitern, vorhandene Datenlücken zu schließen, eine Risikoabschätzung vorhandener Belastungen zu ermöglichen und bereits vorgeschlagene Umweltqualitätsziele in Hinblick auf deren Schutzwirkung für aquatische Ökosysteme zu überprüfen bzw. zu verbessern.

Neben Ergebnissen aus ökotoxikologischen Standardtests auf allen trophischen Ebenen fließen auch Daten aus Tests zur Erfassung subletaler Effekte wie z. B. endokrine Wirkungen oder histopathologische Veränderungen in die ökotoxikologische Bewertung mit ein. Die in Standardtests berücksichtigten Parameter Letalität und Reproduktion erweisen sich je nach Stoffgruppe jedoch z. T. als nicht ausreichend empfindlich zur Ermittlung der von diesen Stoffen ausgehenden, spezifischen Effekten. Dies gilt in besonderem Maße für manche Arzneimittelwirkstoffe und endokrin wirksame Substanzen. Im Rahmen des Projekts wurden daher die durchgeführten ökotoxikologischen Standardtests für die Substanzen Metformin und Guanylharnstoff um chronische, nicht-Standard-Biotests ergänzt. Die hierbei erhobenen Ergebnisse bestehend aus Daten zu subletalen Wirkungen wie endokrinen Wirkungen oder histopathologischen Veränderungen, werden in die ökotoxikologische Bewertung einbezogen.

Ermittlung akuter und chronischer Wirkungen ausgewählter Stoffe anhand ökotoxikologischer Standardtests (Teilprojekt A)

Ziel des Teilprojektes A war es, für ausgewählte Stoffe valide Daten zu erarbeiten bzw. noch vorhandene Datenlücken zu schließen und somit eine möglichst umfassende ökotoxikologische Bewertung zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden gemäß TGD-EQS ökotoxikologische Standardtests mit Organismen aus verschiedenen Trophie-Ebenen durchgeführt:

- ▶ Algentest nach DIN EN ISO 8692 bzw. OECD 201
- ▶ Daphnientest akut nach DIN EN ISO 6341 bzw. OECD 202
- ▶ Daphnientest chronisch nach ISO 10706 bzw. OECD 211
- ▶ Lemnatest nach DIN EN ISO 20079
- ▶ Fischeitest nach DIN EN ISO 15088

Die Auswahl der Stoffe erfolgte in Abstimmung mit dem Umweltbundesamt. Einbezogen wurden v. a. Stoffe und deren Abbauprodukte, die in der aquatischen Umwelt in relevanten Konzentrationen gefunden werden (Arzneimittelwirkstoffe, Herbizide, Industriechemikalien). Bei der Stoffauswahl wurden weiterhin die Parameter „große Verbrauchsmengen in Deutschland“, „hohe Persistenz“ sowie „schlechte Abbaubarkeit in der Kläranlage“ berücksichtigt.

Im Folgenden ist eine Zusammenfassung der im Rahmen des Projektes erstellten Stoffdatenblätter mit den Vorschlägen für einen Umweltqualitätsstandard (UQS) aufgeführt.

Amisulprid (CAS-Nr. 71675-85-9) ist ein Psychopharmakon, welches die Dopaminrezeptoren blockiert und so zu einer Erhöhung des Dopaminspiegels führt. Für dieses Arzneimittel werden stark steigende Verbrauchszahlen bescheinigt. Aus diesem Grund ist eine ökotoxikologische Beurteilung angezeigt. Die höchsten gemessenen Gewässerkonzentrationen lagen bei 0,56 µg/L. Aus den ökotoxikologischen Daten wurde ein AA-QS von 140 µg/L abgeleitet, der um das 250-fache über den gefundenen Gewässerkonzentrationen liegt. Deshalb ist keine Gefährdung durch Amisulprid für die Gewässerbiozönose zu erwarten.

Metamizol wird als fiebersenkendes Schmerzmittel verschrieben. Die Substanz ist eine Prodrug, deren aktiver Wirkstoff 4-N-Methylaminoantipyrin als Metabolit bereits im Magen entsteht. Dieser aktive Wirkstoff wird weiter zu dem ebenfalls pharmakologisch wirksamen Stoff **4-Aminoantipyrin** (AA; CAS-Nr. 83-07-8) und zu dem inaktiven 4-Formylaminoantipyrin metabolisiert. Aus AA entsteht ein weiterer nicht aktiver Metabolit, das 4-Acetylaminoantipyrin.

AA wurde in Flüssen in Konzentrationen bis zu 350 ng/L nachgewiesen. Der vorläufig abgeleitete AA-QS von 1,6 µg/L liegt im Bereich dieser Umweltkonzentration. Das toxische Potenzial von AA liegt mehr als das 1000-fache über dem der anderen Metaboliten 4-Acetylaminoantipyrin und 4-Formylaminoantipyrin, die als pharmakologisch unwirksam eingestuft werden.

Bisoprolol ist ein blutdrucksenkendes Mittel zur Behandlung von Bluthochdruck, Angina pectoris und Herzrhythmusstörungen. Es wurde in Flüssen bis zu einer Konzentration von 2,9 µg/L gefunden. Die hohen Werte traten in Gewässern auf, deren Abwasseranteil 50 % überschritt. Selbst in diesen Einzelfällen gilt eine unmittelbare Gefährdung der Gewässerbiozönose durch Bisoprolol (AA-QS 92 µg/L) als unwahrscheinlich.

Das Lincosamid-Antibiotikum **Clindamycin** (CAS-Nr. 18323-44-9) ist ein halbsynthetisches Derivat von Lincomycin, ein natürliches Antibiotikum, welches durch das Actinobakterium *Streptomyces lincolnensis* produziert wird. Es wird in der Human- und auch in der Veterinärmedizin eingesetzt. Die Wirkung ist bakteriostatisch bis bakterizid, indem es an den 23s Bereich der 50s Ribosomuntereinheiten bindet und somit die Proteinsynthese hemmt. Die beiden Hauptmetaboliten **Clindamycinsulfoxid** (CAS-Nr. 22431-46-5) und **N-Desmethylclindamycin** (CAS-Nr. 22431-45-4) sind pharmakologisch aktiv.

Die höchsten gemessenen Clindamycin-Konzentrationen in deutschen Fließgewässern überschreiten die AA-QS von 0,044 µg/L. Die Toxizität des Metaboliten N-Desmethylclindamycin ist mit der Toxizität der Muttersubstanz vergleichbar, d.h. hier sind additive Wirkungen im Gewässer zu erwarten. Bislang liegen keine Monitoringdaten zu Clindamycinsulfoxid und N-Desmethylclindamycin vor, eine abschließende Risikobewertung ist somit noch nicht möglich. Clindamycin ist als gewässerrelevant einzustufen und zusammen mit den beiden Hauptmetaboliten in Monitoringprogrammen zu beobachten.

1,4-Dioxan (CAS-Nr. 123-91-1) ist ein zyklischer Ether, welcher als Industriechemikalie weitreichende Verwendung findet. Da der Stoff relativ inert ist und sich gut in Wasser löst, wird er in vielen Produktionsschritten als Lösungsmittel eingesetzt. Für Wasserorganismen besteht durch 1,4-Dioxan nach derzeitigem Kenntnisstand bei einem AA-QS von 57,5 mg/L kein Risiko. Die in Oberflächengewässern gefundenen Konzentrationen reichen bis in den einstelligen µg/L-Bereich und liegen damit über Faktor 1000 unter dem AA-QS.

Gabapentin (CAS-Nr. 60142-96-3) ist ein Arzneistoff, welches gegen Epilepsie und neuropathische Schmerzen wirkt, indem es die Freisetzung von Mono-Amin-Neurotransmittern reduziert. Die höchsten gemessenen Gewässerkonzentrationen lagen bei 4,6 µg/L. Selbst mit der höchsten eingesetzten Testkonzentration von 100 mg/L (Limittest) wurde keine toxische Wirkung erzielt.

Das Antidiabetikum **Metformin** (CAS-Nr. 657-24-9) ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Biguanide, der in der Regel zur Behandlung von Typ-2 Diabetes mellitus (nicht insulinabhängige Zuckerkrankheit) insbesondere bei Übergewicht eingesetzt wird. Es ist eines der am längsten und das am häufigsten verabreichte orale Antidiabetikum. **Guanylsurea** (CAS-Nr. 141-83-3) ist ein stabiles Transformationsprodukt von Metformin. Die höchsten gemessenen Konzentrationen an Metformin in deutschen Fließgewässern liegen im Bereich der aus den chronischen Fischtests abgeleiteten AA-QS von 5 µg/L. Eine potenzielle Gefährdung der aquatischen Biozönose ist somit insbesondere durch Metformin nicht auszuschließen.

Lamotrigin (CAS-Nr. 84057-84-1) ist ein antikonvulsiver Wirkstoff aus der Gruppe der Antiepileptika, der zur Behandlung der Epilepsie und zur Vorbeugung depressiver Episoden bei Patienten mit einer bipolaren Störung eingesetzt wird. In Oberflächengewässern waren Konzentrationen bis 1,0 µg/L bestimmt worden. Die Gewässerbelastung bewegt sich im Konzentrationsbereich des abgeleiteten AA-QS von 8 µg/L. Eine Beeinträchtigung der Gewässerbiozönose ist somit nicht auszuschließen. Aufgrund der stark steigenden Verordnungsmengen von Lamotrigin in den letzten Jahren sollte die Belastung der Oberflächengewässer weiterhin im Monitoring überwacht werden.

Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid (CAS-Nr. 4009-98-7) ist ein Reaktionspartner, welcher bei der Wittig-Reaktion umgesetzt wird. Dabei handelt es sich um eine organisch-chemische Reaktion, die der Knüpfung von C=C-Bindungen dient. Aus den vorliegenden Toxizitätsdaten wurde ein AA-QS von 2 µg/L für Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid abgeleitet. Im Rhein wurden Maximalkonzentrationen von 0,9 µg/L nachgewiesen. Die Konzentration des Stoffes im Gewässer ist starken Schwankungen unterworfen. Eine Überschreitung der vorgeschlagenen Qualitätsnorm ist somit nicht auszuschließen und insbesondere an den Einleitungsstellen zu erwarten.

Oxipurinol (CAS-Nr. 2465-59-0) ist der aktive Hauptmetabolit des Arzneistoffes Allopurinol, der z. B. bei Gicht verschrieben wird. Die Muttersubstanz und der Metabolit hemmen die Harnsäurebildung. Oxipurinol wird in Oberflächengewässern in Konzentrationen bis 22 µg/L gefunden. Bei einem AA-QS von 14 µg/L kann eine Beeinträchtigung der Gewässerbiozönose in Einzelfällen nicht ausgeschlossen werden.

Desethylterbutryn (M1; CAS-Nr. 30125-65-6) ist ein Transformationsprodukt der Biozide Cybutryn (Irgarol®) und Terbutryn. **Terbutryn-Sulfoxid** (CAS-Nr. 82985-33-9) ist ein weiteres Transformationsprodukt von Terbutryn. Diese Stoffe wirken als Aufwuchshemmer und werden oder wurden als algizide Wirkstoffe u.a. in Fassadenfarben und Bootsanstrichen eingesetzt. Sie hemmen die Photosynthese und sind deshalb sehr toxisch für alle höheren Pflanzen und Algen.

Die Abschätzung der chronischen Toxizität zeigt, dass die Transformationsprodukte weniger toxisch sind als die Muttersubstanzen Terbutryn (AA-QS 0,065 µg/L) und Cybutryn (AA-QS 0,0017 µg/L). Die höchsten gemessenen Konzentrationen von Desethylterbutryn in Oberflächengewässern überschreiten jedoch die abgeleitete AA-QS von 0,22 µg/L. Nach der vorliegenden Datenlage sind Desethylterbutryn sowie Terbutryn und Cybutryn als gewässerrelevant einzustufen.

Torsemid (CAS-Nr. 56211-40-6) ist eines der meist verwendeten Diuretika. Die in Oberflächengewässern gefundenen Konzentrationen an Torsemid lagen durchweg um den Faktor 5000 niedriger als die vorgeschlagene AA-QS von 1670 µg/L. Nach dem derzeitigen Stand des Wissens sind die aquatischen Lebensgemeinschaften durch Torsemid nicht gefährdet.

Valsartansäure (CAS-Nr. 164265-78-5) entsteht in Kläranlagen als Transformationsprodukt von Valsartan sowie weiterer Arzneimittelwirkstoffe aus der Gruppe der Sartane. Arzneimittel aus dieser Gruppe werden als Blutdrucksenker eingesetzt. In Oberflächengewässern lagen die Konzentrationen an Valsartansäure durchweg um den Faktor 500 niedriger als die vorgeschlagene AA-QS von 640 µg/L. Nach dem derzeitigen Stand des Wissens sind die aquatischen Lebensgemeinschaften durch Valsartansäure nicht gefährdet.

Venlafaxin (CAS-Nr. 93413-69-5) ist ein Psychopharmakon, welches die Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin selektiv hemmt. Sein pharmakologisch aktiver Hauptmetabolit **O-Desmethylvenlafaxin** (CAS-Nr. 93413-62-8) wird direkt als Medikament eingesetzt oder entsteht nach Einnahme von Venlafaxin als Stoffwechselprodukt im Körper sowie als Abbauprodukt in der Kläranlage.

Die in Oberflächengewässern gefundenen maximalen Konzentrationen an Venlafaxin und O-Desmethylvenlafaxin liegen bei jeweils ca. 0,3 µg/L. In der Summe liegen beide Substanzen bei den höchsten Gewässerbelastungen im Bereich der AA-QS von 0,88 µg/L. Eine Beeinträchtigung der Gewässerbiozönose ist somit in Einzelfällen nicht auszuschließen. Aufgrund der stark steigenden Verordnungsmengen von Venlafaxin in den letzten Jahren sollte die Belastung der Oberflächengewässer weiterhin im Monitoring überwacht werden.

Ermittlung der längerfristigen Fischtoxizität ausgewählter Stoffe (Teilprojekt B)

Im Teilvorhaben B wurden ergänzend zu den im Rahmen des Teilprojektes A durchgeführten Standard-Biotests weiterführende Untersuchungen zu chronischen, subletalen Wirkungen des Antidiabetikums **Metformin** (CAS-Nr. 657-24-9) sowie seines Transformationsproduktes **Guanylsäure** (CAS-Nr. 141-83-3) an Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) durchgeführt.

Das Antidiabetikum Metformin ist eines der am häufigsten verschriebenen Arzneimittel in Deutschland mit steigender Tendenz. Der Mensch scheidet Metformin ohne Metabolisierung unverändert über die Nieren aus, sodass die gesamte eingesetzte Arzneimitteldosis in das Abwasser gelangt. Bei der Aufbereitung des Abwassers im Klärwerk entsteht aus Metformin im Wesentlichen das aerob-bakterielle Transformationsprodukt Guanylsäure. In Kläranlagenabflüssen in Deutschland wurden hohe Konzentrationen von bis zu 39 µg/L Metformin und bis zu 160 µg/L Guanylsäure nachgewiesen. Da beide Substanzen in der aquatischen Umwelt stabil sind erreichten die Konzentrationen in deutschen Oberflächengewässern bis zu 4,4 µg/L Metformin (bis zu 35 µg/L in der Emscher) und bis zu 32 µg/L Guanylsäure (Fluss Glens). In bisherigen Studien zu Metformin ergaben Standard-Biotests als niedrigste akute Effektkonzentration eine EC_{50/48h} (Immobilisierung bei 50 % der Testorganismen nach 48 h) von 64 mg/L beim großen Wasserfloh (*Daphnia magna*). Die niedrigste chronische Effektkonzentration wurde bislang mit ≥ 7,8 mg/L (NOEC nach 32 Tagen, Endpunkt unbekannt) bei der Dickkopflritze (*Pimephales promelas*) nachgewiesen.

Aktuelle Studien deuten jedoch auf eine estrogenische Wirkung von Metformin, u.a. bei Dickkopflritzen, ab einer Konzentration von 1 µg/L in Form einer induzierten Expression endokrinologisch relevanter Gene hin. Qualitativ histologisch nachweisbare Veränderungen des Hodengewebes und populationsrelevante Auswirkungen (verringerte Reproduktionsleistung) wurden bereits bei einer Konzentration von 40 µg/L beobachtet. Vor dem Hintergrund, dass

zurzeit über die Festlegung einer Umweltqualitätsnorm für Metformin diskutiert wird, ist eine fundierte Überprüfung eines potentiellen, endokrin disruptiven Effektes von Metformin unerlässlich. Da die Toxizität von Guanylurea für Fische bislang kaum untersucht worden ist, besteht zur Ermittlung eines validen Gesamtbildes, insbesondere auf Grund einer weitaus höheren Expositionsrelevanz im Vergleich zur Muttersubstanz, die Notwendigkeit einer gleichwertigen, zeitnahen Untersuchung von Guanylurea i.R. eines Expositionsversuches mit Fischen.

Zum Nachweis schädlicher Wirkungen von Arzneimittelwirkstoffen auf die aquatische Umwelt haben sich histopathologische Untersuchungen an Fischen als die Methode der Wahl erwiesen, da diese Substanzen spezifische, auf den Wirbeltierorganismus ausgerichtete Wirkungen entfalten. Im Rahmen von Untersuchungen zur Fischtoxizität des Arzneimittelwirkstoffes Diclofenac wurde gezeigt, dass die Anwendung quantitativ-morphologischer Untersuchungsmethoden der Morphometrie bzw. Stereologie eine objektive Quantifizierung histopathologischer Veränderungen ermöglicht. Hierdurch werden die Daten einer statistischen Auswertung zugänglich gemacht, auf deren Basis ökotoxikologische Schwellenwerte wie z. B. eine NOEC (No Observed Effect Concentration) abgeleitet werden können. Diese Methoden wurden nun zur Bewertung einer möglichen Schadwirkung der in der aquatischen Umwelt nachgewiesenen Konzentrationen von Metformin und Guanylharnstoff angewendet.

Als spezifischer Biomarker zum Nachweis estrogenen Wirkungen von Substanzen auf Fische hat sich u.a. die Konzentration von Vitellogenin (VTG) im Blut männlicher Fische etabliert. Bei VTG handelt es sich um einen Vorläufer des Dotterproteins, welches von Hepatozyten gebildet wird und über den Blutstrom zum Ovar gelangt. VTG wird physiologisch nur unter Einwirkung von Estrogenen und damit im Wesentlichen von Weibchen produziert. Männchen verfügen jedoch ebenfalls über Gene für die Synthese von VTG und die für die Regulation der VTG-Konzentration wichtigen Estrogen-Rezeptoren. Daher können männliche Fische nach Exposition mit Xenestrogenen eine Hochregulation der VTG-mRNA mit einem Anstieg von VTG im Blutplasma zeigen.

Im Rahmen der Studie wurden daher chronische toxische Effekte sowie endokrine Wirkungen sowohl der Tochttersubstanz Guanylurea (Teilversuch Nr. 1) als auch der Muttersubstanz Metformin (Teilversuch Nr. 2) auf subadulte Regenbogenforellen untersucht (Versuchsdesign angelehnt an die frühere OECD Guideline 204). In zwei separaten Versuchsansätzen wurden subadulte Regenbogenforellen über 28 Tage Konzentrationen von 0,1-1.000 µg/L der jeweiligen Testsubstanz ausgesetzt. Im Anschluss an die Exposition erfolgte eine pathologisch-anatomische Untersuchung, eine Bestimmung von Biomarkern und klinisch-chemischen Parametern sowie hämatologische Untersuchungen zur Erfassung des allgemeinen Gesundheitszustandes der Fische. Zur Darstellung endokriner Effekte erfolgte zudem eine semiquantitative (Teilversuch Nr. 1, Guanylharnstoff) oder stereologische (Teilversuch Nr. 2, Metformin) Bestimmung der Reife der männlichen Gonaden. Außerdem wurden weitere ausgewählte Organe der Testtiere einer histopathologischen Untersuchung unterzogen.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass Regenbogenforellenlarven zwischen dem 44. und dem 51. dpf (Tage nach der Fertilisation) sehr empfindlich auf einen Einfluss exogener, hormonell wirksamer Substanzen reagieren. In diesem Alter kann eine Exposition mit Xenoestrogenen zu einer Störung der Geschlechtsdifferenzierung sowie zur Entwicklung intersexuellen Hodengewebes (Ovotestis) führen. Um eine diesbezügliche Wirkungsweise von Metformin abzuklären, wurden in einem weiteren Teilversuch (Nr. 3) juvenile Regenbogenforellen ab einem Alter von 44 dpf auf endokrin disruptive Effekte durch eine Langzeit-Exposition (94 Tage) mit Konzentrationen von 0,1-1.000 µg/L Metformin hin untersucht.

Die Untersuchungsergebnisse weisen auf eine Beeinflussung des Hormonsystems subadulter, männlicher Regenbogenforellen nach Metformin-Exposition hin. Von den Veränderungen wird insbesondere der Nachweis einer zwar geringen, aber signifikanten Induktion von Vitellogenin als ein eindeutig auf die Metformin-Exposition zurückzuführender Effekt interpretiert. Diese Beeinflussung des Hormonsystems ging nach 28-tägiger Exposition jedoch nicht mit signifikanten Effekten hinsichtlich der biometrischen Daten (Körpergewicht, Gesamtlänge, Hoden- und Lebergewicht) oder biologischen Indices (Korpulenzfaktor, hepatosomatischer Index [HSI], gonadosomatischer Index [GSI]) einher. Die histopathologische Untersuchung der Hoden ergab keine Anzeichen von endokrin disruptiven Effekten, wie z.B. das Vorliegen von Ovotestis. Darüber hinaus wurden in der stereologischen Untersuchung von Hoden Metformin-exponierter Fische keine signifikanten Veränderungen der Anteile männlicher Keimzellen unterschiedlichen Reifegrades (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden, Spermien) festgestellt. Eine 94-tägige Metformin-Exposition juveniler Lebensstadien von Regenbogenforellen hatte keinen eindeutigen Einfluss auf Wachstum, Geschlechtsdifferenzierung und Gonadenentwicklung der Tiere.

Nach Exposition in Guanylhurea wurden bei adulten Regenbogenforellen beiderlei Geschlechts signifikante Veränderungen der Sexualhormone nachgewiesen. Die Werte ließen jedoch keine klare Tendenz oder Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen, sodass sie im Rahmen einer Risikobewertung keine Berücksichtigung finden. Eine Exposition in Guanylhurea verursachte keine Veränderungen von biometrischen Daten (Korpulenzfaktor, Körpergewicht, Gesamtlänge, Hoden- und Lebergewicht) oder biologischer Indices (Korpulenzfaktor, hepatosomatischer Index [HSI], gonadosomatischer Index [GSI]) der Regenbogenforellen.

Weder Metformin noch Guanylhurea führten zu pathologischen Veränderungen der Fischorgane oder zu eindeutigen, auf die Testsubstanzen zurückzuführenden hämatologischen und klinisch-chemischen Veränderungen.

Zusammenfassend ergaben die im Rahmen der Studie erhobenen Befunde Hinweise auf eine negative Beeinflussung der Fischgesundheit durch Metformin und Guanylhurea. Zur Ableitung eines ökotoxikologischen Schwellenwertes für Metformin im Rahmen des Teilprojekts A wurden die Veränderungen der Vitellogenin-Konzentrationen bei männlichen Regenbogenforellen herangezogen. Die NOEC hinsichtlich der Vitellogenin-Induktion lag mit 50 µg/L im Bereich der maximal in Oberflächengewässern gemessenen Metformin-Konzentrationen. Damit ist Metformin als gewässerrelevanter Spurenstoff einzustufen.

Summary

Numerous monitoring studies confirm the occurrence of anthropogenic pollutants in surface waters, which are mostly discharged from wastewater treatment plants. In order to implement the Water Framework Directive (2000/60 / EG) in the Surface Water Ordinance, environmental quality standards (QA) must be set for new river basin-specific substances. However, many of these substances have so far not, or only insufficiently, been investigated for their ecotoxicological potential. Therefore, a valid derivation of EQS is not feasible for various trace substances, as conclusive test results are missing.

The aim of this project is to expand data on ecotoxicological effects of relevant substances, to close existing data gaps, and to enable a risk assessment. Moreover, environmental quality standards that have already been proposed are to be reviewed or improved with regard to their protective effect for aquatic ecosystems.

Depending on the group of substances, the parameters lethality and reproduction, which are taken into account in standard tests, are not in each case sufficiently sensitive to determine the specific effects of these substances. This applies in particular to some active pharmaceutical ingredients and endocrine disrupting substances. Thus, as part of the project, the performed ecotoxicological standard tests were, in the cases of the substances metformin and guanyurea, supplemented with chronic, non-standard bioassays. The results of the chronic non-standard bioassays including data on sublethal effects such as endocrine effects or histopathological alterations will be included in the ecotoxicological assessment.

Determination of acute and chronic effects of selected substances using ecotoxicological standard tests (subproject A)

In subproject A, valid data of selected, environmentally relevant substances were evaluated on both, literature data as well as on results of performed ecotoxicological standard tests (algae, daphnia, fish embryo tests). All tests were performed according to TGD-EQS:

- ▶ algae test according to DIN EN ISO 8692 or OECD 201
- ▶ acute daphnia test according to DIN EN ISO 6341 or OECD 202
- ▶ chronic daphnia test according to ISO 10706 or OECD 211
- ▶ lemna test according to DIN EN ISO 20079
- ▶ fish embryo test according to DIN EN ISO 15088.

The substances tested were selected in consultation with the UBA. Substances and their degradation products found in relevant concentrations in the aquatic environment were considered (active pharmaceutical ingredients, herbicides, industrial chemicals). The parameters "large consumption quantities in Germany", "high persistence" and "poor degradability in the sewage treatment plant" were also taken into account in the selection of substances.

Hereinafter, a summary of substance data sheets with proposals for an environmental quality standard (EQS) is listed.

Amisulprid (CAS-No. 71675-85-9) is a psychopharmaceutical that blocks the dopamine receptors and thus leads to an increase in the dopamine level. The consumption figures for this medicinal product are reported to rise sharply. For this reason, an ecotoxicological assessment is

advisable. The highest measured water concentrations were 0.56 µg/L. An AA-QS of 140 µg/L was derived from the ecotoxicological data, which is 250 times higher than the water concentrations found. Therefore, no risk from amisulpride for aquatic biocenosis is to be expected.

Metamizole is prescribed as an antipyretic pain reliever. The substance is a prodrug, which is converted into its active ingredient 4-N-methylaminoantipyrine in the stomach. This active ingredient is further metabolized into the pharmacologically active substance **4-aminoantipyrine** (AA; CAS No. 83-07-8) and into the inactive 4-formylaminoantipyrine. AA produces another inactive metabolite, 4-acetylaminoantipyrine.

AA has been detected in rivers in concentrations up to 0.35 µg/L. The derived AA-QS of 1.6 µg/L is in the range of this environmental concentration. The toxic potential of AA is more than 1000 times higher than that of the other metabolites 4-acetylaminoantipyrine and 4-formylaminoantipyrine, which are pharmacologically ineffective.

Bisoprolol (CAS No. 66722-44-9) is an antihypertensive agent used to treat high blood pressure, angina pectoris and cardiac arrhythmia. This substance was found in rivers up to a concentration of 2.9 µg/L. High concentrations occurred in waterbodies whose wastewater content exceeded 50%. Even in these individual cases, a direct threat to the aquatic biocenosis by bisoprolol (AA-QS 92 µg/L) is unlikely.

The lincosamide antibiotic **clindamycin** (CAS No. 18323-44-9) is a semi-synthetic derivative of lincomycin, a natural antibiotic that is produced by the actinobacterium *Streptomyces lincolnensis*. It is used in both human and veterinary medicine. The effect is bacteriostatic to bactericidal by binding to the 23s region of the 50s ribosome subunits and thus inhibiting protein synthesis. The two main metabolites **clindamycin sulfoxide** (CAS No. 22431-46-5) and **N-desmethylclindamycin** (CAS No. 22431-45-4) are pharmacologically active.

The highest measured clindamycin concentrations in German watercourses exceed the AA-QS of 0.044 µg/L. The toxicity of the metabolite N-desmethylclindamycin is comparable to the toxicity of the parent substance, and therefore additive effects of these both substances in waters can be expected. No monitoring data on clindamycin sulfoxide and N-desmethylclindamycin are available, so a final risk assessment is not yet possible. Clindamycin is causing a risk for the aquatic environment and has to be observed together with the two main metabolites in monitoring programs.

1, 4-Dioxane (CAS No. 123-91-1) is a cyclic ether, which is widely used as an industrial chemical. Since the substance is relatively inert and dissolves well in water, it is used as a solvent in many production steps. According to current knowledge, there is no risk for aquatic organisms with an AA-QS of 57.5 mg/L. The concentrations found in surface waters are over a factor of 1000 below the AA-QS.

Gabapentin (CAS No. 60142-96-3) is a drug against epilepsy and neuropathic pain by reducing the release of mono-amine neurotransmitters. The highest measured water concentrations were 4.6 µg/L. Even with the highest test concentration of 100 mg/L used (limit test), no toxic effects were observed.

The antidiabetic drug **metformin** (CAS No. 657-24-9) is a substance from the group of biguanides, which is usually used to treat type 2 diabetes mellitus (non-insulin-dependent diabetes), especially for those who are overweight. It is one of the longest and most commonly administered oral anti-diabetic agents. **Guanylsurea** (CAS No. 141-83-3) is a stable transformation product of metformin. The highest measured concentrations of metformin in German surface waters are in the range of the AA-QS derived from the chronic fish tests of

5 µg/L. Therefore, a potential risk to aquatic biocenosis cannot be excluded, particularly due to metformin.

Lamotrigine (CAS No. 84057-84-1) is an anticonvulsant active ingredient from the group of antiepileptics, which is used to treat epilepsy and to prevent depressive episodes in patients with bipolar disorder. In surface waters lamotrigine achieves concentrations of 1.0 µg/L, close to the derived AA-QS of 8 µg/L. Therefore, negative impacts on the aquatic biocenosis cannot be excluded. Due to the rapidly increasing prescription quantities of lamotrigine in recent years, the pollution of surface waters should be monitored further on.

Methoxymethyltriphenylphosphonium chloride (CAS No. 4009-98-7) is a chemical substance, which is used as reagent in Wittig reactions. It is an organic chemical reaction that serves to form C = C bonds. An AA-QS of 2 µg/L for methoxymethyltriphenylphosphonium chloride was derived from the available toxicity data. Maximum concentrations of 0.9 µg/L were found in the river Rhine. The concentration of the substance in the water bodies strongly fluctuates. Therefore, an exceedance of the proposed quality standard cannot be excluded and is expected in particular at the points of discharge.

Oxipurinol (CAS No. 2465-59-0) is the main active metabolite of the drug allopurinol, which is prescribed for gout. The mother substance and the metabolite inhibit the formation of uric acid. Oxipurinol is found in surface waters in concentrations up to 22 µg/L. With an AA-QS of 14 µg/L, negative impacts on the aquatic biocenosis cannot be excluded.

Terbutryn-desethyl (M1; CAS No. 30125-65-6) is a transformation product of the biocides cybutryn (Irgarol®) and terbutryn. **Terbutryn sulfoxide** (CAS No. 82985-33-9) is another transformation product of terbutryn. These substances are used as algicidal active substances in house paints and anti-fouling hull coatings. They inhibit photosynthesis and are very toxic to all higher plants and algae.

The data concerning the chronic toxicity reveal that the transformation products are less toxic than the parent substances terbutryn (AA-QS 0.065 µg/L) and cybutryn (AA-QS 0.0017 µg/L). However, the highest measured concentrations of terbutryn-desethyl in surface waters exceed the derived AA-QS of 0.22 µg/L. According to the available data, terbutryn-desethyl as well as terbutryn and cybutryn are classified as potentially toxic for the aquatic environment.

Torsemide (CAS No. 56211-40-6) is one of the most used diuretics. The concentrations of torsemide found in surface waters were about 5000 times lower than the proposed AA-QS of 1670 µg/L. According to the current state of knowledge, the aquatic environment is not endangered by torsemide.

Valsartanic acid (CAS No. 164265-78-5) is formed in wastewater treatment plants as a transformation product of valsartan and other pharmaceuticals from the group of sartans. Sartans are used to lower blood pressure. In surface waters, the concentrations of valsartanic acid were about 500 times lower than the proposed AA-QS of 640 µg/L. According to the current state of knowledge, the aquatic environment is not affected by valsartanic acid.

Venlafaxine (CAS No. 93413-69-5) is a psychotropic drug that selectively inhibits the reuptake of noradrenaline and serotonin. Its main pharmacologically active degradation product, **O-desmethylvenlafaxine** (CAS No. 93413-62-8), is formed as a metabolic product in the human body and as a microbial degradation product in the sewage treatment plant.

Concentrations of venlafaxine and O-des-methylvenlafaxine found in surface waters reached up to 0.3 µg/L each. Thus, with an AA-QS of 0.88 µg/L negative impacts on the aquatic biocenosis cannot be excluded. Due to the rapidly increasing prescription quantities of venlafaxine in recent years, the pollution of surface waters should be monitored further on.

Determination of the long-term fish toxicity of selected substances (subproject B)

In addition to the ecotoxicological data of standard biotests generated in subproject A, in subproject B investigations were carried out on chronic, sublethal effects of the antidiabetic drug **metformin** (CAS-Nr. 657-24-9) and its transformation product **guanylsurea** (CAS-Nr. 141-83-3) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Metformin is one of the most commonly prescribed drugs in Germany, with a rising tendency. Humans excrete metformin without renal metabolism unchanged in urine, which is why the total drug dose enters into wastewater. In waste water treatment plants metformin has been described to be, under aerobic conditions, bacterially degraded to the stable dead-end transformation product guanylsurea. In German wastewater treatment plant effluents the maximal measured concentrations amounted to 39 µg/L metformin and 160 µg/L guanylsurea. As both substances are stable in the aquatic environment, in surface waters in Germany concentrations of up to 4.4 µg/L metformin (35 µg/L in river Emscher) and up to 32 µg/L guanylsurea (river Glens) were measured. In standard biotests, the lowest acute EC_{50/48h} (immobilisation of 50 % of test the organisms after 48 h) value for metformin has been established to be 64 mg/L for *Daphnia magna*. The lowest chronic effect concentration reported so far was ≥ 7.8 mg/L (NOEC after 32 days, endpoint not reported) in fathead minnow (*Pimephales promelas*).

However, recent studies indicated estrogenic effects of metformin at environmentally relevant concentrations. These estrogenic effects included, e.g. for *Pimephales promelas*, an induced expression of endocrine-related genes at concentrations of 1 µg/L as well as morphological alterations of the testis and negative impacts on reproduction success at concentrations of 40 µg/L metformin. Considering the current discussion about the determination of an environmental quality standard for metformin, the validation of potential endocrine disrupting effects of metformin is crucial. Moreover, the toxicity of the transformation product guanylsurea for fish was, despite its occurrence in relatively high concentrations in surface waters, hitherto almost not examined. For this purpose, the investigation of both substances for their endocrine disruptive potential and toxicity for fish in a chronic study was considered important.

For the detection of harmful effects of active pharmaceutical ingredients on the aquatic environment, histopathological studies on fish have proven to be the method of choice, since these substances have specific effects on vertebrate organisms. In the context of studies on the fish toxicity of diclofenac, it was shown that the use of quantitative-morphological methods, such as morphometry or stereology enable an objective quantification of histopathological alterations. Thus, the results are converted to numerical data suitable for statistical evaluation and thus form the basis for the derivation of ecotoxicological threshold values, e.g. NOEC (No Observed Effect Concentration). In the current study, these methods were applied to evaluate possible adverse effects of metformin and guanylsurea in a concentration range detected in the aquatic environment.

Specific biomarkers for the detection of estrogenic effects of substances on fish have been already established, for instance the concentration of vitellogenin (VTG) in the blood of male fish. VTG is a precursor of the yolk protein, which is formed by hepatocytes and reaches the ovary via the bloodstream. VTG is produced physiologically only under the influence of estrogens, and thus in the first place by females. However, also males have VTG genes and estrogen receptors, which are important for regulating the VTG concentration. Therefore, male fish exposed to xenestrogens may show both an upregulation of the VTG mRNA as well as an increase of VTG in the blood plasma.

In the course of the study, chronic, toxic effects and endocrine effects of the transformation product guanylhurea (partial experiment No. 1) and the parent substance metformin (partial experiment No. 2) on subadult rainbow trout were investigated (experimental design based on the previous OECD guideline 204). During two independent experiments, rainbow trout were exposed for 28 days to the respective test substance in a concentration range of 0.1 to 1,000 µg/L, respectively. After the exposure, gross pathological examinations, analysis of biomarkers and clinical-chemical parameters as well as haematological investigations were performed to record the general health status of fish. To detect endocrine effects, the maturity level of male gonads was determined histologically using semiquantitative (partial experiment No. 1, guanylhurea) or quantitative, stereological methods (partial experiment No. 2, metformin). In addition, histopathological investigations of further selected organs from the test animals were conducted.

Previously, rainbow trout larvae between the 44th and 51st dpf (days after fertilization) have been shown to be very sensitive to the influence of exogenous, hormonally active substances. At this age, exposure to xenestrogens can disrupt sex differentiation and induce development of intersex testicular tissue (ovotestis). To clarify if metformin induces such effects, in a third experiment, juvenile rainbow trout were chronically exposed (94 days) to concentrations of 0.1 to 1,000 µg/L metformin starting at the age of 44 days after hatching.

The results of the investigation indicate an influence on the hormonal system of subadult male rainbow trout after exposure to metformin. Among the changes identified, the detection of a slight but significant induction of vitellogenin in the blood of metformin-exposed male individuals can be interpreted as an effect, which is clearly related to the metformin exposure. However, after 28 days of exposure, this influence on the hormonal system was not accompanied by any significant effects concerning biometric data (body weight, total length, testis and liver weight) or biological indices (condition factor, hepatosomatic index [HSI], gonadosomatic index [GSI]). The histopathological examination of the testes revealed no signs of endocrine-disruptive effects such as e.g., ovotestis. Furthermore, the stereological examination of the testes of metformin-exposed fish revealed no significant changes regarding the proportion of male germ cells of different maturity stages (spermatogonia, spermatocytes, spermatids, spermatozoa). Metformin exposure of juvenile life stages of rainbow trout over a period of 94-days had no clear influence on the sex differentiation and gonadal development of the animals.

After exposure to guanylhurea, significant changes in sex hormones were detected in adult rainbow trout of both sexes. However, the values showed no clear trend or dose-response relationship, so that they were not taken into account in the risk assessment. Exposure in guanylhurea for 28 days did not influence biometric data (body weight, total length, testicle and liver weight) or biological indices (condition factor [Fultons' K], hepatosomatic index [HSI], gonadosomatic index [GSI]) of rainbow trout.

Neither metformin nor guanylhurea led to pathological alterations in the fish organs or to clear hematological and clinical-chemical changes related to the test substances.

In summary, the findings in the present study did not provide any evidence of a negative impact on fish health by metformin and guanylhurea. The increase in the plasma vitellogenin concentrations of male rainbow trout were used within the frame of subproject A to derive an ecotoxicological threshold value for metformin. With regard to vitellogenin induction a NOEC of 50 µg/L has to be established, which is in the range of the maximum concentrations of metformin measured in surface waters. Metformin is therefore classified as a water-relevant trace substance.

1 Einleitung

Die Europäische Union hat mit der seit Dezember 2000 gültigen Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) in allen Mitgliedsstaaten der EU einheitlich geltende Umweltziele für den Schutz des Grundwassers und der Oberflächengewässer aufgestellt und eine rechtliche Basis dafür geschaffen, wie das Wasser auf hohem Niveau zu schützen ist (Richtlinien 2000/60/EG und 2006/118/EG). Zu den Umweltzielen der EU-Wasserrahmenrichtlinie gehören das Erreichen eines guten chemischen und ökologischen Zustands der Gewässer sowie die Vermeidung einer weiteren Verschlechterung. Die WRRL enthält in Anhang X eine Liste prioritärer Stoffe, die ein erhebliches Risiko für den chemischen Zustand der aquatischen Umwelt auf EU Ebene darstellen.

In der Richtlinie 2008/105/EG wurden Umweltqualitätsnormen (UQN) im Bereich der Wasserpolitik eingeführt. Sie beinhalten konkrete Anforderungen an die Qualität des Grundwassers und der Oberflächengewässer sowie deren Überwachung.

Die UQN-Richtlinie wurde 2013 novelliert (2013/39/EU). Darin werden nun insgesamt 45 prioritäre Stoffe geregelt, die 2016 in die Oberflächengewässerverordnung übernommen wurden. Gleichzeitig wurde von der EU-Kommission eine Beobachtungsliste für Stoffe erstellt, für die zum Zweck der Unterstützung zukünftiger Priorisierungsverfahren Überwachungsdaten gesammelt werden.

Auf nationaler Ebene sind für flussgebietspezifische Schadstoffe UQN in der Oberflächengewässerverordnung festzulegen. Die Bewertung spezifischer Schadstoffe, die in signifikanten Mengen eingetragen werden, erfolgt im Rahmen der Einstufung des ökologischen Zustandes aquatischer Lebensgemeinschaften auf der Grundlage von ökotoxikologischen Wirkungsdaten. Stoffmengen, die an repräsentativen Messstellen zu Konzentrationen größer als die halbe UQN führen, werden als signifikant definiert. In Deutschland wurden für 67 Schadstoffe UQN rechtsverbindlich in Anlage 6 der Oberflächengewässerverordnung festgelegt. Die Prüfung auf Einhaltung der Umweltqualitätsnorm erfolgt an Hand von Jahresmittelwerten und maximal zulässigen Konzentrationen.

Für zahlreiche Stoffe liegen bislang jedoch keine, oder nur unzureichende Daten zur aquatischen Ökotoxizität vor. In der Konsequenz müssen bei der Ableitung von UQN z. T. unrealistisch hohe Sicherheitsfaktoren eingesetzt werden, um einen Schutz aquatischer Lebensgemeinschaften sicher zu gewährleisten.

Im vorliegenden Projekt werden ökotoxikologische Wirkungsdaten für ausgewählte Stoffe erarbeitet, um noch vorhandene Datenlücken zu schließen und damit eine realistische Umweltbewertung möglich zu machen. Die Auswahl der Stoffe erfolgte in Abstimmung mit dem Umweltbundesamt. Einbezogen wurden v. a. Stoffe und deren Abbauprodukte, die in der aquatischen Umwelt in relevanten Konzentrationen gefunden werden (Arzneimittelwirkstoffe, Herbizide, Industriechemikalien).

Die üblicherweise einer Stoffbewertung zugrundeliegenden Toxizitätsdaten beruhen auf Ergebnissen aus ökotoxikologischen Standardtests. Gemäß TGD-EQS werden für die Ableitung einer UQN Organismen (Algen, Daphnien, Fische) aus drei unterschiedlichen Trophie-Ebenen einbezogen. Ein Nachteil dieser Tests kann sein, dass dabei nicht immer der sensitivste Organismus bzw. die relevantesten Endpunkte betrachtet werden. Die in Standardtests berücksichtigten Endpunkte Letalität und Reproduktion erweisen sich je nach Stoffgruppe z. T. als nicht ausreichend empfindlich zur Ermittlung der von diesen Stoffen ausgehenden spezifischen Effekte. Dies gilt in besonderem Maße für manche Arzneimittelwirkstoffe und endokrin wirksame Substanzen. Aus diesem Grund sollen zunehmend auch ökotoxikologische

Daten aus Nicht-Standardtests bei der Stoffbewertung berücksichtigt werden, da den hieraus gewonnenen Ergebnissen z. T. eine höhere Umweltrelevanz zukommt. Für manche Stoffe (z. B. Diclofenac) hat sich gezeigt, dass insbesondere histopathologische Untersuchungen an Fischen geeignet sind, durch chemische Substanzen induzierte, subletale Veränderungen an Fischen nachzuweisen. Moderne Methoden der Morphometrie bzw. Stereologie ermöglichen eine Quantifizierung histopathologischer Veränderungen. Hierdurch können die Daten einer statistischen Auswertung zugänglich gemacht, sowie auf der Basis der statistischen Analysen ökotoxikologische Schwellenwerte wie NOEC und LOEC für Spurenstoffe abgeleitet werden. In Kombination mit Ergebnissen aus ökotoxikologischen Standardtests werden umfangreiche Daten generiert, die eine Ableitung belastbarer Qualitätsziele ermöglichen.

Im Rahmen dieses Projektes wurden die UQN von 18 Stoffen (Muttersubstanzen und Abbauprodukte) mithilfe von Standardtests ermittelt und Stoffdatenblätter erstellt. Zusätzlich wurde Daten zur längerfristigen Fischtoxizität des Antidiabetikums Metformin und dessen Transformationsprodukt Guanylurea unter Anwendung quantitativ-morphologischer Untersuchungsmethoden erhoben.

2 Teilprojekt A

2.1 Veranlassung

Polare Stoffe und deren Metaboliten gelangen vor allem über kommunale und industrielle Abwässer in die Oberflächengewässer.

Wie zahlreiche Untersuchungen zeigen, können diese chemischen Verbindungen in den nachgewiesenen Konzentrationen die Gesundheit von Wasserorganismen beeinträchtigen. Während prioritäre Stoffe auf EU-Ebene über die Wasserrahmenrichtlinie geregelt sind, werden für flussgebietsspezifische Stoffe auf nationaler Ebene Umweltqualitätsstandards gemäß TGD EQS No. 27 festgelegt.

Viele der über Monitoringprogramme gefundenen Stoffe sind bislang noch nicht oder nur unzureichend auf ihr ökotoxikologisches Potenzial untersucht worden. Bei der ökotoxikologischen Risikoabschätzung mit Hilfe von biologischen Wirktests fehlen vor allem Daten zur chronischen Langzeitwirkung. Deshalb muss für die Festlegung von Umweltqualitätsstandards mit hohen Sicherheitsfaktoren und damit mit unrealistischen worst-case Szenarien gearbeitet werden.

Ziel des Teilprojektes A war es, die verfügbare Datenlage zu ökotoxikologischen Wirkungen flussgebietsspezifischer Stoffe zu erweitern, eine Risikoabschätzung vorhandener Belastungen zu ermöglichen und bereits vorgeschlagene Umweltqualitätsziele im Hinblick auf deren Schutzwirkung für aquatische Ökosysteme zu überprüfen bzw. zu verbessern.

2.2 Methoden

Gemäß TGD-EQS wurden genormte Testverfahren mit Organismen aus verschiedenen Trophie-Ebenen ausgewählt. Die statistischen Auswertungen und Berechnungen der toxikologischen Kenngrößen erfolgten mit Hilfe der Statistiksoftware ToxRatPro.

Algentest nach DIN EN ISO 8692 bzw. OECD 201

Daphnientest akut nach DIN EN ISO 6341 bzw. OECD 202

Daphnientest chronisch nach ISO 10706 bzw. OECD 211

Lemnatest nach DIN EN ISO 20079

Fischartest nach DIN EN ISO 15088

Die effektiven Testkonzentrationen der untersuchten Stoffe wurden durch chemische Analytik mittels LC-MS/MS bestimmt.

Die Auswahl der ökotoxikologisch zu bewerteten Stoffe erfolgte nach folgenden Kriterien:

- ▶ Der Stoff wird regelmäßig im ng/L bis µg/L-Bereich in Oberflächengewässern gefunden.
- ▶ Metaboliten wurden berücksichtigt, wenn diese im Vergleich zur Muttersubstanz in relevanten Mengen im Gewässer gefunden werden.
- ▶ Der Stoff ist in den für die ökotoxikologischen Tests erforderlichen Konzentrationen wasserlöslich und stabil.
- ▶ Der zur Ableitung des Qualitätsstandards bisher zu Grunde gelegte Sicherheitsfaktor kann durch die am LfU etablierten Test-Methoden verkleinert werden.

Bei der Stoffauswahl wurden weiterhin die Parameter „große Verbrauchsmengen in Deutschland“, „hohe Persistenz“ sowie „schlechte Abbaubarkeit in der Kläranlage“ berücksichtigt.

2.3 Ergebnisse

Im Folgenden sind die im Rahmen des Projektes erstellten Stoffdatenblätter mit den Vorschlägen für einen Umweltqualitätsstandard in ihrer jeweiligen Kurzfassung aufgeführt. Die ausführlichen Versionen der Datenblätter sind als Anhang bereitgestellt.

2.3.1 Datenblatt Amisulprid (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Amisulprid

Amisulprid (CAS-Nr. 71675-85-9) ist ein Psychopharmakum, welches die Dopaminrezeptoren blockiert und so zu einer Erhöhung des Dopaminspiegels führt. Für dieses Arzneimittel werden stark steigende Verbrauchszahlen bescheinigt. Aus diesem Grund ist eine ökotoxikologische Beurteilung angezeigt.

Auf die Ableitung der MAC-QS_{freshwater,eco} wurde verzichtet, da alle EC₅₀-Werte mit „größer“ der höchsten getesteten Konzentrationen angegeben sind und somit keine Art als empfindlichster Organismus bestimmt werden konnte. Zur Ableitung der AA-QS_{freshwater,eco} liegen Langzeitergebnisse zur chronischen Wirkung von Amisulprid für zwei Arten aus zwei Trophie-Ebenen vor. Als empfindlichste Gruppe konnte auch hier keine Art eindeutig identifiziert werden, da bei allen vorliegenden Tests die NOEC/EC₁₀-Werte „größer oder gleich“ der höchsten getesteten Konzentrationen waren. Auf Grundlage der vorliegenden Daten wurde der Qualitätsstandard nach TGD-EQS nur mit einem Sicherheitsfaktor von 100 (statt 50) abgeleitet.

Tabelle 1: Qualitätsstandards für Amisulprid

	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC-QS _{freshwater,eco}	----	----		----
AA-QS _{freshwater,eco}	Alge, NOEC	14000	100	140

Gesamtbeurteilung:

Die höchsten gemessenen Gewässerkonzentrationen lagen bei 0,56 µg/L. Aus den ökotoxikologischen Daten wurde ein AA-QS_{freshwater,eco} von 140 µg/L abgeleitet, der um das 250-fache über den gefundenen Gewässerkonzentrationen liegt. Deshalb ist keine Gefährdung durch Amisulprid für die Gewässerbiozönose zu erwarten. Bei weiterhin steigendem Verbrauch sollten die Gewässerkonzentrationen jedoch auch zukünftig gemessen werden.

Zum chronischen Fischtest liegen keine Daten vor. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass aufgrund des spezifischen Wirkmechanismus von Amisulprid Fische empfindlicher reagieren als die bislang untersuchten Organismen.

Die ausführliche Version des Datenblattes ist im Anhang bereitgestellt.

2.3.2 Datenblatt Torsemid (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Torsemid

Torsemid (Synonymname Torasemid; CAS-Nr. 56211-40-6) ist eines der meist verwendeten Diuretika. Seine Wirkung beruht auf der Hemmung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporters am aufsteigenden dicken Ast der Henle-Schleife im Nephron der Niere. Dies führt zu einer verstärkten Ausscheidung von Natrium, Kalium, Chlorid und Wasser über den Harn. Wegen stark steigender Verbrauchszahlen ist eine Einschätzung zur Toxizität in der aquatischen Umwelt angezeigt.

Auf die Ableitung der $\text{MAC-QS}_{\text{freshwater,eco}}$ wurde verzichtet, da alle EC_{50} -Werte mit „größer“ der höchsten getesteten Konzentrationen angegeben sind und somit keine Art als empfindlichster Organismus bestimmt werden konnte. Zur Ableitung der $\text{AA-QS}_{\text{freshwater,eco}}$ liegen Langzeitergebnisse zur chronischen Wirkung von Torsemid für zwei Arten aus zwei Trophie-Ebenen vor. Als empfindlichste Gruppe konnte auch hier keine Art eindeutig identifiziert werden, da bei allen vorliegenden Tests die $\text{NOEC}/\text{EC}_{10}$ -Werte „größer oder gleich“ der höchsten getesteten Konzentrationen waren. Auf Grundlage der vorliegenden Daten wurde der Qualitätsstandard nach TGD-EQS nur mit einem Sicherheitsfaktor von 100 (statt 50) abgeleitet.

Tabelle 2: Qualitätsstandards für Torsemid

	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [$\mu\text{g/L}$]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [$\mu\text{g/L}$]
$\text{MAC-QS}_{\text{freshwater,eco}}$	----	----		----
$\text{AA-QS}_{\text{freshwater,eco}}$	Alge, NOEC	167000	100	1670

Gesamtbeurteilung:

Die in Oberflächengewässern gefundenen Konzentrationen an Torsemid lagen durchweg um den Faktor 5000 niedriger als die vorgeschlagene AA-QS . Nach dem derzeitigen Stand des Wissens sind die aquatischen Lebensgemeinschaften durch Torsemid nicht gefährdet.

Zum chronischen Fischtest liegen keine Daten vor. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass aufgrund des spezifischen Wirkmechanismus von Torsemid Fische empfindlicher reagieren als die bislang untersuchten Organismen.

Aufgrund der stark steigenden Verbrauchsmengen von Torsemid sollte die Gewässerbelastung weiterhin im Monitoring überprüft werden.

Die ausführliche Version des Datenblattes ist im Anhang bereitgestellt.

2.3.3 Datenblatt Valsartansäure (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Valsartansäure

Valsartansäure (CAS-Nr. 164265-78-5) entsteht in Kläranlagen als Transformationsprodukt von Valsartan sowie weiterer Arzneimittelwirkstoffe aus der Gruppe der Sartane. Arzneimittel aus dieser Gruppe werden als Blutdrucksenker eingesetzt. Valsartan weist den höchsten Verbrauch unter den Sartanen auf und ist somit wahrscheinlich die Hauptquelle der Transformation zu Valsartansäure.

Die MAC-QS_{freshwater,eco} wird aus den Ergebnissen der Akuttests aus drei Trophie-Ebenen ermittelt. Die EC₅₀-Werte der Akuttests lagen über den eingesetzten Testkonzentrationen, zur Ableitung wurde der niedrigste Wert aus dem Fischei-Test herangezogen. Der Endpunkt „Yield“ (E_yC₅₀) im Algentest wurde nicht berücksichtigt, da dieser nach TGD-EQS wenig relevant ist.

Zur Ableitung der AA-QS_{freshwater,eco} liegen Langzeitergebnisse zur chronischen Wirkung von Valsartansäure für zwei Arten aus zwei Trophie-Ebenen vor. Am empfindlichsten waren die Grünalgen mit einem NOEC von 32 mg/L.

Tabelle 3: Qualitätsstandards für Valsartansäure

	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC-QS _{freshwater,eco}	Fischei, EC ₅₀	60000	100	600
AA-QS _{freshwater,eco}	Alge, NOEC	32000	50	640

Gesamtbeurteilung:

Die akute Toxizität des Transformationsproduktes Valsartansäure liegt im Bereich der anderen untersuchten Sartane, mit Ausnahme von Telmisartan, welches sich wesentlich toxischer zeigte. Valide Literaturdaten zu chronischen Studien liegen lediglich für Candesartan vor. Der chronische Fischtest war mit einem NOEC von 1 mg/L um mehr als Faktor 10 empfindlicher als der Test an Algen und Daphnien. Bei der Bewertung der Valsartansäure sowie anderer Sartane ist somit eine höhere Toxizität durch eine chronische Wirkung auf Fische aufgrund des spezifischen Wirkmechanismus zu erwarten. Die vorliegende Bewertung ist somit eventuell nicht ausreichend, daher wurde auch auf die Ableitung eines EQS verzichtet. Zur endgültigen Bewertung von Valsartansäure und anderer Sartane sollten auch Daten aus chronischen Fischtests vorliegen. Weiterhin sollten für eine abschließende toxikologische Bewertung der Sartane mögliche additive Wirkungen im Gewässer berücksichtigt werden.

Valsartansäure ist eine ionisierbare Substanz, d. h. die Toxizität ist abhängig vom pH-Wert. Die am LfU durchgeführten Toxizitätstests lagen im neutralen bis schwach alkalischen Bereich.

In Oberflächengewässern lagen die Konzentrationen an Valsartansäure durchweg um den Faktor 500 niedriger als die vorgeschlagene AA-QS. Nach dem derzeitigen Stand des Wissens sind die aquatischen Lebensgemeinschaften durch Valsartansäure nicht gefährdet.

Für Sedimentorganismen liegen keine Wirkungsdaten vor. Es gibt keine verlässlichen Daten zum log K_{ow}, log K_{oc} oder für einen Verteilungskoeffizienten Sediment-Wasser. Valsartansäure wird als persistent eingestuft. Aufgrund der stark steigenden Verordnungsmengen von Sartanen sollte die Belastung der Oberflächengewässer weiterhin im Monitoring überwacht werden.

Die ausführliche Version des Datenblattes ist im Anhang bereitgestellt.

2.3.4 Datenblatt Gabapentin (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Gabapentin

Gabapentin (CAS-Nr. 60142-96-3) ist ein Arzneimittel, welches gegen Epilepsie und neuropathische Schmerzen wirkt, indem es die Freisetzung von Mono-Amin-Neurotransmittern reduziert.

Auf die Ableitung der MAC-QS_{freshwater,eco} wurde verzichtet, da alle EC₅₀-Werte mit „größer“ der höchsten getesteten Konzentrationen angegeben sind und somit keine Art als empfindlichster Organismus bestimmt werden konnte.

Zur Ableitung der AA-QS_{freshwater,eco} liegen Langzeitergebnisse zur chronischen Wirkung von Gabapentin für Arten aus zwei Trophie-Ebenen vor. Bis zu einer Konzentration von 100 mg/L konnte ebenfalls für keine der getesteten Spezies eine Wirkung nachgewiesen werden. Auf Grundlage der vorliegenden Daten wurde der Qualitätsstandard nach TGD-EQS mit einem Sicherheitsfaktor von 100 (statt 50) abgeleitet, da keine empfindlichste Spezies ermittelt werden konnte.

Tabelle 4: Qualitätsstandards für Gabapentin

	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC-QS _{freshwater, eco}	----	----		----
AA-QS _{freshwater, eco}	Daphnia, Alge, NOEC	>1.00000	100	1.000

Gesamtbeurteilung:

Die höchsten gemessenen Gewässerkonzentrationen lagen bei 4,6 µg/L. Mit der eingesetzten Testkonzentration von nominal 100 mg/L (Limittest) wurde keine toxische Wirkung erzielt.

Zum chronischen Fischttest liegen keine Daten vor. Besonders bei Stoffen wie Gabapentin, die auf das Nervensystem wirken, ist nicht auszuschließen, dass Fische wesentlich sensibler reagieren als die bislang untersuchten Organismen. Die vorliegende Ableitung ist somit eventuell nicht ausreichend, daher wurde auch auf die Ableitung eines EQS verzichtet. Zur endgültigen Bewertung von Gabapentin sollten auch Daten aus einem chronischen Fischttest vorliegen.

Die ausführliche Version des Datenblattes ist im Anhang bereitgestellt.

2.3.5 Datenblatt Lamotrigin (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Lamotrigin

Lamotrigin (CAS-Nr. 84057-84-1) ist ein antikonvulsiver Wirkstoff aus der Gruppe der Antiepileptika, der zur Behandlung der Epilepsie und zur Vorbeugung depressiver Episoden bei Patienten mit einer bipolaren Störung eingesetzt wird. Die Wirkungen beruhen in erster Linie auf der Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle in Nervenzellen. Dadurch wird die Freisetzung von exzitatorischen Neurotransmittern wie Glutamat und Aspartat aus der Präsynapse gehemmt. Die Folge ist eine geringere Erregung des zentralen Nervensystems und ein reduziertes Risiko für epileptische Anfälle.

Der MAC-QS_{freshwater,eco} wurde vom EC₅₀-Wert aus dem Daphnientest mit einem Sicherheitsfaktor von 100 abgeleitet. Der Endpunkt „Yield“ aus dem Algentest wurde bei der Ableitung nicht berücksichtigt, da dieser nach TGD-EQS weniger relevant ist.

Zur Ableitung eines vorläufigen AA-QS_{freshwater,eco} liegen Langzeitergebnisse zur chronischen Wirkung von Lamotrigin für zwei Arten aus zwei Trophie-Ebenen vor. Die empfindlichste Gruppe sind die Daphnien mit einem NOEC von 0,4 mg/L. Auf Grundlage dieser Daten wurde der Qualitätsstandard nach TGD-EQS mit einem Sicherheitsfaktor von 50 abgeleitet.

Tabelle 5: Qualitätsstandards für Lamotrigin

	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC-QS _{freshwater, eco}	Daphnia, EC ₅₀	66600	100	666
AA-QS _{freshwater, eco}	Daphnia, NOEC	400	50	8

Gesamtbeurteilung:

Aus dem chronischen Daphnientest wurde ein AA-QS von 8 µg/L abgeleitet. In Oberflächengewässern waren Konzentrationen bis 1,0 µg/L bestimmt worden. Die Gewässerbelastung bewegt sich im Konzentrationsbereich des abgeleiteten AA-QS_{freshwater,eco}. Eine Beeinträchtigung der Gewässerbiozönose ist somit nicht auszuschließen.

Zum chronischen Fischtest liegen keine Daten vor. Besonders bei Stoffen wie Lamotrigin, die auf das Nervensystem wirken, ist nicht auszuschließen, dass Fische wesentlich sensibler reagieren als die bislang untersuchten Organismen. Die vorliegende Ableitung mit einem Sicherheitsfaktor 50 ist somit eventuell nicht ausreichend. Zur endgültigen Bewertung von Lamotrigin sollten auch Daten aus einem chronischen Fischtest vorliegen.

Aufgrund der stark steigenden Verordnungsmengen von Lamotrigin in den letzten Jahren sollte die Belastung der Oberflächengewässer weiterhin im Monitoring überwacht werden.

Die ausführliche Version des Datenblattes ist im Anhang bereitgestellt.

2.3.6 Datenblatt Venlafaxin und O-Desmethylenlafaxin (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Venlafaxin und O-Desmethylenlafaxin

Venlafaxin (CAS-Nr. 93413-69-5) ist ein Psychopharmakum, welches die Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin selektiv hemmt. Sein pharmakologisch aktiver Hauptmetabolit O-Desmethylenlafaxin (ODV; CAS-Nr. 93413-62-8) wird direkt als Medikament eingesetzt, entsteht nach Einnahme von Venlafaxin als Stoffwechselprodukt im Körper oder als Abbauprodukt in der Kläranlage.

Der MAC-QS_{freshwater, eco} wird aus den Ergebnissen der Akuttests aus drei Trophie-Ebenen ermittelt. Die Ableitung wurde mit den Ergebnissen aus dem akuten Daphnientest durchgeführt. Der Endpunkt „Yield“ aus dem Algentest für Venlafaxin wurde bei der Ableitung nicht berücksichtigt, da dieser nach TGD-EQS weniger relevant ist.

Zur Ableitung der AA-QS_{freshwater, eco} liegen Langzeitergebnisse zur chronischen Wirkung von Venlafaxin auf Daphnien, Algen, Lemna und Fischen vor. Für O-Desmethylenlafaxin gibt es ausschließlich die vom LfU erhobenen Daten zur Daphnien- und Algtoxizität.

Parrot & Metcalfe (2017)* führten einen „full lifecycle test“ über 167 Tage mit *Pimephales promelas* durch. Die Validitätskriterien können aufgrund des umfangreichen Supplementary überprüft werden. Die analytisch bestätigten Testkonzentrationen lagen bei 0,88, 8,8 und 88 µg/L. Bei der höchsten Konzentration von 88 µg/L wurden im Vergleich zur Kontrolle signifikant (46 %) mehr Eier pro Weibchen produziert. Die NOEC ist somit 8,8 µg/L und die mit einem Sicherheitsfaktor von 10 abgeleitete EQS 0,88 µg/L. Da für O-Desmethylenlafaxin kein chronischer Fischtest vorliegt, wird wegen der Ähnlichkeit der beiden Stoffe diese Ableitung auch für den Metaboliten herangezogen.

Tabelle 6: Qualitätsstandards für Venlafaxin und O-Desmethylenlafaxin

Venlafaxin	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC-QS _{freshwater, eco}	Daphnia, EC ₅₀	34000	100	340
AA-QS _{freshwater, eco}	Fisch, NOEC	8,8	10	0,88
O-Desmethylenlafaxin	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC _{freshwater, eco}	Daphnia, EC ₅₀	78000	100	780
AA-QS _{freshwater, eco}	Fisch, NOEC (Wert aus dem Test mit Venlafaxin)	8,8	10	0,88

Da Venlafaxin und O-Desmethylenlafaxin chemisch sehr nahe verwandt sind und eine synergetische Wirkung zu vermuten ist, sollte es bei einer Messung von beiden Substanzen keine summarische Überschreitung von 0,88 µg/L geben.

Bei beiden Stoffen konnte weder Gentoxizität noch eine endokrine Wirkung bis zu einer Konzentration von 100 mg/L nachgewiesen werden.

Gesamtbeurteilung:

Zur Ableitung des AA-QS wurde der chronische Fischtest von Parrot & Metcalf (2017) mit der NOEC von 8,8 µg/L herangezogen.

Die in Oberflächengewässern gefundenen maximalen Konzentrationen an Venlafaxin und O-Des-methylvenlafaxin liegen bei jeweils ca. 0,3 µg/L. In der Summe liegen beide Substanzen bei den höchsten Gewässerbelastungen im Bereich der AA-QS_{freshwater, eco} von 0,88 µg/L. Eine Beeinträchtigung der Gewässerbiozönose ist somit in Einzelfällen nicht auszuschließen. Aufgrund der stark steigenden Verordnungsmengen von Venlafaxin in den letzten Jahren sollte die Belastung der Oberflächengewässer weiterhin im Monitoring überwacht werden.

Die ausführliche Version des Datenblattes ist im Anhang bereitgestellt.

* Parrot, J.L., Metcalf, C.D. 2017. Assessing the effects of the antidepressant venlafaxine to fathead minnows exposed to environmentally relevant concentrations over a full life cycle. Environ. Poll. 229, 403-411

2.3.7 Datenblatt Clindamycin, N-Desmethylclindamycin und Clindamycinsulfoxid (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Clindamycin, N-Desmethylclindamycin und Clindamycinsulfoxid

Das Lincosamid-Antibiotikum Clindamycin (CAS-Nr. 18323-44-9) ist ein halbsynthetisches Derivat von Lincomycin, ein natürliches Antibiotikum, welches durch das Actinobakterium *Streptomyces lincolnensis* produziert wird. Es wird in der Human- und auch in der Veterinärmedizin als Clindamycinhydrochlorid eingesetzt. Die Wirkung ist bakteriostatisch bis bakterizid, indem es an den 23s Bereich der 50s Ribosomuntereinheiten bindet und somit die Proteinsynthese hemmt. Dieser Wirkmechanismus ist mit dem der Makrolidantibiotika vergleichbar. Die beiden Hauptmetaboliten Clindamycinsulfoxid (CAS-Nr. 22431-46-5) und N-Desmethylclindamycin (CAS-Nr. 22431-45-4) sind pharmakologisch aktiv.

Clindamycin und sein Metabolit Clindamycinsulfoxid zeigten gegenüber Kleinkrebsen, Fischembryonen sowie Lemna keine oder nur eine geringe Wirkung (N-Desmethylclindamycin wurde nicht getestet).

Grünalgen und Cyanobakterien (Blaualgen) waren die empfindlichsten Spezies unter den untersuchten Organismen. Das Wachstum dieser Spezies wurde durch Clindamycin und N-Desmethylclindamycin bereits im Konzentrationsbereich von 2-11 µg/L gehemmt, Clindamycinsulfoxid wirkte erst bei Werten über 200 µg/L.

Tabelle 7: Qualitätsstandards für Clindamycin, Clindamycinsulfoxid und N-Desmethylclindamycin

Clindamycin	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC _{freshwater, eco}	Grünalge, E _r C ₅₀	5,4	100	0,054
AA-QS _{freshwater, eco}	Grünalge, E _r C ₁₀	2,2	50	0,044
Clindamycin-sulfoxid	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC _{freshwater, eco}	Cyanobakterien, E _r C ₅₀	870	100	8,7
AA-QS _{freshwater, eco}	Cyanobakterien, E _r C ₁₀	203	50	4,0
N-Desmethyl-clindamycin	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC _{freshwater, eco}	Cyanobakterien, E _r C ₅₀	10,9	100	0,11
AA-QS _{freshwater, eco}	Grünalge, E _r C ₁₀	5	50	0,1

Der MAC-QS wird aus den Ergebnissen der Akuttests aus drei Trophie-Ebenen ermittelt. Die Ableitung wurde mit den Ergebnissen aus dem Test mit Grünalgen (Clindamycin) bzw. Cyanobakterien (Clindamycinsulfoxid, N-Desmethylclindamycin) durchgeführt.

Die Datenlage zur chronischen Toxizität für Clindamycin und Clindamycinsulfoxid erlaubt nach TGD-EQS die Verwendung eines SF 50, da chronische Testergebnisse aus zwei Trophie-Ebenen (Algen und Daphnien) vorliegen. Unter Berücksichtigung eines SF 50 auf die EC₁₀-Werte von *Desmodesmus subspicatus* ist ein AA-QS_{freshwater,eco} von 0,044 µg/L für Clindamycin und 4,0 µg/L für Clindamycinsulfoxid abzuleiten. Aufgrund der vorliegenden Datenlage ist es sehr wahrscheinlich, dass im Falle von N-Desmethylclindamycin Algen bzw. Cyanobakterien ebenfalls die empfindlichste Spezies stellen. Deshalb wird trotz eines fehlenden Daphnientests ein Sicherheitsfaktor von 100 für die Ableitung des MAC-QS und 50 zur Ableitung des AA-QS verwendet.

Zur Ableitung der QS wurden die robusteren EC-Werte der NOEC vorgezogen. Der Endpunkt „Yield“ im Algentest wurde nicht berücksichtigt, da dieser nach TGD-EQS weniger relevant ist.

Gesamtbeurteilung:

Die höchsten gemessenen Clindamycin-Konzentrationen in deutschen Fließgewässern überschreiten die AA-QS_{freshwater,eco}. Die Toxizität des Metaboliten N-Desmethylclindamycin ist mit der Toxizität der Muttersubstanz vergleichbar, d.h. hier sind additive Wirkungen im Gewässer zu erwarten. Bislang liegen keine Monitoringdaten zu Clindamycinsulfoxid und N-Desmethylclindamycin vor, eine abschließende Risikobewertung ist somit noch nicht möglich.

Clindamycin ist als gewässerrelevant einzustufen und zusammen mit den beiden Hauptmetaboliten in Monitoringprogrammen zu beobachten!

Zum chronischen Fischtest liegen keine Daten vor. Es ist wenig wahrscheinlich jedoch nicht auszuschließen, dass Fische empfindlicher reagieren als die bislang untersuchten Organismen.

Die ausführliche Version des Datenblattes ist im Anhang bereitgestellt.

2.3.8 Datenblatt Guanylurea und Metformin (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Guanylurea und Metformin

Das Antidiabetikum Metformin (CAS-Nr. 657-24-9) ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Biguanide, der in der Regel bei nicht insulinabhängiger Zuckerkrankheit und insbesondere bei Übergewicht eingesetzt wird. Es ist eines der am längsten und das am häufigsten verabreichte orale Antidiabetikum. Guanylurea ist ein stabiles Transformationsprodukt von Metformin.

Der MAC-QS für Guanylurea wurde aus dem akuten Daphnientest abgeleitet. Der abgeleitete Wert für Metformin basiert auf den Daten von Cleuvers (2003)*.

Zur Ableitung des AA-QS_{freshwater,eco} für Metformin und Guanylurea wurden Veränderungen in der Vitellogenin-Konzentration im Blut subadulter Regenbogenforellen nach einer 28 Tage dauernden Exposition herangezogen. Bei Guanylurea lag die NOEC über der höchsten eingesetzten Testkonzentration von 1 mg/L, aus Vorsorgegründen wurde dieser Wert jedoch zur Ableitung des QS herangezogen.

Tabelle 8: Qualitätsstandards für Guanylurea und Metformin

Guanylurea	relevante Studie	niedrigste Konz. [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger QS [µg/L]
MAC-QS _{freshwater,eco}	Daphnia EC ₅₀	97000	100	970
AA-QS _{freshwater,eco}	Fisch NOEC	>1.000	10	100
Metformin	relevante Studie	niedrigste Konz. [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger QS [µg/L]
MAC-QS _{freshwater,eco}	Daphnia EC ₅₀	64000	100	640
AA-QS _{freshwater,eco}	Fisch NOEC	50	10	5

Gesamtbeurteilung:

Die höchsten gemessenen Konzentrationen an Metformin und Guanylurea in deutschen Fließgewässern liegen im Bereich der aus den chronischen Fischtests abgeleiteten AA-QS_{freshwater,eco}. Eine potenzielle Gefährdung der aquatischen Biozönose ist somit insbesondere durch Metformin nicht auszuschließen.

Sowohl Metformin als auch Guanylurea zeigen eine endokrine Wirkung.

Die ausführliche Version des Datenblattes ist im Anhang bereitgestellt.

*Cleuvers, M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. Toxicol. Lett. 142, 185-194

2.3.9 Datenblatt Bisoprolol (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Bisoprolol

Betablocker sind blutdrucksenkende Arzneimittel zur Behandlung von Bluthochdruck, Angina pectoris und Herzrhythmusstörungen. Sie binden an β -Adrenorezeptoren. Sie können selektiv auf die β_1 -Rezeptoren im Herz wirken (z. B. Atenolol, Metoprolol, Bisoprolol, Acebutolol) oder nicht selektiv auf β_1 oder β_2 -Rezeptoren (z. B. Propranolol, Oxprenolol, Nadolol).

Bisoprolol ist ein blutdrucksenkendes Mittel aus der Gruppe der β_1 -Blocker. Es wird in einer 1:1-Mischung als Racemat eingesetzt.

Die MAC-QS_{freshwater,eco} wird aus den Ergebnissen der Akuttests aus drei Trophie-Ebenen ermittelt. Im akuten Fischtest trat keine Wirkung bis 40 mg/L (höchste eingesetzte Konzentration) auf. Die Daphnien waren mit einem EC₅₀-Wert von 55 mg/L gegenüber Bisoprolol die empfindlichsten getesteten Organismen. Der Endpunkt „Yield“ (E_yC₅₀) im Algentest wurde nicht berücksichtigt, da dieser nach TGD-EQS wenig relevant ist.

Zur Ableitung der AA-QS_{freshwater,eco} liegen Langzeitergebnisse zur chronischen Wirkung von Bisoprolol für zwei Arten aus zwei Trophie-Ebenen vor. Am empfindlichsten waren die Algen mit einem E_rC₁₀ von 4,6 mg/L. Der Endpunkt „Yield“ (E_yC₁₀) wurde nicht berücksichtigt.

Tabelle 9: Qualitätsstandards für Bisoprolol

	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [μ g/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [μ g/L]
MAC-QS _{freshwater,eco}	Daphnia akut, EC ₅₀	55000	100	550
AA-QS _{freshwater,eco}	Alge, E _r C ₁₀	4600	50	92

Gesamtbeurteilung:

Bisoprolol wurde in Flüssen bis zu einer Konzentration von 2,9 μ g/L gefunden. Die hohen Werte traten in Gewässern auf, deren Abwasseranteil 50 % überschritt. Selbst in diesen Einzelfällen gilt eine unmittelbare Gefährdung der Gewässerbiozönose durch Bisoprolol (AA-QS 92 μ g/L) als unwahrscheinlich.

Die Gewässerkonzentrationen von Metoprolol liegen trotz der hohen Verbrauchsmenge von 143 t/a im Bereich von Bisoprolol. Mit einem AA-QS von 8,6 μ g/L ist die Metoprolol deutlich toxischer als Bisoprolol und eine Gefährdung der Gewässerbiozönose bei Fließgewässern mit hohem Abwasseranteil nicht auszuschließen.

Die in Oberflächengewässern gefundenen Konzentrationen an Atenolol liegen über Faktor 1.000 unter dem vorgeschlagenen AA-QS von 150 μ g/L. Nach derzeitigem Stand des Wissens sind die aquatischen Lebensgemeinschaften durch Atenolol nicht gefährdet.

Der Betablocker Sotalol (D: Verbrauchsmenge 2,6 t/a) wurde aufgrund seiner geringen akuten Toxizität (EC₅₀-Werte >300 mg/L) im Datenblatt nicht berücksichtigt.

Von den im vorliegenden Datenblatt recherchierten Betablockern zeigt Propranolol mit einem AA-QS von 0,1 μ g/L die größte toxische Wirkung auf Gewässerorganismen. Die Gewässerkonzentrationen von Propranolol sind mit maximal 18 ng/L in Fließgewässern mit hohem Abwasseranteil sehr niedrig. Eine Gefährdung der Gewässerbiozönose ist daher unwahrscheinlich.

Im chronischen Fischtest ist keine hohe Toxizität von Bisoprolol zu erwarten, da in der Literatur weder für Metoprolol noch für Propranolol eine hohe Fischsensitivität ermittelt wurde. Für Metoprolol gibt es allerdings Daten zur Zytotoxikologie an Fischen, die eine gewisse Sensitivität aufzeichnen. Wegen der schlechten Einschätzbarkeit solcher Daten werden diese jedoch nicht zur Ableitung herangezogen.

Das ökotoxikologische Gefährdungspotenzial von Betablockern kann als gering eingestuft werden. In kleinen Fließgewässern mit hohem Abwasseranteil kann lediglich Metoprolol in Konzentrationen auftreten, die eine Wirkung auf die Biozönose nicht ausschließen lassen.

Die ausführliche Version des Datenblattes ist im Anhang bereitgestellt.

2.3.10 Datenblatt 4-Aminoantipyrin (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von 4-Aminoantipyrin

Der genaue Wirkungsmechanismus für Metamizol ist noch nicht geklärt. Man nimmt an, dass sowohl Metamizol selbst wie auch sein Stoffwechselprodukt, (4-N-Methylaminoantipyrin) am zentralen Nervensystem (Rückenmark und Gehirn) wirken, aber auch in den übrigen Körpergeweben Auswirkungen zeigen. Beide Stoffe scheinen die Schmerzvermittlung durch Prostaglandine zu hemmen. Prostaglandine sind Botenstoffe, die an der Schmerzempfindung beteiligt sind. Die Wirkung von Metamizol und seinem Haupt-Stoffwechselprodukt wäre damit ähnlich wie die der nicht-steroidalen Antirheumatika. Metamizol wird als fiebersenkendes Schmerzmittel verschrieben. Die Substanz ist eine Prodrug, deren aktiver Wirkstoff 4-N-Methylaminoantipyrin als Metabolit bereits im Magen entsteht. Dieser aktive Wirkstoff wird weiter zu dem ebenfalls pharmakologisch wirksamen Stoff 4-Aminoantipyrin (**AA**; CAS-Nr. 83-07-8) und zu dem inaktiven 4-Formylaminoantipyrin (**FAA**; CAS-Nr. 1672-58-8) metabolisiert. Aus 4-Aminoantipyrin entsteht ein weiterer nicht aktiver Metabolit, das 4-Acetylaminoantipyrin (**AAA**; CAS-Nr. 83-15-8).

Tests zur ökotoxikologischen Wirkung auf Wasserorganismen liegen bisher nur für die Muttersubstanz Metamizol und für die beiden Metaboliten AAA und FAA vor.

Die MAC-QS_{freshwater,eco} wird aus den Ergebnissen der Akuttests aus drei Trophie-Ebenen ermittelt. Die Daphnien waren mit einem EC₅₀-Wert von 13,5 mg/L gegenüber AA die empfindlichsten getesteten Organismen.

Es liegen keine Langzeitergebnisse zur chronischen Wirkung von AA auf Fische vor. Nachdem nicht ausgeschlossen werden kann, dass Fische am empfindlichsten reagieren, wird auf die Ableitung eines AA-EQS verzichtet. Aus den vorliegenden chronischen Testergebnissen mit Daphnien und Algen wird somit lediglich ein vorläufiger AA-QS abgeleitet.

Tabelle 10: Qualitätsstandards für 4-Aminoantipyrin

	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [mg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger QS [µg/L]
MAC-QS _{freshwater,eco}	Daphnia, EC ₅₀	13,5	100	135
AA-QS _{freshwater,eco}	Daphnia, EC ₁₀	0,08	50	1,6

Gesamtbeurteilung:

AA wurde in Flüssen in Konzentrationen bis zu 350 ng/L nachgewiesen. Der vorläufig abgeleitete QS von 1,6 µg/L liegt im Bereich dieser Umweltkonzentration. Nachdem aufgrund fehlender Daten zum chronischen Fischtest nicht ausgeschlossen werden kann, dass Fische empfindlicher auf AA reagieren, lässt sich eine weitere Beeinträchtigung der aquatischen Biozönose durch AA nicht ausschließen.

Das toxische Potenzial von AA liegt mehr als das 1.000-fache über dem der anderen Metaboliten AAA und FAA, die als pharmakologisch unwirksam eingestuft werden.

Die ausführliche Version des Datenblattes ist im Anhang bereitgestellt.

2.3.11 Datenblatt Oxipurinol (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Oxipurinol

Oxipurinol (CAS-Nr. 2465-59-0) ist der aktive Hauptmetabolit des Arzneistoffes Allopurinol, der z. B. bei Gicht verschrieben wird. Die Muttersubstanz und der Metabolit hemmen die Harnsäurebildung.

Untersuchungen zur ökotoxikologischen Wirkung auf Wasserorganismen lagen bislang nur für die Muttersubstanz Allopurinol vor.

Die MAC-QS_{freshwater,eco} wird aus den Ergebnissen der Akuttests aus drei Trophie-Ebenen ermittelt. Die EC₅₀-Werte der Akuttests liegen über den eingesetzten Testkonzentrationen. Für die Ableitung der MAC-QS_{freshwater,eco} wurde der E_rC₅₀ des Algentests herangezogen, basierend auf der höchsten Testkonzentration. Der Endpunkt „Yield“ (E_yC₅₀) im Algentest wurde nicht berücksichtigt, da dieser nach TGD-EQS wenig relevant ist.

Zur Ableitung der AA-QS_{freshwater,eco} liegen Langzeitergebnisse zur chronischen Wirkung von Oxipurinol aus zwei Trophie-Ebenen vor. Am empfindlichsten waren die Daphnien mit einem EC₁₀ von 0,7 mg/L. Auf Grundlage der vorliegenden Daten wurde der Qualitätsstandard nach TGD-EQS abgeleitet.

Tabelle 11: Qualitätsstandards für Oxipurinol

	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC-QS _{freshwater,eco}	Alge, E _r C ₅₀	60000	100	600
AA-QS _{freshwater,eco}	Daphnia, EC ₁₀	700	50	14

Gesamtbeurteilung:

Laut Literatur wird Oxipurinol in Oberflächengewässern in Konzentrationen bis 22 µg/L gefunden. Bei einem AA-QS_{freshwater,eco} von 14 µg/L kann eine Beeinträchtigung der Gewässerbiozönose in Einzelfällen nicht ausgeschlossen werden (Ableitung mit einem SF 50 aufgrund des fehlenden chronischen Fischtests).

Zum chronischen Fischtest liegen keine Daten vor. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass Fische empfindlicher reagieren als die bislang untersuchten Organismen.

Oxipurinol ist eine ionisierbare Substanz, d. h. die Toxizität ist abhängig vom pH-Wert. Die am LfU durchgeführten Toxizitätstests lagen im neutralen bis schwach alkalischen Bereich.

Aufgrund der hohen Verbrauchsmengen von Allopurinol sollte die Belastung von Oberflächengewässern mit dem Metaboliten Oxipurinol weiterhin im Monitoring überwacht werden.

Die ausführliche Version des Datenblattes ist im Anhang bereitgestellt.

2.3.12 Datenblatt Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid

Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid (CAS-Nr. 4009-98-7) ist ein Reaktionspartner, welcher bei der Wittig-Reaktion umgesetzt wird. Dabei handelt es sich um eine organisch-chemische Reaktion, die der Knüpfung von C=C-Bindungen dient und nach ihrem Entdecker Georg Wittig benannt ist. Mit ihr lassen sich Carbonylverbindungen (Aldehyde oder Ketone) mit Phosphoryliden unter Substitution des Carbonylsauerstoffs zu Alkenen olefinieren. Als Nebenprodukt der Reaktion entsteht Triphenylphosphinoxid.

Die MAC-QS_{freshwater,eco} wird aus den Ergebnissen der Akuttests aus drei Trophie-Ebenen ermittelt. Die Daphnien waren mit einem EC₅₀-Wert von 1,06 mg/L die empfindlichsten Organismen.

Zur Ableitung der AA-QS_{freshwater,eco} liegen Langzeitergebnisse zur chronischen Wirkung von Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid für drei Arten aus zwei Trophie-Ebenen vor. Lemna war mit einem NOEC von 0,1 mg/L die empfindlichste Spezies.

Tabelle 12: Qualitätsstandards für Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid

	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC _{freshwater,eco}	Daphnia, EC ₅₀	1060	100	10,6
AA-QS _{freshwater,eco}	Lemna, NOEC	100	50	2

Aus den vorliegenden Toxizitätsdaten wurde ein AA-QS_{freshwater,eco} von 2 µg/L für Methoxymethyltriphenylphosphoniumchlorid abgeleitet. Im Rhein wurden laut BfG Maximalkonzentrationen von 0,6 µg/L nachgewiesen. Die Konzentration des Stoffes im Gewässer ist starken Schwankungen unterworfen. Eine Überschreitung der vorgeschlagenen Qualitätsnorm ist somit nicht auszuschließen und insbesondere an den Einleitungsstellen zu erwarten.

Neuere Daten der BfG zeigen, dass selbst in den Tagemischproben der IKS-R-Messstelle Koblenz über mehrere Tage Konzentration von 0,9 µg/L auftreten können. Hierbei ist zu beachten, dass in Koblenz die Substanz im Rhein bereits im Querprofil voll durchmischt wurde, da die Einträge schon vor Mainz erfolgten. Aufgrund der großen Wassermenge in Koblenz von ca. 1500-1800 m³/s ist an den industriellen Einleitungsstellen mit noch weit höheren Konzentrationen zu rechnen.

Da es sich um eine Industriechemikalie handelt, sind Belastungen nur an solchen Gewässern zu erwarten, in welche Abwässer aus der chemischen Industrie eingeleitet werden. Die starken Fluktuationen in der Gewässerbelastung treten durch Schwankungen im Produktionsprozess auf. Aufgrund der punktuellen Belastungsquellen wäre es möglich, Maßnahmen an den einleitenden Kläranlagen aus der chemischen Industrie zu ergreifen, um dort die jährliche Eintragsfracht dieses Stoffes zu minimieren.

In Abbautests wurde der Stoff als nicht biologisch abbaubar eingestuft (ECHA 2016). Ob der Stoff als persistent und/oder bioakkumulierbar eingestuft werden muss, lässt sich nicht abschließend klären. Zum chronischen Fischtest liegen keine Daten vor. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass Fische empfindlicher reagieren als die bislang untersuchten Organismen.

2.3.13 Datenblatt Desethylterbutryn und Terbutryn-Sulfoxid (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von Desethylterbutryn und Terbutryn-Sulfoxid

Desethylterbutryn (M1; CAS-Nr. 30125-65-6) ist ein Transformationsprodukt der Biozide Cybutryn (Irgarol®) und Terbutryn. Terbutryn-Sulfoxid (CAS-Nr. 82985-33-9) ist ein weiteres Transformationsprodukt von Terbutryn. Diese Stoffe wirken als Aufwuchshemmer und werden oder wurden als algizide Wirkstoffe u.a. in Fassadenfarben und Bootsanstrichen eingesetzt. Sie hemmen die Photosynthese und sind deshalb sehr toxisch für alle höheren Pflanzen und Algen.

Eine Vielzahl an ökotoxikologischen Untersuchungen zeigt die Toxizität und Persistenz von Cybutryn und Terbutryn auf. Über die Wirkung von Desethylterbutryn und Terbutryn-Sulfoxid ist dagegen wenig bekannt, ähnlich toxische Eigenschaften wie die der Muttersubstanz werden jedoch vermutet.

Der MAC-QS_{freshwater,eco} wird aus den Ergebnissen der Akuttests aus drei Trophie-Ebenen ermittelt. Die Ableitung für Desethylterbutryn erfolgte mit dem E_rC₅₀ aus dem Algentest. Der Endpunkt „Yield“ wurde nicht berücksichtigt, da dieser nach TGD-EQS weniger relevant ist. Auf die Ableitung eines MAC-QS_{freshwater,eco} für Terbutryn-Sulfoxid wird verzichtet, da der Wert errechnet mit einem SF 100 unter dem AA-QS_{freshwater,eco} liegen würde.

Zur Ableitung des AA-QS_{freshwater,eco} liegen für Desethylterbutryn Langzeitergebnisse zur chronischen Wirkung auf Spezies aus zwei Trophie-Ebenen vor. Am empfindlichsten waren die Algen mit einem E_rC₁₀ von 11 µg/L. Die Algentoxizität von Terbutryn-Sulfoxid ist über Faktor 100 geringer als diejenige von Desethylterbutryn. Die Ableitung des AA-QS wurde trotz eines fehlenden chronischen Daphnientests mit einem SF 50 durchgeführt, da im akuten Daphnientest ähnlich hohe EC-Werte wie bei Desethylterbutryn berechnet wurden und die Algen daher mit großer Wahrscheinlichkeit die empfindlichste Spezies darstellen.

Tabelle 13: Qualitätsstandards für Desethylterbutryn und Terbutrynsulfoxid

Desethylterbutryn	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC-QS _{freshwater,eco}	Alge, E _r C ₅₀	77	100	0,77
AA-QS _{freshwater,eco}	Alge, E _r C ₁₀	11	50	0,22
Terbutryn-Sulfoxid	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [µg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [µg/L]
MAC-QS _{freshwater,eco}				
AA-QS _{freshwater,eco}	Alge, E _r C ₁₀	1540	50	30

Gesamtbeurteilung:

Bei der Abschätzung der chronischen Toxizität zeigt ein AA-QS_{freshwater,eco} von 0,22 µg/L für Desethylterbutryn bzw. von 30 µg/L für Terbutryn-Sulfoxid, dass die Transformationsprodukte weniger toxisch sind als die Muttersubstanzen Terbutryn (AA-QS 0,065 µg/L) und Cybutryn (AA-QS 0,0017 µg/L). In Oberflächengewässern liegen die gemessenen Maximalkonzentrationen für Desethylterbutryn (0,6 µg/L) um ca. eine Zehnerpotenz und für Terbutryn-Sulfoxid (0,034 µg/L) um ca. zwei Zehnerpotenzen unter den Werten der beiden Muttersubstanzen. Die höchsten gemessenen Konzentrationen von Desethylterbutryn in Oberflächengewässern

überschreiten jedoch die abgeleitete AA-QS_{freshwater,eco}. Nach der vorliegenden Datenlage sind Desethylterbutryn sowie Terbutryn und Cybutryn als gewässerrelevant einzustufen. Bislang liegen sehr wenige Monitoringdaten zu Desethylterbutryn vor, d. h. für eine abschließende Risikobewertung sollte diese Substanz im Gewässermonitoring beobachtet werden.

Für Desethylterbutryn und Terbutryn-Sulfoxid liegen keine Daten zum chronischen Fischtest vor. Nachdem bei den Muttersubstanzen die chronische Fischtoxizität um mehr als das 100-fache geringer ist als die Algentoxizität, ist es unwahrscheinlich, dass Fische empfindlicher reagieren als die bislang untersuchten Organismen.

Die Ergebnisse von Burkhardt et al. (2011)* zeigen, dass große Mengen an Additiven in Fassadenanstrichen verwendet und bei Regenereignissen ausgewaschen werden. Eine Abschätzung der allgemeinen ökotoxikologischen Schadwirkung ist schwierig, weil hier neben der Anzahl der Regenereignisse viele Faktoren eine Rolle spielen. So ist das Altersprofil der Gebäude im Einzugsgebiet wie auch Fläche, Material-, Konzentrations- und Substanzeigenschaften der Fassaden von ausschlaggebender Bedeutung für die Biozidkonzentrationen in Regenabflüssen.

Laut Umweltbundesamt belegen solche Ergebnisse, dass eine weitergehende Entlastung der Gewässer notwendig ist und die Biozideinträge, die von Antifouling-Beschichtungen und/oder Fassadenanstrichen ausgehen, weiter reduziert werden müssen. Biozidfreie Alternativen wie Antihafbeschichtungen, selbstpolierende Beschichtungen, mechanische Reinigungssysteme, elektrochemische Methoden und Systeme, die z. B. mit Ultraschall dem „Fouling“ entgegenwirken, sollten zukünftig bevorzugt werden.

* Burkhardt, M., Zuleeg, S., Vonbank, R., Schmid, P., Hean, S., Lamani, X., Bester, K., Boller, M. 2011. Leaching of additives from construction materials to urban storm water runoff. Wat. Sci. Technol. 63, 1974-1982

2.3.14 Datenblatt 1,4-Dioxan (Kurzfassung)

Vorschlag für einen Umweltqualitätsstandard EQS (environmental quality standard) für die Bewertung der Gewässerrelevanz von 1,4-Dioxan

1,4-Dioxan (CAS-Nr. 123-91-1) ist ein zyklischer Ether, welcher als Industriechemikalie weitreichende Verwendung findet. Da der Stoff relativ inert ist und sich gut in Wasser löst, wird er in vielen Produktionsschritten als Lösungsmittel eingesetzt.

Zu 1,4-Dioxan gibt es eine Vielzahl von Biotestdaten, die seine relativ geringe toxische Wirkung nachweisen. Anhand dieser Testergebnisse wurde 2002 ein European Union Risk Assessment Report der Europäischen Kommission erstellt. Demnach besteht kein Bedarf an weiteren Informationen und/oder Tests sowie an Risikoabschätzungen, welche über die bereits gewonnenen hinausgehen.

Tabelle 14: Qualitätsstandards für 1,4-Dioxan

	relevante Studie	niedrigste eingesetzte Konzentration [mg/L]	Sicherheitsfaktor	vorläufiger EQS [mg/L]
MAC-QS _{freshwater, eco}	AA-QS übernommen			57,5
AA-QS _{freshwater, eco}	Cyanobakterien, NOEC	575	10	57,5

Gesamtbeurteilung:

Für Wasserorganismen besteht durch 1,4-Dioxan nach derzeitigem Kenntnisstand bei einem AA-QS_{freshwater, eco} von 57,5 mg/L kein Risiko. Die in Oberflächengewässern gefundenen Konzentrationen reichen bis in den einstelligen µg/L-Bereich und liegen damit über Faktor 1.000 unter dem AA-QS. Nach dem European Union Risk Assessment Report werden vorläufig keine weiteren Informationen und/oder Prüfungen oder andere als die bereits ergriffenen Risikobegrenzungsmaßnahmen für notwendig erachtet.

Die toxikologische Bewertung des Umweltbundesamtes für Trinkwasser sieht einen Leitwert für die lebenslange Aufnahme von 5 µg/L vor. Nach der US-EPA liegt ein Verdacht auf ein krebserregendes Potenzial vor (IARC, Gruppe 2B). Betroffen sind vor allem Regionen, deren Trinkwasser aus Oberflächengewässern bzw. Uferfiltraten gewonnen wird.

Kontaminiertes Abwasser spezieller Betriebe sollte überprüft und gemeinsam Strategien zur Vermeidung erarbeitet werden. Für Stoffe wie 1,4-Dioxan, die in herkömmlichen Kläranlagen nicht abgebaut werden können, sollte untersucht werden, welche weiterführenden Reinigungsstufen hier Abhilfe schaffen könnten.

3 Teilprojekt B: chronische Fischtoxizität von Metformin und Guanylurea

3.1 Hintergrund

Zahlreiche chemische Substanzen, darunter auch Human- und Tierarzneimittel, werden in Kläranlagen nicht vollständig abgebaut und gelangen, meist in geringen Mengen, mit dem gereinigten Abwasser in die Oberflächengewässer. Zur Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie (2000/60/EG) sind in der Oberflächengewässerverordnung (OGewV) für neue, flussgebietsspezifische Schadstoffe Umweltqualitätsnormen festzulegen. Die Ableitung der Normen richtet sich nach Anhang V, 1.2.6 der Richtlinie und ist umfassend in der CIS-Leitlinie Nr. 27 „Deriving Environmental Quality Standards“ (TGD EQS) beschrieben. Zur Ermittlung der Umweltgefährlichkeit dieser chemischen Verbindungen werden in der Regel Daten aus ökotoxikologischen Standardtests herangezogen. Die akute und chronische Toxizität wird dabei üblicherweise anhand standardisierter Biotests an aquatischen Organismen verschiedener Trophie-Ebenen, darunter auch Fischen, erfasst. Nicht immer sind die dabei erhobenen Wirkungsdaten (z.B. Mortalität) ausreichend sensitiv, um eine mögliche Beeinträchtigung der Fischgesundheit sicher zu ermitteln. Histopathologische Untersuchungen an Fischen haben sich neben hämatologischen, klinisch-chemischen und Biomarker-Untersuchungen als sensibles Instrument zum Nachweis subletaler Schadstoffwirkungen erwiesen. Im Rahmen von Untersuchungen zur Fischtoxizität des Arzneimittelwirkstoffes Diclofenac wurde gezeigt, dass die Anwendung quantitativ-morphologischer Untersuchungsmethoden der Morphometrie bzw. Stereologie eine objektive Quantifizierung histopathologischer Veränderungen ermöglicht (Birzle 2015). Hierdurch werden die Daten einer statistischen Auswertung zugänglich gemacht, auf deren Basis ökotoxikologische Schwellenwerte, wie z.B. NOEC (No Observed Effect Concentration), abgeleitet werden.

Diese Methoden sollen nun zur Bewertung der Gefährlichkeit, der in der aquatischen Umwelt nachgewiesenen Verbindungen Metformin und Guanylurea Anwendung finden. Das Antidiabetikum Metformin wird beim Menschen vorwiegend für die Behandlung von Typ-2 (nicht-insulinabhängigem) Diabetes mellitus eingesetzt (Talaulikar et al. 2016; Reitman und Schadt 2007). Die Nebenwirkungen des Wirkstoffes bestehen häufig in gastrointestinalen Beschwerden. Darüber hinaus wird sehr selten u.a. das Auftreten einer Laktatazidose, Leukopenien und Thrombopenien beschrieben (Anonym 2018). Metformin ist eines der am häufigsten verschriebenen Arzneimittel in Deutschland mit steigender Tendenz (Kümmerer et al. 2009). Im Jahr 2018 wurde der Wirkstoff in deutschen Apotheken in einer Menge von 1.624 Tonnen abgegeben (Schwabe et al. 2019). Im Menschen wird Metformin nicht metabolisiert, sondern unverändert über die Nieren ausgeschieden (Graham et al. 2011), sodass die gesamte eingesetzte Arzneimitteldosis in das Abwasser gelangt. Bei der Aufbereitung des Abwassers im Klärwerk entsteht als wesentliches, aerob-bakterielles Transformationsprodukt Guanylurea (Tisler und Zwiener 2019; Trautwein et al. 2011). Sowohl Metformin, als auch Guanylurea sind in der aquatischen Umwelt stabil (LANUV 2015; Trautwein et al. 2011). Dementsprechend wurden in Kläranlagenabflüssen in Deutschland hohe Konzentrationen von bis zu 39 µg/L Metformin (Baden-Württemberg) und bis zu 160 µg/L Guanylurea (Baden-Württemberg) nachgewiesen (LUBW 2014). In deutschen Oberflächengewässern lagen die Konzentrationen bei bis zu 4,4 µg/L Metformin (bis zu 35 µg/L in der Emscher) (LANUV 2015) und bis zu 32 µg/L Guanylurea (Fluss Glens) (LUBW 2014). In Studien zu Metformin ergaben Biotests als niedrigste akute Effektkonzentration eine EC_{50/48h} (Immobilisierung bei 50 % der Testorganismen nach 48 h) von 64 mg/L beim großen Wasserfloh (*Daphnia magna*) (Cleuvers 2003). Die niedrigste

chronische Effektkonzentration wurde bislang mit $\geq 7,8$ mg/L (NOEC nach 32 Tagen, Endpunkt unbekannt) bei der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) nachgewiesen (Moermond und Smit 2015). Aktuelle Studien weisen jedoch auf eine estrogenische Wirkung von Metformin in Form einer erhöhten Expression endokrinologisch relevanter Gene bei juvenilen Fischen ab 1 $\mu\text{g/L}$ (Crago et al. 2016) bzw. bei adulten Individuen nach Exposition in 40 $\mu\text{g/L}$ (Niemuth et al. 2015), sowie populationsrelevante Auswirkungen (verringerte Reproduktionsleistung) und qualitativ histologisch nachweisbare Veränderungen des Hodengewebes bereits bei einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/L}$ hin (Niemuth und Klaper 2015). Allerdings kommt den Studien nur eine begrenzte Aussagekraft zu. Nur in einer Studie werden den beobachteten Effekten auf der Ebene der Genexpression populationsrelevante Veränderungen in Form einer verminderten Reproduktionsleistung gegenüber gestellt (Niemuth et al. 2015). Diese Daten sind jedoch aufgrund methodischer Schwachstellen bei der Versuchsdurchführung (semi-statische Exposition, geringe Tierzahlen) sowie der Untersuchung nur einer Testkonzentration (40 $\mu\text{g/L}$) zur Ableitung von Umweltqualitätsnormen ungeeignet (Anonym 2016). Vor dem Hintergrund, dass zurzeit über die Festlegung einer Umweltqualitätsnorm für Metformin diskutiert wird, ist die fundierte Überprüfung der aktuellen Hinweise auf einen potentiellen endokrin disruptiven Effekt von Metformin unerlässlich (LANUV 2015; Anonym 2016; Sumpter et al. 2016).

Da die Toxizität von Guanylurea für Fische bislang kaum untersucht worden ist, besteht zur Ermittlung eines validen Gesamtbildes, insbesondere auf Grund einer weitaus höheren Expositionsrelevanz im Vergleich zur Muttersubstanz, die Notwendigkeit einer gleichwertigen, zeitnahen Untersuchung von Guanylurea i.R. eines Expositionsversuches mit Fischen (Anonym 2016).

Zum Nachweis schädlicher Wirkungen von Arzneimittelwirkstoffen auf die aquatische Umwelt haben sich histopathologische Untersuchungen an Fischen als die Methode der Wahl erwiesen (Hinton et al. 1992; Hinton und Laurén 1990; Schwaiger et al. 1997; Schwaiger et al. 2000), da diese Substanzen spezifische, auf den Wirbeltierorganismus ausgerichtete Wirkungen entfalten. Dies gilt in besonderem Maße für endokrin wirksame Substanzen (Schwaiger et al. 2000; Johnsen et al. 2009). Zur Untersuchung von endokrin disruptiven Eigenschaften von chemischen Substanzen bei Fischen wurden außerdem in den vergangenen Jahren verschiedene Biomarker, insbesondere Vitellogenin (VTG), etabliert (Chen 1983; Thorpe et al. 2000; Tyler et al. 2002). Bei VTG handelt es sich um einen Vorläufer des Dotterproteins, welches von Hepatozyten gebildet wird und über den Blutstrom zum Ovar gelangt. VTG wird physiologisch nur unter Einwirkung von Estrogenen, und damit im Wesentlichen von Weibchen produziert. Männchen verfügen jedoch ebenfalls über Gene für die Synthese von VTG und die für die Regulation der VTG-Konzentration wichtigen Estrogen-Rezeptoren. Daher können männliche Fische nach Exposition mit Xenestrogenen eine Hochregulation der VTG-mRNA mit einem Anstieg von VTG im Blutplasma zeigen (Fent 2013). Eine Induktion von VTG bei Regenbogenforellen durch eine estrogenische Aktivität von chemischen Substanzen wurde bereits sowohl *in vitro* (z. B. bei Zellkulturen von Hepatozyten) (Jobling und Sumpter 1993), *in vivo* in Laborversuchen (Schwaiger et al. 2002; Thorpe et al. 2000), als auch bei Feldstudien nachgewiesen (Harries et al. 1999; Harries et al. 1997).

Im Rahmen der Studie wurden daher chronische, toxische Effekte sowie endokrine Wirkungen der Muttersubstanz Metformin (Teilversuch Nr. 2) sowie der Tochtersubstanz Guanylurea (Teilversuch Nr. 1) auf subadulte Regenbogenforellen untersucht (Versuchsdesign angelehnt an die frühere OECD Guideline 204). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass Regenbogenforellenlarven zwischen dem 44. und dem 51. dpf (Tage nach der Fertilisation) sehr empfindlich auf einen Einfluss exogener, hormonell wirksamer Substanzen reagieren. In diesem Alter kann eine Exposition mit Xenestrogenen zu einer Störungen der

Geschlechtsdifferenzierung (Krisfalusi und Nagler 2000) sowie zur Entwicklung intersexuellen Hodengewebes (Ovotestis) führen (Depiereux et al. 2014). Um eine diesbezügliche Wirkungsweise von Metformin abzuklären, wurden in einem weiteren Teilversuch (Nr. 3) zudem juvenile Regenbogenforellen ab einem Alter von 44 dpf auf endokrine disruptive Effekte durch eine Langzeit Exposition (94 Tage) mit Metformin hin untersucht.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Herkunft und Haltung der Versuchsfische

Alle Versuchsfische stammten aus der institutseigenen Fischzucht des Bayerischen Landesamtes für Umwelt (LfU) an der Dienststelle Wielenbach und wurden unter kontrollierten Bedingungen aufgezogen. Die Erlaubnis für das Züchten beziehungsweise Halten von Wirbeltieren, die zu Versuchszwecken verwendet werden, wurde vom zuständigen Landratsamt Weilheim-Schongau erteilt (AZ: 51-4402-9621 vom 24.03.2003). Das Forschungsvorhaben wurde von der zuständigen Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-18-2017). Für die drei Versuche wurden Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) unterschiedlicher Altersgruppen eingesetzt. Die Aufzucht der Fische erfolgte in Wielenbacher Quellwasser. Die chemisch-physikalischen Parameter des Quellwassers wurden mittels Online-Messsonden kontinuierlich überwacht. Eine Übersicht über die chemisch-physikalischen Wasserparameter wird im Anhang B.1 in Tabelle 28 (unbehandeltes Quellwasser) und Tabelle 29 (Bruthaus) dargestellt. Die chemisch-physikalische Beschaffenheit des Quellwassers erfüllt die Qualitätskriterien zur Haltung von Salmoniden (Hochleithner 2001).

► Subadulte Regenbogenforellen (Teilversuche Nr. 1+2)

Die subadulten Regenbogenforellen wurden bis zum Versuchsbeginn im Alter von 21 Monaten (Teilversuch Nr. 1, Testsubstanz: Guanyldurea) beziehungsweise 17 Monaten (Teilversuch Nr. 2, Testsubstanz: Metformin) unter extensiven teichwirtschaftlichen Bedingungen in Betonteichen mit den Maßen 25 x 2,5 x 1 m gehalten. Die Becken wurden mit Wielenbacher Quellwasser (Durchflussrate ca. 4 L/s) gespeist. Für den Teilversuch Nr. 1 wurden Sommerlaicher, für den Teilversuch Nr. 2 Winterlaicher verwendet.

► Juvenile Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 3)

Für den Teilversuch Nr. 3 (Testsubstanz: Metformin) wurden Regenbogenforellenlarven (Winterlaicher) im Alter von 44 dpf (Tage nach der Fertilisation) verwendet. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Fischlarven im Bruthaus der Teichanlage in Wielenbach gehalten. Die Erbrütung erfolgte in sogenannten „Unterstromkästen“, in welchen sich circa 5.000 Eier pro Kasten befanden. Die Kästen (46 x 46 x 16 cm) waren in Langstromrinnen (360 x 47 x 17 cm) mit einem Durchfluss von 250 mL Quellwasser/s eingehängt. In der Fischcharge, aus der die späteren Versuchsfische entnommen wurden, betrug die Befruchtungsrate 97,3 %, die Schlupfrate 96,4 %.

3.2.2 Voruntersuchungen bei den Versuchsfischen

► Gesundheitskontrolle der Versuchsfische

Für die Teilversuche Nr.1 (Guanyldurea) und Nr. 2 (Metformin) wurden im April 2017 ($n = 20$) sowie März 2018 ($n = 15$) Voruntersuchungen an Fischen der Chargen, aus welchen die Versuchsfische ausgewählt wurden, durchgeführt. Im Rahmen der Voruntersuchungen wurde der Gesundheitszustand der Versuchsfische anhand von klinischen, pathologisch-anatomischen, parasitologischen sowie histopathologischen Untersuchungen kontrolliert. Bei den juvenilen Regenbogenforellen für den Teilversuch Nr. 3 (Metformin) erfolgte eine Überprüfung des Gesundheitszustands mittels klinischer Untersuchung.

► Geschlechtsbestimmung der Versuchsfische

Vor Versuchsbeginn erfolgte bei den Teilversuchen Nr. 1 und 2 zudem eine Geschlechtsbestimmung der Versuchsfische. Mittels makroskopischer Begutachtung ist bei subadulten Regenbogenforellen noch keine eindeutige Bestimmung sekundärer Geschlechtsmerkmale zur Unterscheidung der beiden Geschlechter möglich. Zudem findet ein individuell unterschiedlicher Eintritt in die Geschlechtsreife statt. Männliche Regenbogenforellen werden überwiegend im zweiten, zu einem geringen Anteil jedoch erst im dritten Lebensjahr geschlechtsreif (Nævdal et al. 1981). Eine zweifelsfreie Identifikation von männlichen Tieren, welche im zweiten Lebensjahr die Geschlechtsreife erreichen, ist bei subadulten Fischen noch nicht möglich. Dementsprechend setzten sich die männlichen Versuchsfische sowohl aus Tieren, die im zweiten Lebensjahr (pubertär), als auch Individuen, die erst im dritten Lebensjahr (präpubertär) geschlechtsreif werden zusammen. Bei Letzteren weist das juvenile Hodengewebe noch ein deutlich früheres Entwicklungsstadium auf (rosa Färbung des Hodens, filamentartige Struktur nach Billard 1992).

Die Identifikation des Geschlechts der Fische erfolgte im Jahr 2017 (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea) anhand der Vitellogenin (VTG)-Konzentration im Blut. Unter Narkose mit MS 222 (Tricain-Methansulfonat, Pharmaq, UK; Dosierung: 100 mg/L Wasser) wurde hierzu aus der *Vena cava* (hinteren Hohlvene) nahe des Schwanzstiels jeweils 1 mL Blut entnommen. Im dem darauffolgenden Teilversuch Nr. 2 (Metformin) wurde eine genetische Geschlechtsbestimmung anhand einer mittels sterilem Einmalbesteck entnommenen Biopsie der Rückenflosse durchgeführt. Die beiden verwendeten Methoden werden nachfolgend erläutert:

- Geschlechtsbestimmung anhand der Vitellogenin-Konzentrationen

Vitellogenin stellt einen Eiweißstoff dar, der unter physiologischen Bedingungen nur von weiblichen Fischen unter Östrogeneinfluss in der Leber gebildet wird (Bon et al. 1997). Als Vorstufe des Dotterproteins wird VTG in die heranreifenden Eier eingebaut und dient dort der Versorgung der Embryonen mit Nährstoffen (Mommensen und Walsh 1988). Vitellogenin ist in geringem Umfang in weiblichen Fischen bereits lange vor der Laichreife nachweisbar (Copeland et al. 1986). Somit können anhand der VTG-Konzentration im Blutplasma bereits im juvenilen Stadium männliche von weiblichen Tieren unterschieden werden.

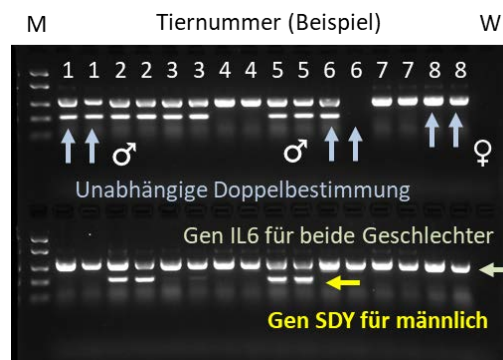
Die Vitellogenin-Bestimmung erfolgte wie unter Punkt 3.2.9 beschrieben durch einen nicht-kompetitiven Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Dieser Test ermöglicht über eine spezifische Antikörper-Bindungsreaktion einen quantitativen Nachweis von VTG. Als Männchen wurden Fische mit einer VTG-Konzentration < 100 ng/mL, als Weibchen Individuen mit einer VTG-Konzentration oberhalb der oberen Nachweisgrenze (> 4.000 ng/mL bei Verdünnung von 1:20) eingestuft. Fische mit VTG-Konzentrationen zwischen 100-4.000 ng/mL wurden als nicht beurteilbar eingestuft und nicht für die Versuche verwendet.

- Genetische Geschlechtsbestimmung

Die genetischen Geschlechtsbestimmungen wurden vom Institut für Genombiologie des Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie, Dummerstorf, Deutschland durchgeführt. Hierfür wurde DNA aus dem Flossengewebe mittels DNeasy® Blood & tissue kit (Qiagen) gemäß Herstelleranweisung isoliert und in einer Verdünnung von 50-100 mg/μL pro Probe aufbereitet. Basierend auf der genomischen DNA der Regenbogenforellen erfolgte anschließend eine Duplex-PCR mit DNA-Primern (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) für die

Gene *IL6* (Interleukin 6) (Zante et al., 2015) sowie *SDY* (Sex determinierendes Gen Y) (Yano et al. 2012) (Tabelle 30 und Tabelle 31 im Anhang B.2). Während *IL6* (492 Bp) sowohl von männlichen als auch weiblichen Tieren exprimiert wird, findet sich das *SDY*-Gen (220 Bp) nur in rein männlichen Individuen (Abbildung 1). Die Primersequenzen und die genomischen DNA-Fragmente, von denen die Primerableitung für die PCR erfolgte, sind in Tabelle 31 im Anhang B.2 beschrieben. Für die PCR wurde der HotStarTaq DNA Polymerase Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte in einem Biometra TAdvanced PCR-Cycler (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland). Die amplifizierten DNA-Sequenzen wurden durch Gelelektrophorese unter Verwendung eines 2 %tigen Agargels nachgewiesen.

Abbildung 1: Darstellung einer Gelelektrophorese für die genetische Geschlechtsbestimmung



Quelle: PD Dr. rer. nat. habil. Tom Goldammer, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie.

► Markierung der Versuchsfische

In den beiden Teilversuchen Nr. 1 und 2 wurden die Versuchsfische zur späteren Identifikation mittels Transponder (Alvet Minitransponder, Henry-Schein) markiert. Die Applikation des Transponders erfolgte unter Narkose mit MS 222 (Tricain-Methansulfonat, Pharmaq, UK; Dosierung: 100 mg/L Wasser) im Zusammenhang mit der Probennahme für die Geschlechtsbestimmung. Der Transponder wurde subkutan lateral (linke Körperseite) zwischen dem hinteren Rand der Kiemendeckel und dem Rückenflossenansatz eingebracht.

3.2.3 Expositionsbedingungen

3.2.3.1 Expositionsanlage

Die Expositionsversuche erfolgten in der ökotoxikologischen Versuchsanlage an der Dienststelle Wielenbach des Bayerischen Landesamtes für Umwelt (Abbildung 2). Zur Exposition der Versuchsfische standen insgesamt sechzehn 600 Liter-Aquarien ohne Bodengrund zur Verfügung, denen im Durchfluss das jeweilige Testwasser kontinuierlich zugeleitet wurde (Durchflussrate 100 L pro Stunde). Für die Expositionsversuche wurde aufbereitetes Wielenbacher Quellwasser verwendet. Vor Eintritt in die Versuchsanlage wurde das Quellwasser zur Entgasung über eine Wasserkaskade aus Lochblech geleitet. In der Versuchsanlage erfolgte eine Aufbereitung und Entsalzung des Quellwassers mittels Umkehrosmose (Typ 1, Milli-Q Filteranlage, Merck, Deutschland) (Abbildung 3). Das behandelte Wasser wurde nachfolgend in einem 2.000 L Vorratstank in einem Verhältnis von 1/1 v/v mit unbehandeltem Wielenbacher Quellwasser vermischt um eine Leitfähigkeit von 200 µS/cm zu erreichen.

Abbildung 2: Ökotoxikologischen Expositionsanlage der Dienststelle Wielenbach



Alle drei Teilversuche wurden in der ökotoxikologischen Expositionsanlage der Dienststelle Wielenbach durchgeführt. In dieser stehen 16 Aquarien mit Messsystemen und Dosiereinheiten für die Testsubstanzen zur Verfügung.
Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Aus dem Vorratstank wurden alle 16 Versuchsaquarien mit Testwasser versorgt, wobei im Zufluss eine kontinuierliche Überprüfung von Temperatur, Leitfähigkeit und pH-Wert mittels Online-Messsonden erfolgte (pH-Wert und Wassertemperatur Sonde Sensolyt 700, Leitfähigkeit Sonde TetraCon 700 IQ, alles gekoppelt an das Datenerfassungssystem IQ-Sensornet XT 2020, WTW-Xylem Analytics Germany; Weilheim, Deutschland). Im Ablauf der Aquarien wurde ebenfalls der gelöste Sauerstoff (Sonde FDO 700 IQ; WTW-Xylem Analytics Germany) gemessen. Bei Unterschreitung einer Mindestfüllhöhe im Vorratstank von 500 L, sowie abweichenden Werten für Temperatur, Leitfähigkeit, pH-Wert oder gelöstem Sauerstoff wurde ein automatischer Alarm ausgelöst (Datenerfassungssystem IQ-Sensornet XT 2020, WTW-Xylem Analytics Germany). Zudem erfolgte in jedem Aquarium mindestens 1x pro Woche eine photometrische Bestimmung der Ammonium-Stickstoffkonzentration und eine Berechnung der Ammoniak-Konzentration. Die Wassertemperatur wurde über die Raumtemperatur geregelt und mittels einer Klimaanlage auf ca. 12 °C eingestellt. Jedes Becken war mit einer separaten Belüftung (120 L/min) über die gesamte Beckenlänge ausgestattet, welche neben einer Versorgung mit Sauerstoff auch eine kontinuierliche Durchmischung des Testwassers gewährleistete, sowie eine für Regenbogenforellen günstige Strömung erzeugte (Abbildung 4). Zur mechanischen Reinigung des aus den Aquarien ablaufenden Testwassers war ein Klärbecken nachgeschaltet. Eine Lichtanlage (Teilversuch Nr. 1 + 2: T5 Powerchrome, 400 LUX, 400-750 nm, 1300 – 6000 Kelvin; Teilversuch Nr. 3: 650 LUX, 430-730 nm, 3.500 Kelvin; LED-Aquaristik, Hövelhof, Deutschland) simulierte einen 12-Stunden-Tag mit zusätzlich einer je 30-minütigen Dämmerungsphase morgens und abends.

Abbildung 3: Wasserführung in der ökotoxikologischen Expositionsanlage



- | | | |
|---|--------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Förderpumpe für Quellwasser | 3a + b: Heizungskomponenten | 8. Förderpumpe für Testwasser |
| 2. Enthärtungsanlage mit Komponenten: | 4: Umkehrosmose | 9. Überwachungsmesssonden |
| a + b: Austauschbehälter mit Ionenaustauscherharz | 5. Durchflussregelung Quellwasser | für das Testwasser |
| c: Steuerung | 6. Testwasservorratsbehälter 2.000 L | |
| d: Salzvorratsbehälter | 7a + b: Rührwerk mit Steuerung | |

Dargestellt ist die technische Aufbereitung des Testwassers in der Expositionsanlage in Wielenbach.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Abbildung 4: Technische Ausstattung der Expositionsaquarien



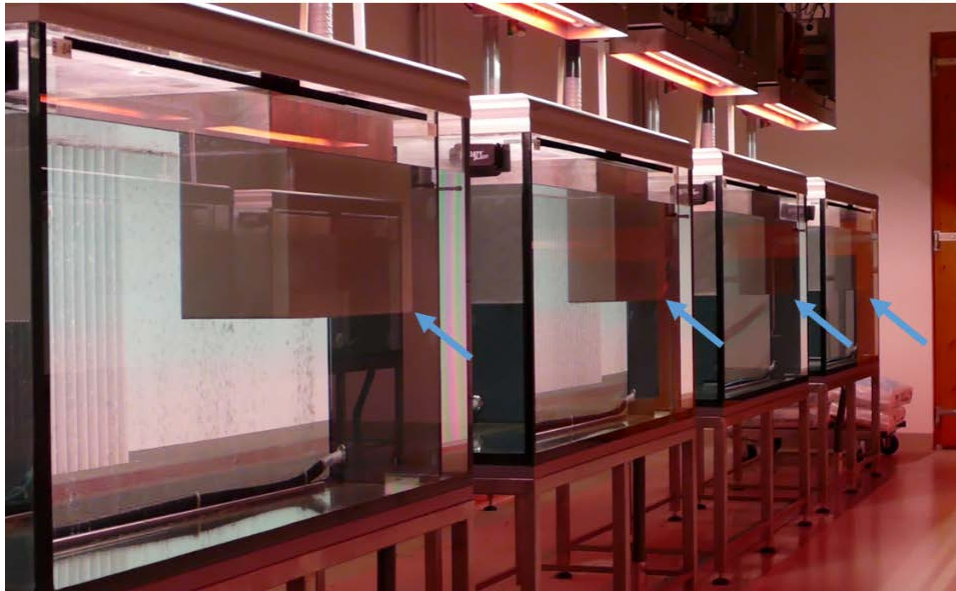
1. Kompressor für Belüftung
2. Edelstahlzulauf aus dem Gesamtsystem
3. Magnetinduktive Durchflussmessung
4. Rührsystem
5. (a) GHP/MET-Stammlösung mit (b) Magnetrührer
6. Dosierpumpe (Kreiseltauernmelkolbenpumpe)
7. Mischbehälter aus Edelstahl
8. Zulauf Testwasser
9. Absaugung
10. Aquarienabdeckung aus Aluminium mit integrierter Beleuchtung
11. Testfische (Regenbogenforellen)
12. Luftausströmer aus Keramik
13. Testwasserablaufkammer mit digital-optischer Messsonde zur Sauerstoff- und Temperaturüberwachung
14. Glasaquarium

Dargestellt ist die technische Ausstattung der 600 L Aquarien in der Expositionsanlage in Wielenbach.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Die 93-tägige Exposition der juvenilen Versuchsfische im Rahmen von Teilversuch Nr. 3 (Metformin) erfolgte ebenfalls in der ökotoxikologischen Versuchsanlage an der Dienststelle Wielenbach. Die geringe Tiergröße der juvenilen Versuchsfische machte eine Modifikation der Versuchsaquarien notwendig. Die Aquarien wurden für diesen Versuch mit speziell angefertigten Einsatzkästen aus gelochtem (2 mm) Edelstahl (39,6 cm x 43,0 cm x 55 cm) ausgestattet (Abbildung 5).

Abbildung 5: Expositionsaquarien mit Edelstahl-Einsätzen für den Teilversuch Nr. 3 (Metformin)



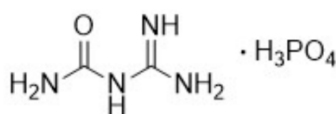
Die 600 L Aquarien der ökotoxikologischen Expositionsanlage in Wielenbach wurden für die juvenilen Regenbogenforellen im Teilversuch Nr. 3 mit Einsätzen aus gelochtem Edelstahl (blaue Pfeile) ausgestattet.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

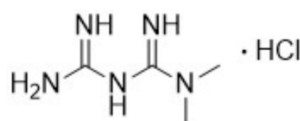
3.2.3.2 Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden Metformin und Guanylhurea eingesetzt. Im Rahmen aller Teilversuche wurde für jedes Testaquarium eine separate Stammlösung der jeweiligen Testsubstanz hergestellt. Während in Teilversuch Nr. 1 Guanylhurea als Testsubstanz zum Einsatz kam (Guanylhurea-Phosphat, CAS-Nr. 36897-89-9, Alfa Aesar, Reinheit > 98 %) wurde in den Teilversuchen Nr. 2 und 3 Metformin eingesetzt (Metformin-HCL, CAS-Nr. 1115-70-4, Sigma Aldrich, Reinheit > 99 %) (Abbildung 6). Die Stammlösungen wurden unter stetiger Durchmischung mittels eines Magnetrührgerätes über eine Pumpe kontinuierlich dem Zulaufwasser beigemischt. Als Expositionskonzentrationen wurden bei allen drei Teilversuchen nominal 0,1, 1, 10, 50, 100, 500 und 1.000 µg/L in jeweils 2 Replikaten A und B verwendet (Spacing-Faktor ≤ 10).

Abbildung 6: Chemische Struktur der Testsubstanzen



Guanylharnstoff-Phosphat



Metformin-HCL

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Die realen Testkonzentrationen wurden in den Teilversuchen Nr. 1 und 2 je viermal im Abstand von 2 Wochen überprüft. Im Teilversuch Nr. 3 wurden die realen Konzentrationen der Testsubstanz Metformin je 13 x überprüft. Der chemische Nachweis der Testsubstanzen im Testwasser erfolgte mittels anreicherungsfreier LC-MS/MS-Analytik (Liquid-Chromatographie-mass spectrometry/mass spectrometry) durch den Zweckverband Landeswasserversorgung, Betriebs- und Forschungslaboratorium in Langenau, Deutschland. Für beide Testsubstanzen lag die Bestimmungsgrenze bei 25 ng/L, die Nachweisgrenze bei 5 ng/L. Die Ergebnisse der Wasseranalysen wurden pro Testkonzentration gemittelt.

3.2.3.3 Besatz der Expositionsaquarien mit den Versuchsfischen

► Teilversuche Nr. 1 (Guanylurea) und 2 (Metformin)

Beim Teilversuch Nr. 2 wurden die subadulten Regenbogenforellen zur Anpassung an die chemisch-physikalischen Wasserparameter des Testwassers 7 Tage vor Versuchsbeginn in die ökotoxikologische Versuchsanlage verbracht und dort in zwei jeweils 3 m³ fassende Rinnen mit einem Durchfluss von 200 L/h gesetzt. Hierfür wurden die Rinnen mit dem Quellwasser aus der ursprünglichen Haltung befüllt und dann bei durchgehender Belüftung über den kontinuierlichen Zulauf von aufbereitetem Testwasser an dessen Wasserqualität angeglichen. Während der Eingewöhnungsphase erfolgte eine kontinuierliche Überprüfung der Leitfähigkeit, des gelösten Sauerstoffs, der Wassertemperatur sowie des pH-Wertes des Wassers in beiden Rinnen. Die Ammonium-Stickstoff-Konzentration wurde 1 x täglich überprüft. Die Fütterung während der Eingewöhnungsphase erfolgte mit kommerziellem Fischfutter (EFICO Alpha 717, 4,5 mm, BioMar A/S, Brande, Dänemark) 1x täglich (0,5 % des Körpergewichts).

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden die Versuchsfische beider Teilversuche in die Testaquarien überführt. Bei beiden Versuchen erfolgte die Zuteilung der verschiedenen Testkonzentrationen und Kontrollansätze zu den jeweiligen Aquarien durch Auslosung. Bei Teilversuch Nr. 1 (Guanylurea) erfolgte die zufällige Zuordnung der Versuchsfische zu den Expositionsaquarien beim Besatz der Becken. Die Versuchsfische in Teilversuch Nr. 2 (Metformin) wurden anhand ihrer Transpondernummer vorab ausgelost und den Versuchsaquarien zugeteilt. Beim Besatz der Aquarien wurden die präexpositionelle Gesamtlänge und das Körpergewicht der Fische bestimmt. Die Besatzdichte betrug 22 Fische pro Aquarium (je 10 ♀ und ♂ Versuchsfische sowie jeweils ein Reservefisch pro Geschlecht). Hieraus ergab sich am Versuchsende im Teilversuch Nr. 1 eine durchschnittliche Biomasse von 15 g/L Testwasser und von 12 g/L im Teilversuch Nr. 2.

► Teilversuch Nr. 3 (Metformin)

Die juvenilen Regenbogenforellen wurden zur Anpassung an die chemisch-physikalischen Wasserparameter des Testwassers am Tag 42 dpf (Tage nach der Fertilisation) in eine 600 m³ fassende Rinne mit einem Durchfluss von 100 L/h in der ökotoxikologischen Versuchsanlage gesetzt. Die Messung der chemisch-physikalischen Wasserparameter erfolgte analog zu der Adaptationsphase bei den Teilversuchen Nr. 1 und 2.

Die Zuteilung der Aquarien wurde ebenfalls vorab ausgelost. Zur Eingewöhnung an die Expositionsbedingungen wurden die Fischlarven 24 Stunden vor Versuchsbeginn in die Versuchsaquarien überführt. Während der Anpassungsphase trat bei den Fischen keine Mortalität auf. Die Zuordnung der Fische zu den verschiedenen Expositionskonzentrationen erfolgte zufällig mittels Kescher. Die Besatzdichte betrug 100 Fische pro Aquarium ($n_{\text{Gesamt}} = 1600$). Am Versuchsende lag die Biomasse bei 0,6 g/L Testwasser.

3.2.3.4 Expositionsdauer

Die Expositionsdauer betrug in den Teilversuchen Nr. 1 und 2 mit subadulten Regenbogenforellen jeweils 28 Tage. Im Teilversuch Nr. 3 wurden die juvenilen Regenbogenforellen über einen Zeitraum von 94 Tagen exponiert.

3.2.3.5 Fütterung während der Expositionsphase

Bei Teilversuch Nr. 1 (Guanylylurea) erfolgte während der Versuchslaufzeit alle zwei Tage eine Fütterung mit kommerziellem Fischfutter (EFICO Alpha 717, 4,5 mm, BioMar A/S, Brande, Dänemark). Die Futtermenge entsprach 1 % des Körpergewichts. Beim Teilversuch Nr. 2 (Metformin) wurde das Fütterungsregime umgestellt. Verteilt auf 2 Fütterungen pro Tag entsprach die jeweils verabreichte Futtermenge 0,7 % des Körpergewichts. Die Nahrungskarenz vor beiden Versuchsauflösung betrug 4 Tage.

Die juvenilen Regenbogenforellen wurden im Teilversuch Nr. 3 (Metformin) ab dem Tag 52 dpf (nach der Fertilisation) mit BioMar Forellenfutter INICIO Plus 0,5 mm (BioMar A/S, Brande, Dänemark) mehrmals täglich gefüttert. Um eine identische Futterzuteilung zu gewährleisten wurde ein Messlöffel verwendet. Zusätzlich wurden die verabreichten Futtermengen für jedes Aquarium einmal wöchentlich mittels Waage kontrolliert. Die Futtermenge wurde anhand des von BioMar vorgegebenen Futterkoeffizienten von 0,8 an das Wachstum der Fische angepasst. Am Tag 108 nach der Fertilisation wurde das Futter auf BioMar Forellenfutter INICIO Plus 0,8 mm umgestellt. Vor der Versuchsauflösung bestand eine Nahrungskarenz von 2 Tagen.

3.2.4 Versuchsbeobachtungen

Die veterinärmedizinische Betreuung sowie Dokumentationspflicht der als Versuchstiere gehaltenen Fische wurde in allen Teilversuchen gemäß Abschnitt 5, Tierschutzgesetz (TierSchG) durchführt. Die Fische wurden mehrmals täglich hinsichtlich Ihres Verhaltens und klinischer Auffälligkeiten begutachtet. In den Teilversuchen Nr. 1 und 2 wurde exemplarisch eine Zählung der Atemfrequenz an vier Regenbogenforellen pro Aquarium durchgeführt und die Ergebnisse für die abschließende Bewertung gemittelt. Die Beobachtungen sowie die Futteraufnahme wurden schriftlich dokumentiert.

3.2.5 Versuchsauflösung

Teilversuch Nr. 1 und 2 (subadulte Regenbogenforellen)

Nach Abschluss der Expositionsphase wurden alle Fische einzeln in einem Narkosebad mit 100 mg/L MS-222 (Tricain-Methansulfonat; Pharmaq, UK) für 7 min betäubt. Das Narkosebad wurde nach jeweils fünf Fischen erneuert. Nach Erreichen des Narkosestadium III.2 (Burka et al. 1997) wurden die Körpergewichte der Regenbogenforellen mittels Waage (2790, Soehnle Professional) (± 1 g) ermittelt. Die Standardlänge (± 1 mm) (Teilversuch Nr. 1) bzw. Gesamtlänge (± 1 mm) (Teilversuch Nr. 2) wurde mit Hilfe eines Messbretts für Fische gemessen. Die Auslesung des Transponders erfolgte mit einem Transponder-Auslese-Gerät (EUR 1.000 MultiChip Handlesegerät, EURO I.D. Identifikationssysteme GmbH & Co. KG).

Die Versuchsgruppen pro Aquarium ($n = 20$) wurden hinsichtlich der zu untersuchenden Endpunkte in zwei Gruppen (jeweils $n = 10$, je fünf ♀ und ♂) eingeteilt. Die Reihenfolge der Entnahme aus dem Narkosebad definierte die Gruppenzuteilung. Das Sektionsprotokoll richtete sich nach dem zu gewinnenden Probenmaterial. Eine detaillierte Übersicht der jeweils bei den Fischen der Gruppe Nr. 1 und 2 untersuchten Proben wird im Anhang B.4 in der Tabelle 34 dargestellt. Die Endpunkte, die sowohl bei der Gruppe 1 als auch der Gruppe 2 untersucht wurden, werden im Ergebnisteil für beide Gruppen zusammengefasst dargestellt.

► Gruppe Nr. 1

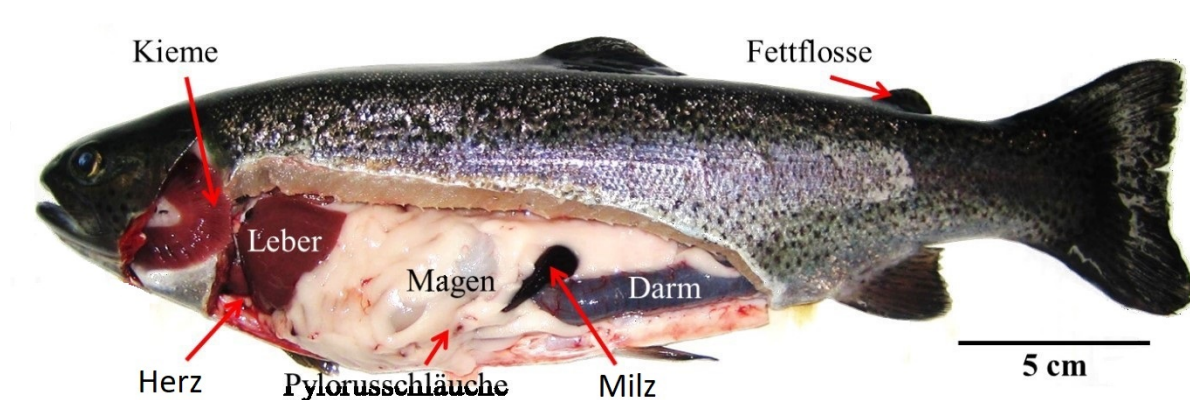
Im Narkosestadium III.2 wurde den Fischen aus der *Vena cava* (hintere Hohlvene) jeweils mindestens 4 mL Blut entnommen und in heparinisierte Blutröhrchen (Probengefäß 1,3 mL LH, Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland) überführt. Das heparinisierte Vollblut wurde umgehend für die hämatologischen Untersuchungen verwendet (siehe Punkt 3.2.8). Das verbleibende Blut wurde für 15 Minuten bei 3500 U/min (Universal 320R, Hettich Zentrifugen) zentrifugiert und das Blutplasma in CryoPur Röhrchen aliquotiert. Eine Probe des frischen Blutplasmas wurde direkt für die klinisch-chemischen Untersuchungen verwendet (siehe Punkt 3.2.7). Die restlichen Probengefäße mit Blutplasma wurden unmittelbar bei -80 °C für die serologischen Untersuchungen eingefroren (siehe Punkt 3.2.7). Anschließend wurden die Regenbogenforellen noch im Narkosestadium III.2 mittels Genickschnitt getötet. Nach der Euthanasie erfolgte die makroskopische Beurteilung von Flossen, Schuppen, Haut, Kopf, Maul, Augen, Kiemen und After nach einem Scoring-System (Tabelle 15).

Tabelle 15: Scoring äußerliche Veränderungen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)

Score	Bewertung
0	Keine makroskopischen Befunde
1	Geringgradige makroskopische Läsionen
2	Mittelgradige makroskopische Läsionen
3	Hochgradige makroskopische Läsionen

Anschließend wurde eine Probe der Kiemen, wie bei Birzle (2015) beschrieben, entnommen und in gepuffertem, 4 %igem Formaldehyd fixiert (siehe Punkt 3.2.10). Danach wurde die Bauchhöhle mittels Ventralschnitt und bogenförmigem Lateralschnitt auf Höhe der Seitenlinie und nachfolgender Entfernung der linken Bauchwand vollständig eröffnet. Darüber hinaus wurden die Fische der Gruppe Nr. 1 für qualitative bzw. semiquantitative histopathologische sowie stereologische Untersuchungen der Nieren und Hoden verwendet. Nach der Bewertung des Ernährungszustandes der Fische folgte die Präparation und Beurteilung aller abdominalen Organe (Herz, Leber, Milz, Gonaden, Magen, Pylorusanhänge, Darm, Schwimmblase, Niere, Leibeshöhle) sowie der Muskulatur hinsichtlich des Auftretens pathologischer Veränderungen (Abbildung 7). Die Befunde wurden schriftlich dokumentiert.

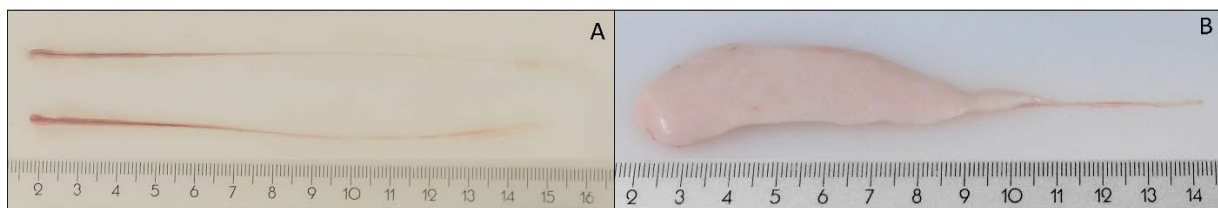
Abbildung 7: Situs einer Regenbogenforelle



Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Die Gonaden inklusive der Geschlechtsgänge (Männchen: Samenleiter [*Ductus spermaticus*], Weibchen: Eileiter [*Oviduct*]) wurden vollständig herauspräpariert, auf einer Feinwaage gewogen (± 1 mg) und ihre Gesamtlänge sowie die Länge der Gonaden ohne Geschlechtsgang bestimmt (± 1 mm). Als präpubertär (siehe Punkt 3.2.2) wurden Männchen eingestuft, deren Hoden eine rosa Färbung, eine filamentartige Struktur und ein Gesamtgewicht pro Versuchsfisch von < 500 mg aufwiesen. Im Gegensatz hierzu wurden Männchen mit Hoden weißlicher Färbung, deutlicher Umfangsvermehrung beginnend im vorderen Bereich des Hodens sowie einem Gesamtgewicht der Hoden pro Versuchsfisch von > 500 mg als pubertär beurteilt (Abbildung 8). Die Hoden von pubertären und präpubertären Männchen wurden analog als Ganzes in gepuffertem 4 %igem Formaldehyd fixiert (siehe Punkt 3.2.11.1). Ausschließlich beim Teilversuch Nr. 2 wurden die Ovarien zur Fixierung als Ganzes in Bouin'sche Lösung überführt (siehe Punkt 3.2.10).

Abbildung 8: Hodenreife bei subadulten, männlichen Regenbogenforellen



A: Präpubertäre Hoden. B: Pubertäre Hoden.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Das Magen-Darm-Konvolut wurde zusammen mit Leber und Milz aus der Leibeshöhle entfernt. Anschließend wurden der Kopf und der Schwanzstiel kaudal des Afters unter Schonung des Nierengewebes abgetrennt. Die im Rumpf verbleibende Niere wurde *in situ* in gepuffertem, 4 %igem Formaldehyd fixiert (weitere Aufarbeitung des Rumpfes unter Punkt 3.2.11.2). Nach Entfernung der Gallenblase wurde im Teilversuch Nr. 2 das Gesamtgewicht der Leber bestimmt (± 10 mg). In beiden Teilversuchen wurde die Leber längs halbiert. Aus der rechten Leberhälfte wurden zwei, ca. 3 mm dicke Lamellen herausgeschnitten und umgehend in 4 %igem, gepuffertem Formaldehyd fixiert. Eine weitere Leberlamelle wurde exemplarisch bei jeweils drei männlichen und weiblichen Tieren aus der Kontrollgruppe sowie der 1.000 $\mu\text{g/L}$ -Testgruppe des Replikat A entnommen und zur histochemischen Darstellung von Glykogen in gekühlte (4 °C) Schaffer'sche Lösung überführt.

Ein Organset bestehend aus Herz (*in toto*), Milz, Magen, Darm, Pylorus sowie Gehirn (*in toto*) wurde in gepuffertem, 4 %igem Formaldehyd fixiert (siehe Punkt 3.2.10).

► Gruppe Nr. 2

Bei den Versuchsfischen der Gruppe Nr. 2 wurden die Organe pathologisch-anatomisch beurteilt und das Lebergewicht ermittelt. Die Gonaden wurden entnommen, gemessen, gewogen und für die histologische Untersuchung fixiert. Diese Arbeitsschritte erfolgten analog zur Probenahme der Gruppe Nr. 1.

Teilversuch Nr. 3 (juvenile Regenbogenforellen)

Jeweils fünf juvenile Regenbogenforellen wurden in einem Kescher in einem Narkosebad mit 100 mg/L MS-222 (Tricain-Methansulfonat; Pharmaq, UK) für 5 min betäubt. Nach dem Erreichen des Narkosestadium III.2 wurden die Fische einzeln entnommen und mit einem Einmaltuch beidseits von anhaftender Flüssigkeit befreit. Äußerliche Veränderungen im Bereich von Maul, Augen, Kopf, Haut, Flossen und After wurden mittels eines Scoring-Systems (0-3)

erfasst und schriftlich dokumentiert. Für ein völlig unverändertes Exterieur wurde der Score 0, bei maximal geringgradigen Veränderungen der Score 1, bei maximal mittelgradigen Veränderungen der Score 2 und bei hochgradigen Veränderungen der Score 3 vergeben (Tabelle 15). Für das weitere Handling der Fische wurde steriles Einmal-Sektionsbesteck verwendet. Hiermit wurden die Fische auf eine Einmalpetrischale gelegt und das Körpergewicht (± 10 mg) sowie die Gesamtlänge (± 1 mm) bestimmt. Nach Tötung durch einen Genickschnitt wurde die Schwanzflosse für die genetische Geschlechtsbestimmung (siehe Punkt 3.2.2) entfernt und in ein auf Trockeneis gelagertes Probengefäß überführt. Die Leibeshöhle wurde durch einen medianen Muskelschnitt eröffnet und der Schwanzstiel hinter dem After abgetrennt. Der Rumpf wurde in einen Falcon mit 4 %igem, gepuffertem Formaldehyd überführt und mindestens zwei Wochen bis zur weiteren Prozessierung fixiert (siehe Punkt 3.2.10).

3.2.6 Berechnung biologischer Indices

Abhängig vom jeweiligen Teilversuch wurden z. T. unterschiedliche biologische Indices als Bioindikatoren ermittelt. Ausschließlich im Rahmen der Teilversuche Nr. 1 und 2 wurde der gonadosomatische Index (GSI) (Anderson und Gutreuter 1983) sowie der hepatosomatische Index (HSI) (Jensen 1979) bestimmt. Die Berechnung des GSI erfolgte zum einen für die Gesamtanzahl von Männchen und Weibchen pro Testkonzentration (jeweils $n = 20$), zum anderen ausschließlich für pubertäre Männchen, deren Hodengewebe sich bereits im Stadium der Spermatogenese befand (siehe Punkt 3.2.2). Die Formeln zur Berechnung der Indices sind in Tabelle 16 dargestellt. Der Korpulenzfaktor (Fulton's condition factor, K) (Ricker 1975) wurde für die Versuchsfische aller drei Teilversuche berechnet.

Tabelle 16: Berechnung biologischer Indices

Index	GSI	HSI	K
Berechnung	$GSI = \frac{100 \times GG}{KGW}$	$HSI = \frac{100 \times LG}{KGW}$	$K = \frac{100 \times KGW}{L^3}$

GG: Gonadengewicht (in g); LG: Lebergewicht (in g); KGW: Körpergewicht (in g); L: Länge (Standardlänge: Teilversuch Nr. 1, Gesamtlänge: Teilversuche Nr. 2 + 3) (in cm).

3.2.7 Klinische Chemie

Für die klinisch-chemischen Untersuchungen der subadulten Regenbogenforellen der Teilversuche Nr. 1 (Guanylurea) und Nr. 2 (Metformin) (jeweils $n_{\text{Gesamt}} = 160$) wurde Blutplasma verwendet. Die Untersuchungen wurden unter Verwendung handelsüblicher Testkits mittels photometrischer Auswertung (Hitachi M40; Axonlab) durchgeführt. Bei allen Fischen wurden Gesamtprotein, Albumin, Alkalische Phosphatase (ALP), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT), Laktat-Dehydrogenase (LDH), Cholesterol, HDL-Cholesterol (High-Density-Lipoprotein-Cholesterol), LDL-Cholesterol (Low-Density-Lipoprotein-Cholesterol), Triglyceride, Glukose, Harnsäure, Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN), Kreatinin und Calcium bestimmt. Eine Übersicht der verwendeten Testkits wird im Anhang B.3 in der Tabelle 32 dargestellt.

3.2.8 Hämatologie

Die nachfolgend dargestellten hämatologischen Untersuchungen wurden bei subadulten Regenbogenforellen der Teilversuche Nr. 1 (Guanylurea) und Nr. 2 (Metformin) (jeweils $n_{\text{Gesamt}} = 160$) umgehend nach der Blutentnahme an heparinisiertem Vollblut durchgeführt.

Hämatokrit

Für die Bestimmung des Hämatokrits wurde Vollblut in einer heparinisierten Hämatokrit-Kapillare (Hettich Zentrifugen) mittels Kapillarkraft aufgesogen und einseitig versiegelt. Die Kapillaren wurden mit dem verschlossenen Ende nach außen bei 13000 U/min über 10 Minuten zentrifugiert (Hämatokrit 210, Hettich Zentrifugen). Das Ablesen des Hämatokrits erfolgte mittels Hämatokrit-Ablesetabelle. Die Hämatokrit-Bestimmung erfolgte im Doppelansatz mit anschließender Berechnung des Mittelwerts.

Hämoglobin-Bestimmung

Die Hämoglobin-Konzentration im Vollblut wurde im Doppelansatz mittels eines handelsüblichen Testkits (Dr. Lange Küvetten-Test LKM 143, Fa. Hach Lange GmbH) nach Herstellerangaben photometrisch bestimmt. Die Messung der Extinktion erfolgte nach 3 Minuten mit einem Photometer (Miniphotometer LP2, Fa. Dr. Lange GmbH) bei einer Wellenlänge von 546 nm (Schichtdicke 10 mm).

Erythrozytenindices

Es wurden drei verschiedene Erythrozytenindices berechnet. Diese umfassten MCH (mittleres korpuskuläres Hämoglobin), MCHC (mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration) sowie MCV (mittleres korpuskuläres Volumen). Dabei beschreibt MCH die absolute Menge an Hämoglobin in einem Erythrozyten, MCHC hingegen die Konzentration des Hämoglobins innerhalb der gesamten Erythrozytenmasse. Der MCV-Wert gibt das durchschnittliche Volumen der einzelnen Erythrozyten an. In Tabelle 17 sind die zur Berechnung der Erythrozytenindices verwendeten Formeln dargestellt.

Tabelle 17: Formeln zur Berechnung der Erythrozytenindices

Index	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	MCV (µm ³)
Berechnung	$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{Hb (g/dL)}}{\text{Ez / } \mu\text{L}}$	$\text{MCHC} \left(\frac{\text{g}}{\text{dL}} \right) = \frac{\text{Hb (g/dL)} \times 100}{\text{Hk (Vol\%)}}$	$\text{MCV (}\mu\text{m}^3\text{)} = \frac{\text{Hk (Vol\%)}}{\text{Ez / } \mu\text{L}^*}$

Ez: Erythrozytenzahl, Hb: Hämoglobin; Hk: Hämatokrit.

*1 µL entspricht 1 mm³ (= 109 µm³).

Erythrozyten- und Leukozyten-Zählung

Die Zählung der Erythrozyten und Leukozyten (Tabelle 18) wurde nach der für Fische modifizierten Methode nach Natt und Herrick (1952) durchgeführt (Hoffmann 2005; Natt und Herrick 1952). Frisch aufgeschwenktes, heparinisiertes Vollblut wurde in einer Erythrozyten-Mischpipette (Assistent) mit der Lösung nach Natt und Herrick (1952) aufgezo-gen und der Inhalt auf einer Rüttelmaschine (Vibrator 338, Assistent) durchmischt. Anschließend wurde eine Neubauer Zählkammer (Neubauer improved bright-line, Fa. Optik Labor) mit dem durchmischten Pipetteninhalt befüllt und die Zählung vorgenommen. Die Zählung der intensiv violett gefärbten Leukozyten sowie der schwächer gefärbten Erythrozyten erfolgte nach einem Zählprotokoll unter Beachtung der L-Regel.

Tabelle 18: Zählprotokoll für Blutzellen

Blutzelltyp	Verwendete Vergrößerung	Quadranten in Zählkammer	Multiplikationsfaktor	Einheit des Endergebnisses
Leukozyt	250	vier große Eckquadrate zu je 16 Gruppenquadranten	500	Leukozytenzahl/ μL
Erythrozyt	250	fünf Gruppenquadrate zu je 16 Kleinstquadranten	10.000	Erythrozytenzahl/ μL

Differentialblutbild

Zur Bestimmung des Differentialblutbildes wurde zunächst ein dünner Blutausschlag mit heparinisiertem Vollblut angefertigt. Nach Lufttrocknung über 24 h wurde dieser mittels Diff-Quik®-Färbeset angefärbt. Die Zählung von Lymphozyten und neutrophile Granulozyten erfolgte mikroskopisch bei 1.000-facher Vergrößerung (Laborlux 11, Leitz) unter Verwendung von Immersionsöl. Die Ausstriche wurde mäanderförmig unter Auslassung des Randbereichs durchmustert. Es wurden jeweils 100 weiße Blutzellen mittels Zählhilfe (Counter AC-8, Fa. Assistant) gezählt.

3.2.9 Serologische Untersuchungen (Biomarker)

Als Probenmaterial für die serologischen Untersuchungen an den subadulten Regenbogenforellen der Teilversuche Nr. 1 (Guanylurea) und Nr. 2 (Metformin) (jeweils $n_{\text{Gesamt}} = 160$) diente Blutplasma. Die serologischen Analysen umfassten die quantitative Bestimmung der Plasma-Konzentrationen von Vitellogenin und Aromatase sowie der Steroidhormone 17β -Estradiol (E2), Testosteron (Ts) und 11-Ketotestosteron (11-KT) anhand eines ELISAs. Eine Auflistung der verwendeten, handelsüblichen Testkits enthält Tabelle 33 im Anhang B.3. Die Auswertungen wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Sunrise, TECAN Deutschland, Crailsheim) durchgeführt. Alle Tests wurden im Dreifach-Ansatz durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Der Hormonquotient wurde aus dem Verhältnis von 17β -Estradiol:Testosteron (E2/Ts) jeweils in ng/mL berechnet.

3.2.10 Qualitative und semiquantitative Histopathologie

Teilversuche Nr. 1 (Guanylurea) und Nr. 2 (Metformin)

► Proben

Im Rahmen von Teilversuch Nr. 1 (Guanylurea) und Nr. 2 (Metformin) wurden an Fischen aller Test- und Kontrollgruppen qualitative bzw. semiquantitative histopathologische Untersuchungen von Leber und Milz durchgeführt. Bei Kontrolltieren und Individuen der 1.000 $\mu\text{g/L}$ -Expositionsgruppe wurde zudem ein erweitertes Spektrum von Gewebe (Herz, Gehirn, Magen, Pylorus, Darm, Kieme, Haut, Muskulatur) in die Untersuchungen mit einbezogen. Außerdem wurden bei Teilversuch Nr. 1 für alle Kontroll- und Versuchsgruppen histologische Schnitte der Niere qualitativ und semiquantitativ ausgewertet. Im Teilversuch Nr. 2 beschränkten sich die Untersuchungen der Niere auf Kontrolltiere und Fische der 1.000 $\mu\text{g/L}$ -Gruppe. In Teilversuch Nr. 1 wurde eine qualitative histopathologische Untersuchung des Hodengewebes sowie eine semiquantitative Einstufung des vorliegenden Reifegrades der Hoden bei allen Fischen durchgeführt. Im Teilversuch Nr. 2 erfolgte die semiquantitative Einstufung des vorliegenden Reifegrades der Hoden nur bei präpubertären Männchen. Eine qualitative histopathologische Untersuchung erfolgte analog zu Teilversuch Nr. 1 bei Kontrolltieren und Fische der 1.000 $\mu\text{g/L}$ -Gruppe. Außerdem wurden beim Teilversuch Nr. 2 die Ovarien bei

Kontrolltiere und Fische der 1.000 µg/L-Gruppe qualitativ histopathologisch untersucht und ihr Reifegrad beurteilt. Eine Übersicht der durchgeführten histopathologischen Untersuchungen wird in Tabelle 34 im Anhang B.4 dargestellt.

► Histologische Technik

Die histologische Aufarbeitung erfolgte bei allen Gewebeproben mit Ausnahme der Gonaden und der in Schaffer-fixierten Leber nach dem gleichen Routine-Protokoll. Die zugeschnittenen und in 4 %igem Formaldehyd gelagerten Organe wurden gewässert und anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe und zwei Xylolbäder in Paraffin überführt. Mit einem Mikrotom (Leica Histo Core Autocut und Nanocut) wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, im Wasserbad (40°C) gestreckt und auf Objektträger aufgezogen. Die in Schaffer-fixierten Lebern wurden nominal 5 µm dick geschnitten, im Wasserbad bei 25 °C gestreckt und ebenfalls auf Objektträger aufgezogen. Nach der Trocknung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) bzw. die Schaffer-fixierten Leberschnitte zur Darstellung von Glykogen mit Karmin nach Best gefärbt und mit Eukitt eingedeckt. Von jedem Bouin-fixierten Ovar wurde je eine 4 mm dicke Lamelle aus der kranialen beziehungsweise kaudalen Organhälfte präpariert und histologisch prozessiert. Beide Lamellen wurden mit der kaudalen Anschnittsfläche in Histokassetten überführt und 24 h in Lithium-Carbonat-Lösung (600 mL Ethanol 99,9 % + 400 mL Aqua dest. + 6 g Lithium-Carbonat) auf einem Schüttler stehend entfärbt. Nach dem Entfärben erfolgte eine einstündige Wässerung der Lamellen sowie eine anschließende histotechnische Aufarbeitung nach beschriebenen Standardprotokoll. Die 3 µm dicken Paraffinschnitte wurden nach Streckung im Wasserbad (40°C) mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und mit Eukitt eingedeckt. Eine genaue Beschreibung der histologischen Aufarbeitung der Hoden ist unter dem Punkt 3.2.11 dargestellt.

► Qualitative histopathologische Untersuchung und semiquantitative Auswertung der histologischen Befunde mittels Scoring System

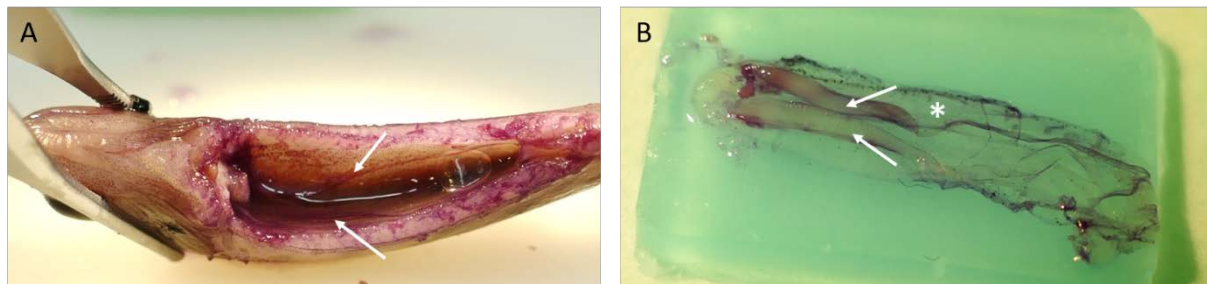
Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte mittels Scoring-System an einem Durchlichtmikroskop (Olympus BX 61 mit motorisiertem Tisch, Olympus) unter Verwendung der CellSense Software. Für jedes Organ wurde in Anlehnung an Schwaiger et al. (1997) und Bernet et al. (1999) ein Scoring-System entwickelt (Schwaiger et al. 1997; Bernet et al. 1999). Nach qualitativer Beurteilung der histologischen Schnitte der Kontrolle und der Expositionsgruppe mit 1.000 µg/L Testsubstanz wurde für die beobachteten pathologischen Alterationen oder histologische Befunde (z. B. Vorkommen von Melanomakrophagen) ein Scoring System zur semiquantitativen Auswertung festgelegt. Anhand der Scorewerte erfolgte eine Einteilung der Befunde hinsichtlich ihres Umfanges und Schweregrad (0,5: geringstgradig; 1: geringgradig; 2: mittelgradig; 3: hochgradig; 4: höchstgradig). Zur Erhöhung der Objektivität erfolgte die histopathologische Diagnostik an verblindeten Präparaten. Die semiquantitative Einstufung der Reifegrade der Gonaden erfolgte nach Billard (1992). Zur Einstufung des Reifegrads der Ovarien wurde das am weitesten entwickelte im Ovar vorkommende Oozytenstadium zu Grunde gelegt (West 1990; Billard 1992). Bei den Gonaden wurden alle Organanschnitte separat mittels Score bewertet und anschließend ein Mittelwert aller Scorewerte pro Fisch gebildet. Neben der Beurteilung des Reifegrads der Gonaden erfolgte eine histopathologische Untersuchung dieser Organe mit einer Beurteilung endokriner disruptiver Effekte nach Johnsen et al. (2009).

Teilversuch Nr. 3 (Metformin)

► Präparation und histologische Technik

Zur histologischen Aufarbeitung der Gonaden der juvenilen Fische wurden aus dem Formaldehyd-fixierten Rumpf zunächst die Eingeweide entfernt. Die verbleibende Karkasse wurde für ca. 5 s in Mayers Hämatoxylin (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) getaucht und anschließend in lauwarmem Leitungswasser gewässert (Abbildung 9). Die nun bläulich erscheinenden Gonaden wurden zusammen mit der Schwimmblase unter einem Binokular (STEMI SV8, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) entnommen und längs auf ein Gel ausgebreitet (Biopsy Gels, Tissue Tek Paraform®, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande). Die Proben wurden in ein Einlegepapier eingeschlagen, in eine Feingitter-Gewebekassette verbracht und bis zur weiteren histologischen Prozessierung in frischem, 4 %igem, gepuffertem Formaldehyd gelagert. Die histotechnische Aufarbeitung der Proben erfolgte weitestgehend analog der bereits im Rahmen der Teilversuche Nr. 1 und 2 beschriebenen Methode. Ein Unterschied bestand darin, dass von jeder Gonade 3 Schnitte im Abstand von 30 µm angefertigt wurden. Nach Trocknung wurden die Schnitte mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Abbildung 9: Gonadenpräparation bei juvenile Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)



Gonadenpräparation; A: Anfärbung der feinen Gonadenstränge (weiße Pfeile) mittels Hämatoxylin; B: Gonadenstränge (weiße Pfeile) mit Schwimmblase (*).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Auswertung der histologischen Präparate

Die Bewertung des Reifegrades der Gonaden erfolgte nach Billard (1992) und Grier (2007) an einem Durchlichtmikroskop (Olympus BX 61 mit motorisiertem Tisch, Olympus) unter Verwendung der Software CellSense (Olympus, Europa GmbH, Hamburg, Deutschland). Zur Beurteilung histopathologischer Veränderungen wurde unter anderem das „OECD guidance document for the diagnosis of endocrine-related histopathology of fish gonads“ verwendet (Johnsen et al. 2009).

3.2.11 Stereologische Untersuchungen (Quantitative histologische Untersuchung)

3.2.11.1 Stereologische Untersuchung der Hoden

Im Rahmen von Teilversuch Nr. 2 (Metformin) erfolgte die Probenahme zur stereologischen Untersuchung für alle männlichen Versuchsfische nach dem gleichen Protokoll. Dieses Protokoll wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Rüdiger Wanke und PD Dr. Andreas Parzefall vom Institut für Tierpathologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München entwickelt. Eine stereologische Auswertung der verschiedenen Hodenzelltypen wurde nur bei Hoden mit aktiver Spermatogenese (pubertäre Männchen) durchgeführt.

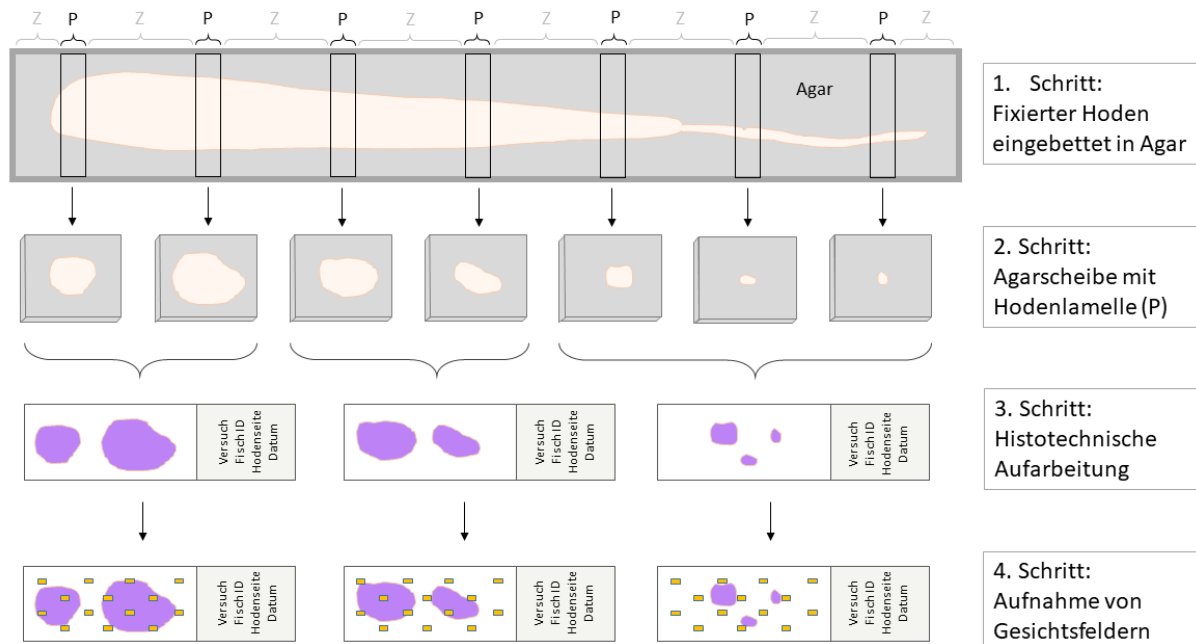
Die Untersuchung der Hoden umfasste drei wesentliche, im Nachfolgenden dargestellte Arbeitsschritte:

- Probenahme zur stereologischen Untersuchung der Hoden
- Schätzung der Volumendichte (V_V) der Hodenzellen
- Bestimmung der Absolutvolumina (V) der Hodenzellen

Probenahme zur stereologischen Untersuchung der Hoden

Für die stereologische Untersuchung der Hoden wurde ein spezielles Probenahmeprotokoll entwickelt. Der wesentliche Unterschied gegenüber der unter Punkt 3.2.10 dargestellten Routine-Histotechnik bestanden darin, dass die fixierten Hoden in 2 %igem Agar eingebettet wurden und nach Aushärtung in zwei verschiedene Lamellentypen (Z- und P-Lamellen) zugeschnitten wurden (Abbildung 10). Die Dicke der Z- Lamellen betrug 1, 1,5 oder 2 cm und wurde abhängig von der Länge des Hoden gewählt, um durchschnittlich 7 P-Lamellen pro Hoden zu erhalten. Die Z-Lamellen wurden als Rückstellproben umgehend wieder in frischem, gepuffertem 4 %igem Formaldehyd fixiert. Für die stereologische Auswertung wurden die jeweils 3 mm dicken P-Lamellen verwendet. Die P-Lamellen wurden nach dem Zuschnitt vom umgebenden Agar befreit, auf die rückwärtsgewandte Seite (kaudal) in Einbettkassetten für die Histologie überführt und bis zur weiteren Bearbeitung in Formaldehyd gelagert. Die weitere histotechnische Prozessierung der P-Lamellen erfolgte nach histologischem Standardprotokoll mit HE-Färbung.

Abbildung 10: Probenahme von fixierten Hoden für die stereologische Auswertung



1. Schritt: Nach Einbettung des fixierten Hodens (rosa) in Agar (grau) werden abwechselnd Z-Lamellen (Rückstellproben, Dicke $[t] = 1-2$ cm) und P-Lamellen (3 mm Dicke) zugeschnitten. Die erste Z-Lamelle ist dabei zufällig 0-t cm dick.
2. Schritt: Die P-Lamellen werden nach dem Zuschnitt auf ihre kaudale Seite gedreht, das Hodengewebe vom Agar befreit und auf der kaudalen Seite liegend für die weitere histologische Bearbeitung verwendet.
3. Schritt: Histologische Prozessierung des Hodengewebes mit HE-Färbung.
4. Schritt: Automatisierte Aufnahme von definierten Gesichtsfeldern (gelb) mittels CellSense Software.

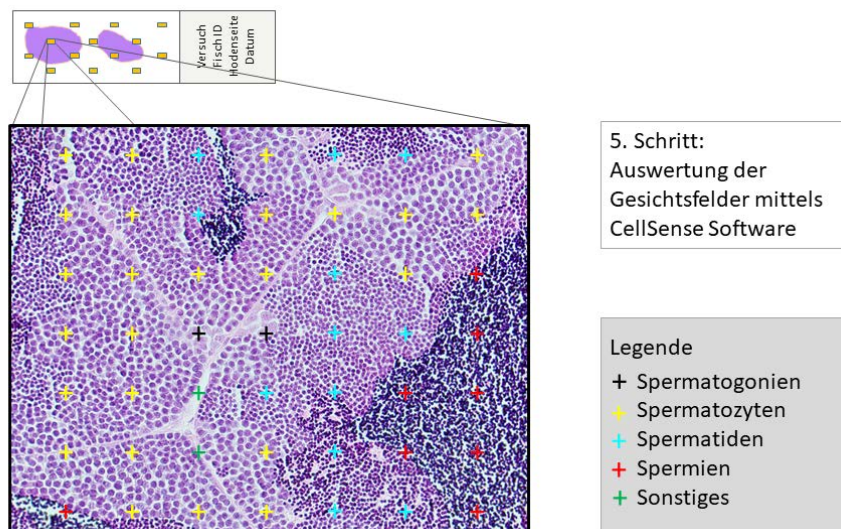
Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Schätzung der Volumendichte (VV) von Hodenzellen

Zur Beurteilung des Reifegrades der Hoden wurden die Volumendichten der in verschiedenen Reifestadien vorliegenden Keimzellen mittels Punktzählmethode nach Delesse (1847) geschätzt (Delesse 1847). Im Rahmen der Punktzählmethode wird über Gesichtsfelder von histologischen Schnitten eines Organs ein Punkteraster gelegt. Anschließend wird für jeden Punkt auf dem Raster der jeweils durch diesen markierte Zelltyp gezählt (Abbildung 11). Die Identifikation der Hodenzellen erfolgte anhand aktueller Literatur (Uribe et al. 2014; Dziejulska und Domagala 2003; Billard 1983). In dem Fall, dass in Randbereichen des Anschnitts Punkte auf einen Bereich ohne Organgewebe fallen, werden diese Punkte als „Zielgewebe nicht getroffen“ gezählt und von der möglichen Gesamtstrefferzahl des Referenzkompartiments abgezogen. Es wurden die folgenden Schätzvolumina (V_V) ermittelt:

- Spermatogonien
- Spermatozyten
- Spermatiden
- Spermien
- Sonstiges (Bindegewebe, Fettgewebe, Sertolizellen, Leydigzellen, Blutgefäße)

Abbildung 11: Schätzung des Volumenanteils (V_V) von Hodenzellen



5. Schritt: In der CellSense Software wird ein Raster mit 49 Punkten über das histologische Bild gelegt. Jeder Punkt wird entsprechend der darunterliegenden Struktur als eins der 5 Zelltypen (Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden, Spermien oder Sonstiges) gezählt.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Der Volumenanteil der Zelltypen in dem Organ wurde anhand der Ergebnisse der Zählung unter Verwendung folgender Gleichung geschätzt:

$$V_{V(\text{Hodenzelltyp}/\text{Hoden})} = \frac{\sum \text{Punkte}_{(\text{Hodenzelltyp})}}{\sum \text{Punkte}_{(\text{Gesamtpunktzahl Hoden})}}$$

Die Berechnung der erforderlichen Gesamtpunktzahl erfolgte nach Weibel (1979). Hierbei wurde ein Konfidenzintervall (d) von $\pm 10\%$ des Mittelwertes ($d = 0,1$) und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($\alpha = 0,05$; $t_\alpha = 1,96$) zu Grunde gelegt. Die Berechnung der erforderlichen Gesamtpunktzahl (P_c) erfolgte unter Einbeziehung der Anzahl ausgewerteter Gesichtsfelder (M) anhand der Gleichung (Weibel 1979):

$$P_c = \left(\frac{t_\alpha^2}{M \times d^2} \right) \times \left(\frac{1 - V_v}{V_v} \right)$$

Eine Voraussetzung zur Anwendung dieser Gleichung ist die Kenntnis des Größenbereichs der Schätzvolumina des Zielgewebes. Hierfür wurde das Schätzvolumen der Keimzelltypen bei vier Hoden in jeweils 20 Gesichtsfeldern (20fache Vergrößerung, Bildgröße: $421\ \mu\text{m} \times 330,2\ \mu\text{m}$) unter Verwendung eines 49-Punkte-Rasters (maximale Gesamtpunktzahl / Hoden = 980) bestimmt. Alle stereologischen Untersuchungen erfolgten an einem Durchlichtmikroskop (Olympus BX 61 mit motorisiertem Tisch, Olympus) unter Verwendung der Software CellSense. Die Auswertung dieser Stichprobe ergab Schätzvolumina von $0,003 \pm 0,24$ für Spermatogonien, $0,491 \pm 4,32$ für Spermatozyten, $0,316 \pm 1,86$ für Spermatiden, $0,151 \pm 3,06$ für Spermien und $0,019 \pm 0,33$ für Sonstiges.

Bei subadulten Fischen äußern sich Veränderungen im Reifegrad der Hoden insbesondere in einer Verschiebung des Volumenanteils von Spermatozyten, Spermatiden und Spermien (Billard 1992). Dementsprechend wurde für die Berechnung der Gesamtpunktzahl nach Weibel (1979) ein Schätzvolumen von 0,01 gewählt, welches diese relevanten Zellpopulationen abdeckt. Hierfür wurde in der zur Auswertung verwendeten Software CellSense ein automatisiertes Aufnahme-Protokoll erstellt, bei dem ein Raster mit 25 Aufnahmepunkten über den Objektträger gelegt wurde (systematic uniform random sampling). Alle mit diesem Protokoll aufgenommenen Gesichtsfelder (20 x Vergrößerung, Raster mit 49 Punkten) mit einem Anschnitt von Hodengewebe wurden für die Auswertung verwendet. Zur Erhöhung der Objektivität erfolgte die Beurteilung an verblindeten Präparaten.

Bestimmung der Absolutvolumina (V) der Hodenzellen

Anhand der Schätzvolumina (V_v) der verschiedenen Hodenzelltypen wurde ihr jeweiliges Absolutvolumen (V) im Hoden berechnet. Hierfür wurde unter Verwendung einer volumetrischen Methode nach Scherle (1970) das Volumen des Hodens aus seinem Gewicht berechnet (Scherle 1970). Zunächst wurde in einem Vorversuch der Scherle-Faktor an Hoden von 1,5-jährigen Regenbogenforellen bestimmt. Dafür wurde das Gewicht jeweils beider Hoden (W_A) von 1,5-jährigen Regenbogenforellen ($n_{\text{Fisch}} = 15$) mittels Waage ($\pm 0,1\ \text{mg}$) ermittelt. Die Hoden wurden anschließend in einem Gefäß mit isotonischer Kochsalzlösung (300 mOsm) hängend erneut gewogen (W_L). Der Scherle-Faktor ergibt sich aus der Division des Hodengewichts W_A (in Luft) durch das Hodengewicht W_L (in Flüssigkeit). Im Rahmen des Vorversuchs wurde für Hoden in Spermatogenese ($n_{\text{Hoden}} = 30$) ein Scherle-Faktor von $1,06 \pm 0,01$ ermittelt.

Das Hodenvolumen (V_{Hoden}) ergab sich dementsprechend aus der Division der ermittelten Hodengewichte bei Luft (W_A) durch den Scherle-Faktor.

$$V_{(\text{Hoden})} = \frac{W_A}{\text{Scherle - Faktor}}$$

Die Absolutvolumina der Hodenzellen wurden anschließend wie folgt berechnet (Howard und Reed 2010):

$$V_{(\text{Hodenzelltyp}, \text{Hoden})} = V_V(\text{Schätzvolumen Hodenzelltyp}) \times V_{(\text{Hoden})}$$

3.2.11.2 Stereologische Untersuchung der Niere

Das Protokoll zur stereologischen Untersuchung der Niere wurde in Anlehnung an das Protokoll von Birzle (2015) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Rüdiger Wanke und PD Dr. Andreas Parzefall vom Institut für Tierpathologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München entwickelt. Die stereologische Aufarbeitung der Niere umfasste dabei vier wesentliche Arbeitsschritte, die nachfolgend dargestellt werden:

- ▶ Probennahme zur stereologischen Untersuchung der Niere
- ▶ Schätzung der Volumendichte der verschiedenen Nierenzelltypen
- ▶ Schätzung des Nierenvolumens
- ▶ Bestimmung der Absolutvolumina der verschiedenen Nierenzelltypen

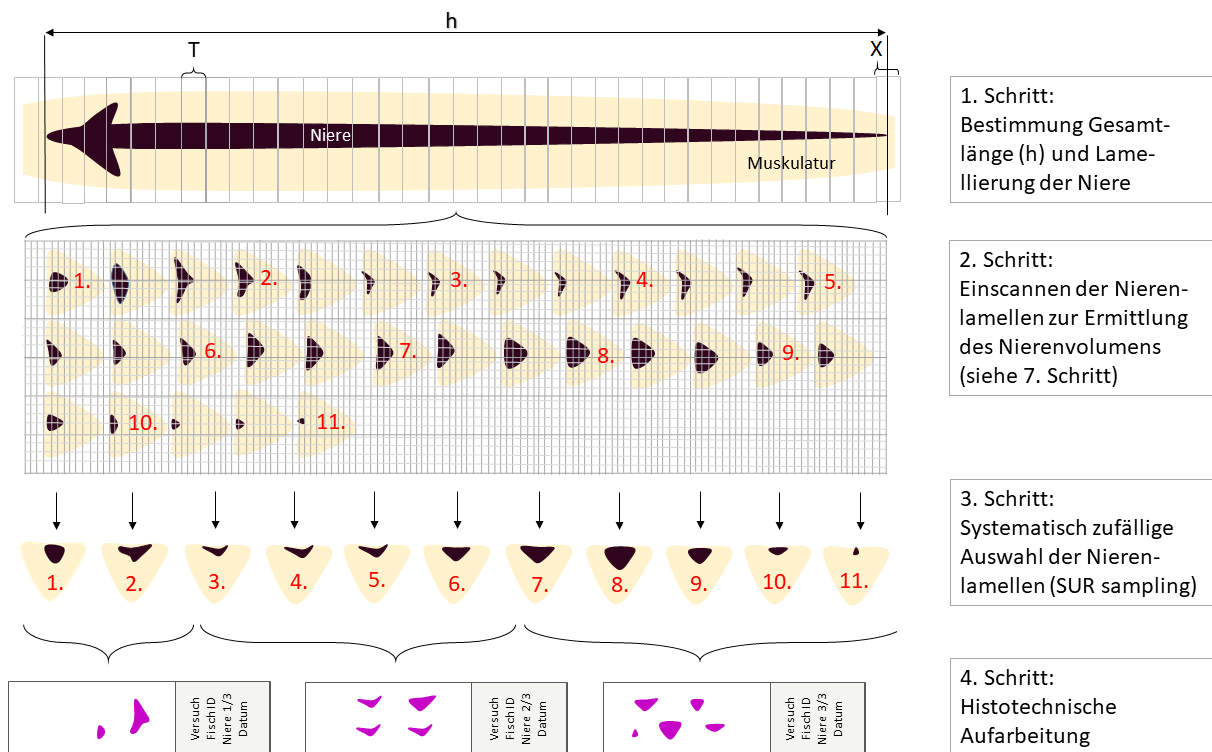
Probennahme zur stereologischen Untersuchung der Niere

Die in 4 %iger Formaldehyd-Lösung fixierten Rümpfe der Regenbogenforellen (Punkt 3.2.5) der Teilversuche Nr. 1 (Guanyldurea) und Nr. 2 (Metformin) wurden unter einem Abzug (Basic Line 95.12.6, Asecos, Gründau, Deutschland) zunächst weitestgehend von der umgebenden Muskulatur und Haut befreit. Eine Probe von Haut und Muskulatur wurde für die qualitative bzw. semiquantitative Untersuchung sichergestellt (Punkt 3.2.10). Die Gesamtlänge der Niere (h) wurde in Millimetern (± 1 mm) gemessen (Abbildung 12).

Daraufhin wurde die Niere mittels planparalleler äquidistanter Querschnitte von nominal 5 mm Dicke (= Intervallabstand T) lamelliert. Die erste Nieren-Lamelle wies eine zufällige Dicke zwischen 1-5 mm auf. Die Schnittrichtung war stets von ventral nach dorsal, sodass die Niere beim Schneiden der Wirbelsäule nicht gequetscht wurde. Die Anzahl der Nieren-Lamellen, bei denen kaudal noch ein Anschnitt von Nierengewebe bestand ($N-1$), wurde notiert und diese jeweils auf ihre kaudale Seite gelegt. Anschließend wurden diese Lamellen auf einer Klarsichtfolie mit Millimeterpapier-Aufdruck liegend eingescannt (Epson Perfection V350 Photo).

Die Auswahl der zu untersuchenden Lamellen erfolgte systematisch zufällig, wobei die jeweils erste Lamelle stets mittels Zufallszahl aus einer Zufallszahlentabelle (Zahlen 1-3) ausgewählt wurde. Als weitere Lamellen wurde nachfolgend jede dritte Lamelle verwendet. Die ausgewählten Lamellen wurden vollständig von umgebendem Gewebe befreit und bis zur weiteren histologischen Prozessierung nach Standardprotokoll in 4 %igem gepuffertem Formaldehyd gelagert.

Abbildung 12: Probenahme für die stereologische Untersuchung der Niere



- 1. Schritt:** Die Gesamtlänge (h) der Niere wurde in mm gemessen und die Niere in Lamellen der Dicke $T = 5$ mm zerteilt. Für die weitere Auswertung wurden von der Gesamtzahl der Lamellen mit Nierengewebe (N) diejenigen Lamellen mit einem kaudalen Anschnitt von Nierengewebe verwendet ($N-1$), wobei die mit „X“ gekennzeichnete Lamelle verworfen wurde.
- 2. Schritt:** Die verwendeten Nierenlamellen ($N-1$) wurden auf ihre kaudale Seite gedreht und auf Millimeterpapier eingescannt. Die weitere Auswertung der Scanbilder zur Schätzung des Nierenvolumens ist unter Schritt 7 in Abbildung 14 dargestellt.
- 3. Schritt:** Nach Festlegung der ersten Nierenlamelle mittel Zufallszahl zwischen 1 und 3 (in diesem Beispiel 1) wurde nachfolgend jede 3. Lamelle für die Ermittlung der Schätzvolumina verwendet.
- 4. Schritt:** Diese Nierenlamellen wurden von der umgebenden Muskulatur befreit und nach Standardprotokoll histotechnisch aufgearbeitet.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Schätzung der Volumendichte der verschiedenen Nierenzelltypen

Die Schätzung der Volumendichte der verschiedenen Nierenzelltypen erfolgte ebenfalls mittels Punktzählmethode nach Delesse (1847) (Abbildung 13). Die verschiedenen Nierenzelltypen wurden unter Verwendung von Fachliteratur identifiziert (Anderson und Loewen 1975).

Dabei wurde die Volumendichte (V_v) der Zellen folgender renaler Funktionseinheiten geschätzt:

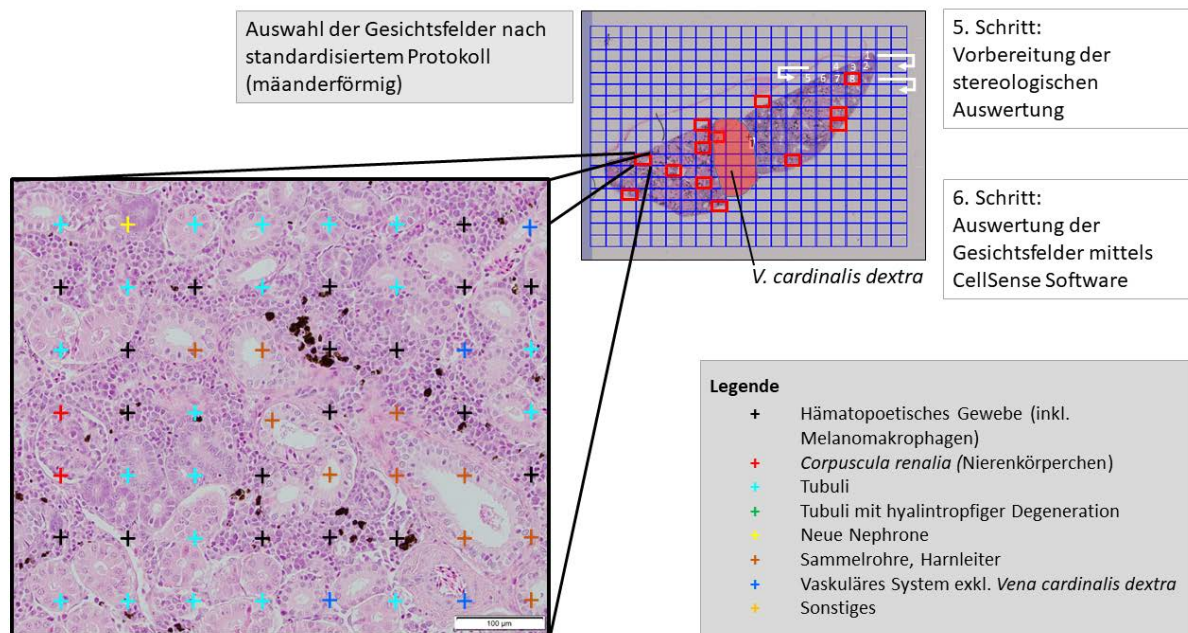
- Hämatopoetisches Gewebe inkl. Melanomakrophagen
- *Corpuscula renalia* (Nierenkörperchen)
- Tubuli (Nierenkanälchen)
- Neue Nephronen (funktionelle Untereinheit aus Nierenkörperchen und Nierenkanälchen)
- Sammelrohre
- Vaskuläres System exkl. *Vena cardinalis dextra*
- Sonstiges (Bindegewebe, Nervengewebe, Fettgewebe, Stannius'sche Körperchen, Nebenniere [interrenale Zellen], chromaffine Zellen)

Das Untersuchungsprotokoll richtete sich nach der für Bachforellen beschriebenen Volumendichte der neuen Nephronen von 0,2 % (Resende et al. 2010). Für Regenbogenforellen sind keine entsprechenden Daten verfügbar. Die zu zählende Gesamtpunktzahl (P_c) wurde analog der Vorgehensweise bei der stereologischen Untersuchung der Hoden (siehe Punkt 3.2.11.1) nach Weibel (1979) berechnet:

$$P_c = \left(\frac{t_\alpha^2}{M \times d^2} \right) \times \left(\frac{1 - V_v}{V_v} \right)$$

Die stereologische Auswertung der Nierenschnitte erfolgte unter einem Durchlichtmikroskop (Olympus BX 61 mit motorisiertem Tisch, Olympus) unter Verwendung der Software CellSense. Zur Auswertung der Kontrollen und der Expositionsgruppe mit 1.000 µg/L wurde zunächst mittels der genannten Software ein Übersichtsbild (mittels Tischnavigator) erstellt. Die Nierenanschnitte wurden der Reihe nach mäanderförmig abgefahren und jedes 20igste Gesichtsfeld bei 20facher Vergrößerung zur Auswertung aufgenommen. Über jedes Gesichtsfeld wurde ein Raster gelegt. Die von den 25 Punkten des Rasters getroffenen verschiedenen Nierenzelltypen wurden ausgezählt (Protokoll A). Bei Fischen aller Versuchsgruppen erfolgte eine weitere Untersuchung zur Auswertung der neuen Nephronen die Gesamtpunktzahl durch Auswahl jedes 8. Gesichtsfeldes und die Verwendung eines 49 Punkte Rasters erhöht (Protokoll B). Zur Erhöhung der Objektivität erfolgte die Auswertung jeweils an verblindeten Präparaten.

Abbildung 13: Schätzung der Volumendichte (V_V) der verschiedenen Nierenzelltypen



5. Schritt: Unter Verwendung der Software CellSense wurde jedes 8. Gesichtsfeld mit einem Anschnitt von Nierengewebe für die stereologische Untersuchung ausgewählt. Das erste Bild wurde dabei mittels Zufallszahl zwischen 1 und 8 ermittelt.

6. Schritt: Die Ermittlung des Schätzvolumens der verschiedenen Nierenzelltypen erfolgte mittels Punktzählmethode nach Delesse (1847).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Die Volumendichte von Melanomakrophagen in der Niere wurde zusätzlich separat mittels Bildanalyse (Software CellSense) ermittelt. Hierfür wurden dieselben Gesichtsfelder verwendet wie bei der oben genannten Punktzählmethode. Die Melanomakrophagen können im HE-gefärbten Schnitt der Niere aufgrund ihres schwarzen Erscheinungsbildes leicht von den anderen Strukturen unterschieden werden. Zunächst wurden mit der Bildanalysesoftware HSV-Schwellenwerte (Hue, Saturation, Value) jeweils für Farbton, Sättigung und Intensitätswert von Melanomakrophagen bestimmt (Tabelle 19). Diese Schwellenwerte wurden als Vorlage gespeichert und nachfolgend bei allen Analysen verwendet.

Tabelle 19: HSV-Schwellenwerte zur Volumenbestimmung von Melanomakrophagen

Parameter	Minimaler Schwellenwert	Maximaler Schwellenwert
Farbton	334	340
Sättigung	65	256
Intensitätswert	13	178

HSV: Hue, Saturation, Value.

Bei der Auswertung der einzelnen Gesichtsfelder wurde für jedes einzelne Bild eine Maske (Roi) angefertigt, mit deren Hilfe alle nicht zur Niere gehörigen Strukturen ausgeblendet wurden. Innerhalb des ausgewählten Bereiches wurden alle Strukturen, deren Parameter innerhalb der gesetzten Schwellenwerte lagen, markiert und deren Flächenanteil prozentual bestimmt. Aus

dem prozentualen Flächenanteil ergab sich das Schätzvolumen der Melanomakrophagen in der Niere $V_{V(Melanomakrophagen)}$.

Schätzung des Nierenvolumens

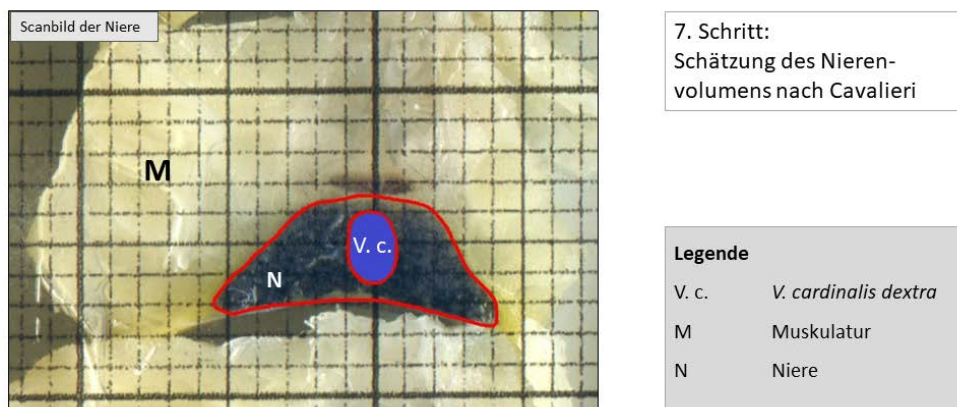
► Schätzung des Nierenvolumens nach Cavalieri (1635)

Für die Schätzung des Nierenvolumens (V_{Niere} , Referenzvolumen) wurde die stereologische Methode nach Cavalieri verwendet (Gundersen und Jensen 1987; Cavalieri 1635). Das Volumen (V) eines Körpers wird bei dieser Methode geschätzt, indem alle Anschnittsflächen eines Körpers (A) summiert und mit dem Intervallabstand zwischen den Lamellen (T) multipliziert werden (Howard und Reed 2010):

$$V = T \times \sum_{i=1}^m A_i$$

Die Messung der kaudalen Anschnittsflächen aller Nieren-Lamellen eines Fisches erfolgte planimetrisch mittels der Software CellSense durch Auswertung der Scanbilder der auf einer Klarsichtfolie mit Millimeterpapier-Aufdruck positionierten Nieren-Lamellen (Abbildung 14). Hierbei wurden die Anschnittsflächen der Niere ohne die *Vena cardinalis dextra* (Lumen und Gefäßwand) erfasst. Der reale Intervallabstand (nominal 5 mm) zwischen den Lamellen wurde durch Division der Gesamtnierenlänge (h) durch die Gesamtzahl der Nierenlamellen mit kaudaler Anschnittsfläche berechnet ($N-1$).

Abbildung 14: Schätzung des Nierenvolumens für die stereologische Auswertung



7. Schritt: Unter Verwendung der Software CellSense wurden die Anschnittsflächen aller Nierenlamellen ohne die *V. cardinalis dextra* anhand des Scanbilds der Nierenlamellen ($N-1$) ermittelt.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Überprüfung der Präzision der Volumenschätzung

Die Präzision der Volumenschätzung wurde exemplarisch bei der Kontrolle des Replikat A ($n = 10$) durch Berechnung des Fehlerkoeffizienten (Coefficient of Error, CE) nach Gundersen und Jensen (1987) überprüft. Bei dieser Berechnung des CEs wird berücksichtigt, dass die Messungen (n) von aufeinanderfolgenden, äquidistanten Schnitten, $a_1, a_2, \dots, a_i, \dots, a_n$ erfolgten.

Für die Berechnung wurden neben der Summe der äquidistanten Schnitte ($\sum a_i$) drei weitere Summen benötigt:

$$A = \sum_{i=1}^n a_i \times a_i$$

$$B = \sum_{i=1}^{n-1} a_i \times a_{i+1}$$

$$C = \sum_{i=1}^{n-2} a_i \times a_{i+2}$$

Der CE der Schätzung des Nierenvolumens nach Cavalieri wurde anhand dieser Summen folgendermaßen berechnet (Gundersen und Jensen 1987):

$$CE = \sqrt{\left(\frac{3A + C - 4B}{12}\right) \times \frac{1}{\sum a_i}}$$

Bestimmung der Absolutvolumina der verschiedenen Nierenzelltypen

Anhand der Schätzvolumina ($V_{V(Nierenzelltyp)}$) der verschiedenen Nierenzelltypen und des mittels der Methode nach Cavalieri geschätzten absoluten Nierenvolumens ($V_{(Niere)}$) wurde deren jeweiliges Absolutvolumen ($V_{(Nierenzelltyp)}$) berechnet (Howard und Reed 2010):

$$V_{(Nierenzelltyp)} = V_{V(Schätzvolumen\ Nierenzelltyp)} \times V_{(Niere)}$$

Das relative Nierenvolumen $V_{(relativ, Niere)}$ wurde aus dem absoluten Nierenvolumen unter Berücksichtigung des Körpergewichts (KGM) des Fisches wie folgt berechnet:

$$V_{(relativ, Niere)} = V_{(Niere)}(in\ mm^3) \times KGM\ (in\ g)$$

3.2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computer-Programm "IBM SPSS Statistics 22". Zunächst wurden die Werte der Stichproben innerhalb der einzelnen Gruppen auf Normalverteilung geprüft (Test nach Shapiro-Wilks). Bei Normalverteilung der Werte der Stichproben wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (Post-Hoc Test nach Dunnett-T bzw. Bonferroni) mit gleichzeitiger Prüfung der Varianzhomogenität nach Levene verwendet. War die Varianzhomogenität nicht gegeben oder waren die Werte der Stichproben innerhalb einer Gruppe nicht normalverteilt, wurden nicht-parametrische Tests durchgeführt (Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur bzw. Mann-Whitney-U-Test). Für alle errechneten Mittelwerte wird die Standardabweichung (SD) angegeben (SD < 10: zwei Dezimalstellen; SD ≥ 10: ganze Zahl).

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Teilversuch Nr. 1: Exposition von subadulten Regenbogenforellen in Guanylurea

3.3.1.1 Chemisch-physikalische Wasserparameter

Die Ergebnisse der Bestimmung chemisch-physikalischer Wasserparameter während des Versuchszeitraums sind in der nachfolgenden Tabelle 20 zusammengefasst dargestellt (weiterführende Daten zu einzelnen Versuchsaquarien in Tabelle 35 im Anhang B.5).

Tabelle 20: Chemisch-physikalische Wasserparameter (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Parameter	Messergebnisse
Wassertemperatur ¹ (°C)	11,98 ± 0,10
Leitfähigkeit ¹ (µS/cm)	192,67 ± 0,98
pH-Wert ¹	7,11 ± 0,03
Gelöster Sauerstoff ² (mg/L)	9,56 ± 0,28
Sauerstoffsättigung ³ (%)	94
Wassertemperatur ² (°C)	12,46 ± 0,20
Ammonium-Stickstoff ² (mg/L)	0,3 ± 0,03
Ammoniak-Stickstoff ⁴ (µg/L)	0,76 ± 0,11

Die Messung von Wassertemperatur, Leitfähigkeit, pH-Wert sowie der Sauerstoffkonzentration erfolgte kontinuierlich. Die Ammonium-Stickstoff-Konzentration wurde mindestens einmal wöchentlich in jedem Versuchsaquarium gemessen ($n_{\text{Gesamt}} = 77$). Daten: Mittelwerte aller Versuchsaquarien ± SD.

¹ Nach Wasseraufbereitung.

² Im Ablauf der Versuchsaquarien.

³ Einzelwert, berechnet aus dem Mittelwert des gesamten Versuchszeitraums.

⁴ berechnet.

3.3.1.2 Chemische Analyse der Testsubstanz Guanylurea

Die realen Wasserkonzentrationen von Guanylurea sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Bei den Expositionsgruppen mit 0,1 µg/L und 500 µg/L Guanylurea überschritten die prozentualen Abweichungen der realen von den nominalen Testkonzentrationen mit 28 % bzw. 22 % den in aktuellen Anforderungen der OECD zur Toxizitätsprüfung an Fischen (OECD 2014) empfohlenen Wert von 20 %. Daher wird bei diesen Expositionsgruppen nachfolgend die reale anstatt der nominalen Testkonzentration von Guanylurea angegeben. Bei der Expositionsgruppe mit 0,1 µg/L entspricht dies gerundet ebenfalls 0,1 µg/L. Die nominale Expositionskonzentration von 500 µg/L wird im Folgenden durch Angabe der realen Konzentration von 390 µg/L ersetzt.

Tabelle 21: Reale Testkonzentrationen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Nominalkonzentration Guanylurea (in µg/L)	Mittelwert realer Konzentrationen (in µg/L)	Differenz reale und nominale Konzentration (in µg/L)	Wiederfindungsrate (in %)
Kontrolle	< NG	-	-
0,1	0,1275	0,0275	128
1	0,95	-0,05	95
10	8,55	-1,45	86
50	43	-7	86
100	80,25	-19,75	80
500	390	-110	78
1.000	905	-95	91

Für jeden Testansatz erfolgte insgesamt 4x eine Bestimmung der realen Konzentrationen von Guanylurea ($n_{\text{Gesamt}} = 32$). NG: Nachweisgrenze.

3.3.1.3 Versuchsbeobachtungen

Es traten während der gesamten Versuchsdauer von Teilversuch Nr. 1 keine expositionsbedingten Mortalitäten auf. Bei den Versuchsfischen wurden darüber hinaus keine Hinweise auf stoffbedingte Veränderungen des Verhaltens oder äußerliche pathologische Veränderungen festgestellt. Die Atemfrequenz der Versuchsfische lag im Durchschnitt bei 64 ± 5 x/min. Diesbezüglich wurden keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen oder Veränderungen im Versuchsverlauf festgestellt (siehe Tabelle 36 im Anhang B.5).

3.3.1.4 Biometrische Daten

► Körpergewicht

Präexpositionell wiesen die subadulten, männlichen Regenbogenforellen ein durchschnittliches Körpergewicht von 384 ± 43 g, die weiblichen Regenbogenforellen von 381 ± 35 g auf. Die durchschnittliche Gewichtszunahme pro Versuchsfisch während der 28-tägigen Expositionszeit betrug bei Männchen 34 ± 24 g und bei Weibchen 27 ± 21 g. Im Anschluss an die Exposition lag das Gewicht der Männchen bei durchschnittlich 418 ± 50 g, bei den Weibchen hingegen bei 408 ± 39 g. Es wurden weder bei Männchen noch bei Weibchen signifikante Abweichungen bei der Gewichtszunahme oder dem Körpergewicht zwischen den Kontroll- und den Expositionsgruppen festgestellt (Tabelle 37 im Anhang B.5).

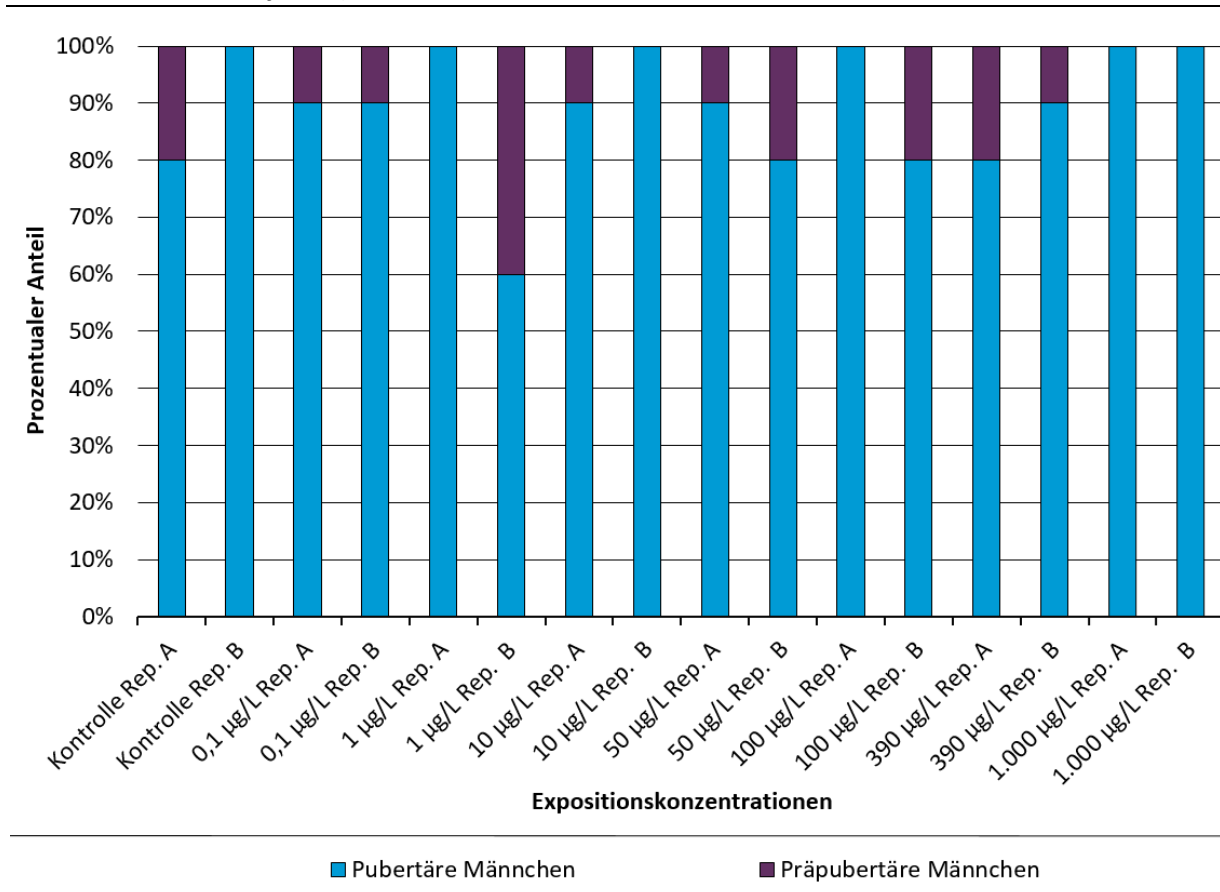
► Standardlänge

Vor der Exposition wiesen die Männchen eine durchschnittliche Standardlänge von $33,5 \pm 1,28$ cm und die Weibchen von $33,4 \pm 1,07$ cm auf. Bei beiden Geschlechtern wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und den Expositionsgruppen festgestellt (Tabelle 38 im Anhang B.5).

► Gonadengewichte

Insgesamt betrug das Gewicht der Hoden pro Versuchsfisch durchschnittlich 10.233 ± 4.998 mg (Tabelle 40 im Anhang B.5). Dabei wurden die Hoden von 17 der 160 (11 %) männlichen Versuchsfische als präpubertär eingestuft. Bei 143 männlichen Tieren (89 %) handelte es sich um pubertäre Männchen (Tabelle 39 im Anhang B.5). Diese Ergebnisse ergaben keine Korrelation zwischen dem Reifegrad des Hodengewebes und der Höhe der Expositionskonzentration (Abbildung 15).

Abbildung 15: Geschlechtsreife männlicher subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



In jedem Aquarium befanden sich 10 männliche Regenbogenforellen. Die Gesamtanzahl der Männchen ($n = 160$) umfasste pubertäre ($n = 143$) und präpubertäre Männchen ($n = 17$). Rep.: Replikat.

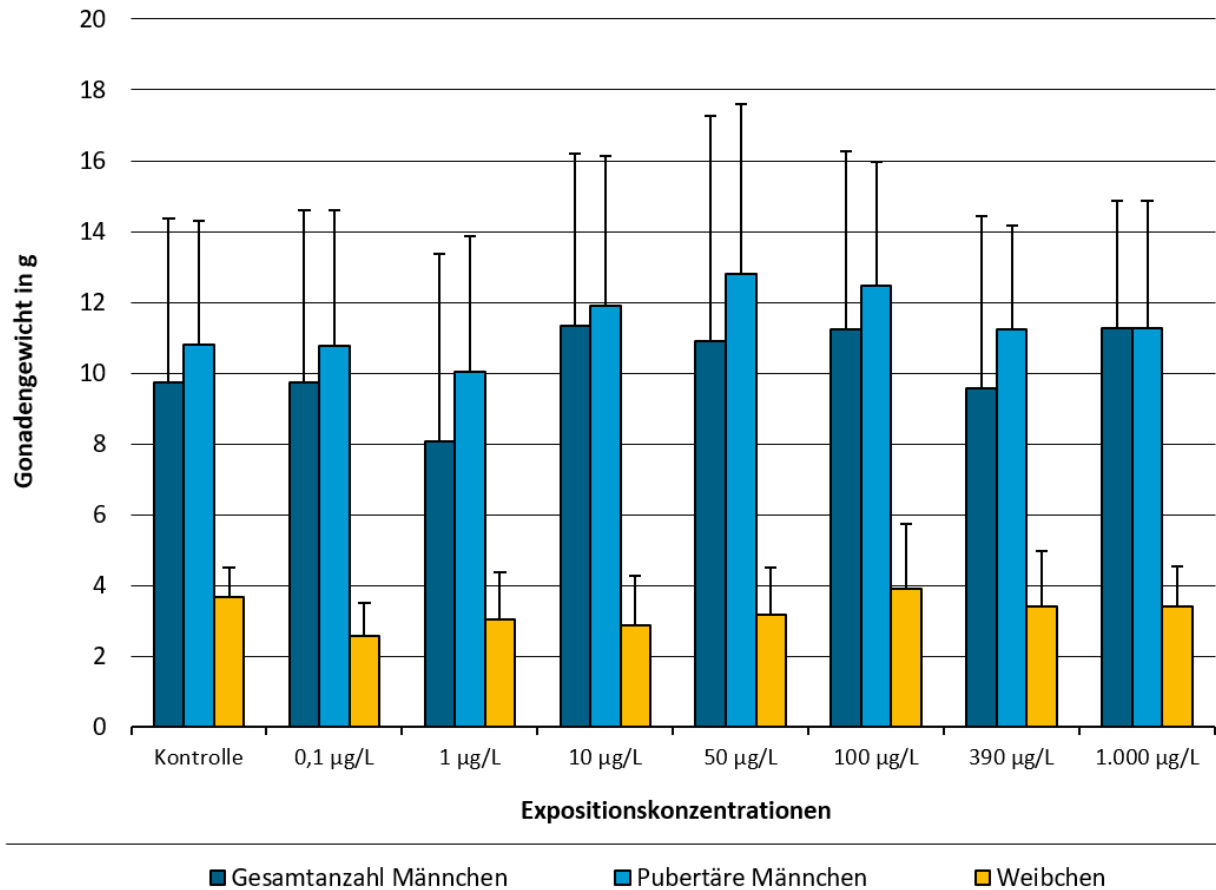
Quelle: Eigene Darstellung, LfU

Die juvenilen Hoden der 17 präpubertärer Männchen wiesen ein durchschnittliches Gesamtgewicht pro Versuchsfisch von 197 ± 100 mg auf. Bei den 143 männlichen, pubertären Versuchsfischen befand sich der Hoden im Stadium der Spermatogenese. Hier betrug das Gesamtgewicht der Hoden pro Versuchsfisch durchschnittlich 11.426 ± 3.805 mg (Tabelle 39 im Anhang B.5). Die linken Hoden wiesen mit durchschnittlich 5.736 ± 1886 mg ein vergleichbares Gewicht zu den rechten Hoden mit 5.678 ± 2.131 auf. Bei den Männchen wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gonadengewichtes zwischen Kontroll- und Expositionsgruppen nachgewiesen (Abbildung 16).

Bei weiblichen Versuchsfischen wurde ein mittleres Gesamtgewicht der Ovarien pro Fisch von 3.257 ± 1.364 mg ermittelt ($n = 159$) (Tabelle 41 im Anhang B.5). Die linken Ovarien waren mit

einem Gewicht von 1.721 ± 746 mg etwas schwerer als die rechten Ovarien mit 1.556 ± 695 mg. Ausschließlich bei Weibchen aus der Expositionsgruppe mit $0,1 \mu\text{g/L}$ wurde für die rechten Ovarien ein signifikant ($p = 0,008$) geringeres Gewicht als bei den Kontrollfischen festgestellt. Darüber hinaus wurden bei den Weibchen der anderen Expositionskonzentrationen keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollfischen festgestellt.

Abbildung 16: Gonadengewichte subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



Daten: Mittelwerte des Gesamtgewichts der Gonaden pro Fisch mit SD. Die dargestellten Daten umfassen die Gesamtanzahl der Männchen ($n = 160$) sowie pubertäre Männchen ($n = 143$) und Weibchen ($n = 159$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Lebergewicht

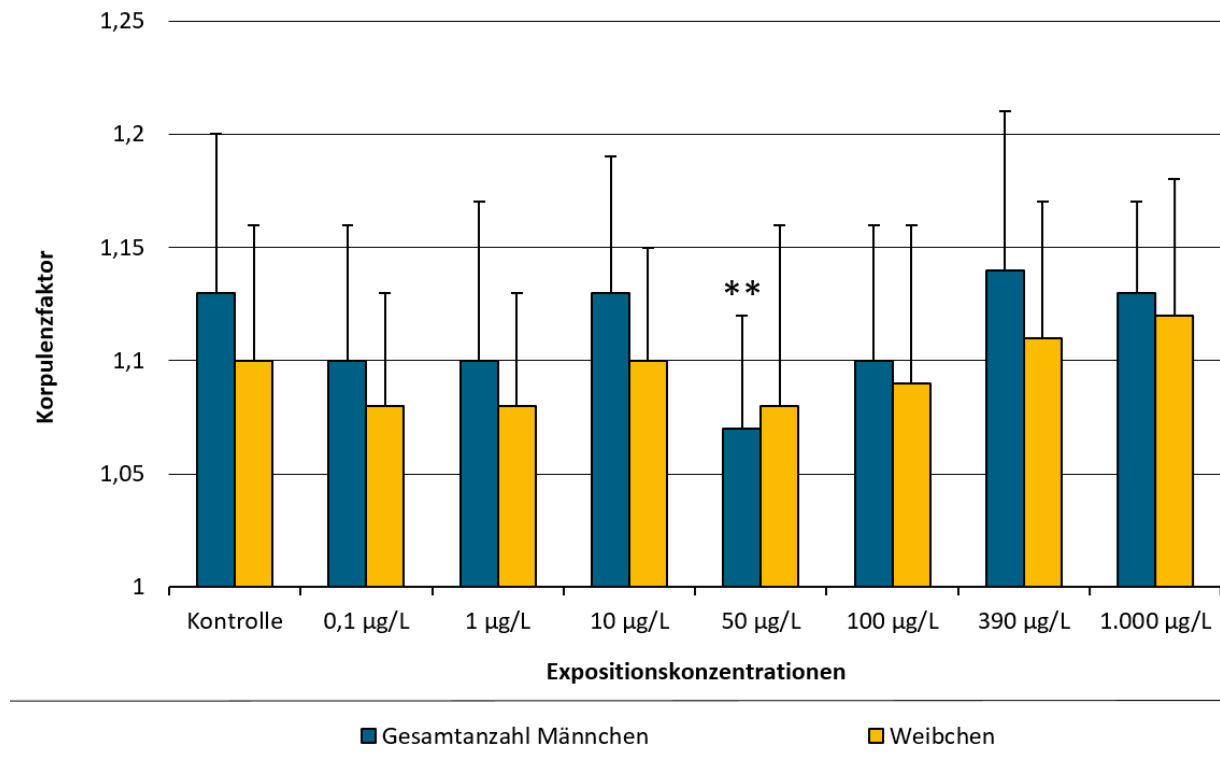
Im Teilversuch Nr. 1 wurde für alle Versuchsfische ein durchschnittliches Lebergewicht von $3,22 \pm 0,80$ g ($n = 160$) ermittelt. Bei männlichen Regenbogenforellen war die Leber mit durchschnittlich $3,63 \pm 0,80$ g etwas schwerer als bei weiblichen Regenbogenforellen mit $2,81 \pm 0,56$ g (Tabelle 42 im Anhang B.5). Es wurden unabhängig vom Geschlecht keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Expositionsgruppen festgestellt.

3.3.1.5 Biologische Indices

► Korpulenzfaktor

Der Korpulenzfaktor betrug bei allen Versuchsfischen durchschnittlich $1,10 \pm 0,06$ ($n = 320$). Zwischen männlichen ($n = 160$, $1,11 \pm 0,06$) und weiblichen ($n = 160$, $1,09 \pm 0,06$) Fischen bestanden keine relevanten Unterschiede (Tabelle 43 im Anhang B.5). Ausschließlich bei männlichen Versuchsfischen der 50 µg/L-Versuchsgruppe war der Korpulenzfaktor jedoch signifikant ($p = 0,003$) niedriger als bei den Kontrollfischen (Abbildung 17).

Abbildung 17: Korpulenzfaktoren subadulte Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



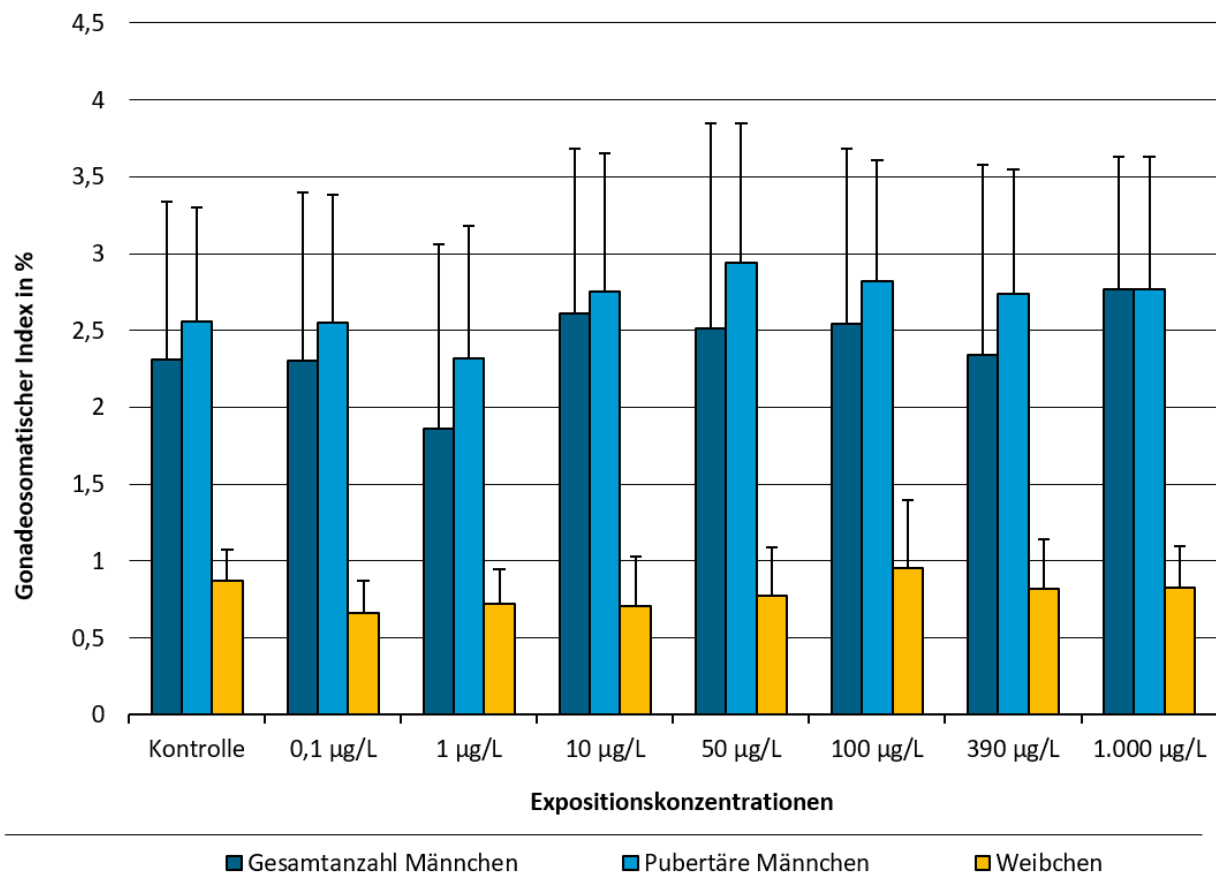
Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen die Gesamtanzahl der Männchen ($n = 160$) und Weibchen ($n = 160$). **: $p \leq 0,01$.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Gonadosomatischer Index (GSI)

Bei Betrachtung der Gesamtzahl männlicher Versuchsfische lag der GSI mit durchschnittlich $2,41 \pm 1,13$ ($n = 160$) niedriger als bei pubertären Männchen mit Hoden in Spermatogenese ($2,69 \pm 0,84$, $n = 143$) (Abbildung 18). Die weiblichen Versuchsfische wiesen einen mittleren GSI von $0,79 \pm 0,31$ ($n = 159$) auf (Tabelle 43 im Anhang B.5). Weder bei den Weibchen noch bei den Männchen wurden signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Expositionsgruppen festgestellt.

Abbildung 18: Gonadosomatische Indices subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen die Gesamtanzahl der Männchen ($n = 160$) sowie pubertäre Männchen ($n = 143$) und Weibchen ($n = 159$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Hepatosomatischer Index (HSI)

Im Teilversuch Nr. 1 betrug der HSI bei den Männchen durchschnittlich $0,70 \pm 0,12$ und bei den Weibchen $0,91 \pm 0,17$ (Tabelle 43 im Anhang B.5). Es wurden für beide Geschlechter keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Expositionsgruppen festgestellt.

3.3.1.6 Klinische Chemie

Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse der klinischen Chemie befindet sich in der Tabelle 44 im Anhang B.5. Die Untersuchung der Aktivitäten der Plasmaenzyme ergab in der Regel keine Unterschiede zwischen den Tieren der Kontroll- sowie der Expositionsgruppen. Ausschließlich die Aktivität der ALP war bei Fischen, die 100 µ/L Guanylurea ausgesetzt waren, gegenüber den Kontrolltieren signifikant reduziert (72 ± 15 U/L vs. 63 ± 21 U/L, $p = 0,025$). Die Gehalte von Cholesterol (169 ± 19 vs. 155 ± 20 , $p = 0,019$), HDL ($77 \pm 8,52$ vs. $72 \pm 9,81$, $p = 0,035$) und Triglyceriden (247 ± 35 vs. 211 ± 35 , $p = 0,002$) waren bei Regenbogenforellen der 50 µg/L-Expositionsgruppe signifikant erniedrigt. Gegenüber Kontrolltieren signifikant niedrigere Triglyceride-Werte wiesen auch Regenbogenforellen nach Exposition mit 0,1 µg/L (200 ± 36 , $p = 0,000$) und 1 µg/L (218 ± 51 , $p = 0,028$) auf. Bezüglich der Harnstoff-Werte wurde eine ansteigende Tendenz festgestellt. Bei den in 390 µg/L ($1,42 \pm 0,83$ mg/dL, $p = 0,009$) und

1.000 µg/L Guanylurea ($1,19 \pm 0,36$ mg/dL, $p = 0,019$) exponierten Versuchsfischen war die Zunahme gegenüber den Kontrollfischen ($1,00 \pm 0,00$ mg/dL) signifikant.

3.3.1.7 Hämatologie

Die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen werden detailliert in Tabelle 45 im Anhang B.5 dargestellt. Hinsichtlich der Hämoglobin-Konzentration und der Gesamterythrozytenzahl wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und den Expositionsgruppen ermittelt. Der Hämatokrit war bei Fischen nach Exposition in 390 µg/L mit $64 \pm 7,51$ % gegenüber den Kontrollfischen mit $56 \pm 5,97$ % signifikant ($p = 0,008$) erhöht. Von den Erythrozytenindices war der MCV in der 1 µg/L-Expositionsgruppe (462 ± 98 µm³ vs. 429 ± 119 µm³, $p = 0,047$) signifikant erhöht. Der MCHC erwies sich bei Fischen nach Exposition in 10 µg/L ($15,6 \pm 1,02$ g/dL, $p = 0,021$) und 390 µg/L ($15,2 \pm 1,40$ g/dL, $p = 0,025$) als signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrolle ($16,2 \pm 0,96$ gHb/dL). Hinsichtlich des MCH ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Test- und Kontrolltieren. Die Gesamtzahl der Leukozyten war bei Regenbogenforellen nach Exposition in 10 µg/L im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant reduziert ($30,7 \pm 7,53$ 10³/µL vs. $22,6 \pm 5,70$ 10³/µL, $p = 0,004$). Die Auswertung des Differentialblutbildes ergab eine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils stabkerniger Granulozyten nach Exposition in 0,1 µg/L Guanylurea ($1,45 \pm 1,23$ % vs. $0,6 \pm 0,68$ %, $p = 0,022$).

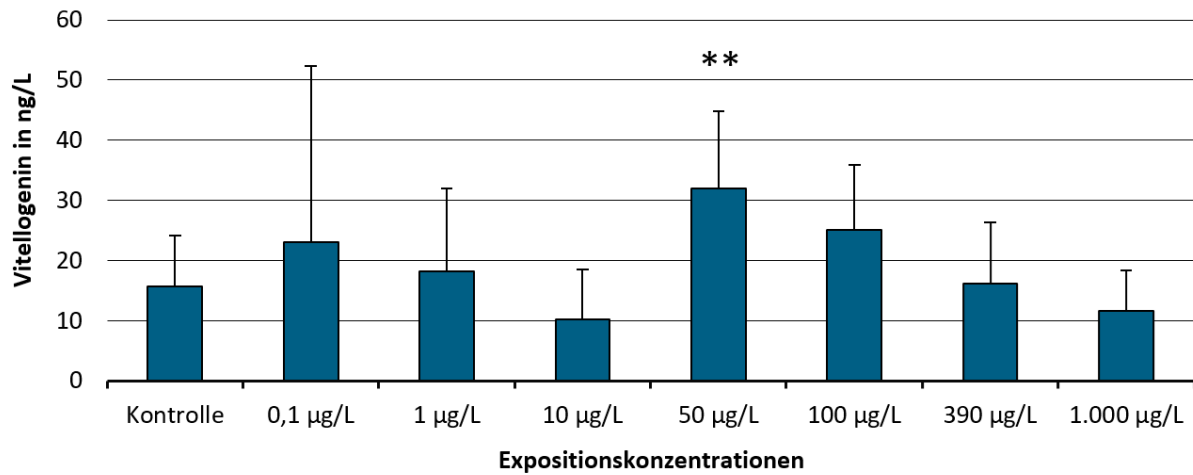
3.3.1.8 Serologische Untersuchungen (Biomarker)

► Männchen

Bei den männlichen Versuchsfischen wurde zunächst überprüft, ob die Konzentrationen der verschiedenen Biomarker im Blut der Fische mit dem Reifegrad des Hodengewebes korrelierten. Hierbei wurde für Testosteron ($p = 0,000$), 11-Ketotestosteron ($p = 0,000$) sowie den Hormonquotienten aus Estradiol und Testosteron (E2/Ts) ($p = 0,000$) eine deutliche Korrelation nachgewiesen. Die Konzentrationen von Vitellogenin ($p = 0,123$), 17β-Estradiol (E2) ($p = 0,718$), und Aromatase ($p = 0,437$) zeigten hingegen keine signifikante Abhängigkeit vom gonadalen Reifegrad. Dementsprechend wurden die Werte für Vitellogenin, E2 und Aromatase für alle Männchen zusammengefasst ausgewertet. Bezüglich der Konzentrationen von Testosteron und 11-Ketotestosteron sowie des Hormonquotienten E2/Ts erfolgte darüber hinaus eine separate Betrachtung der Werte pubertärer männlicher Tiere.

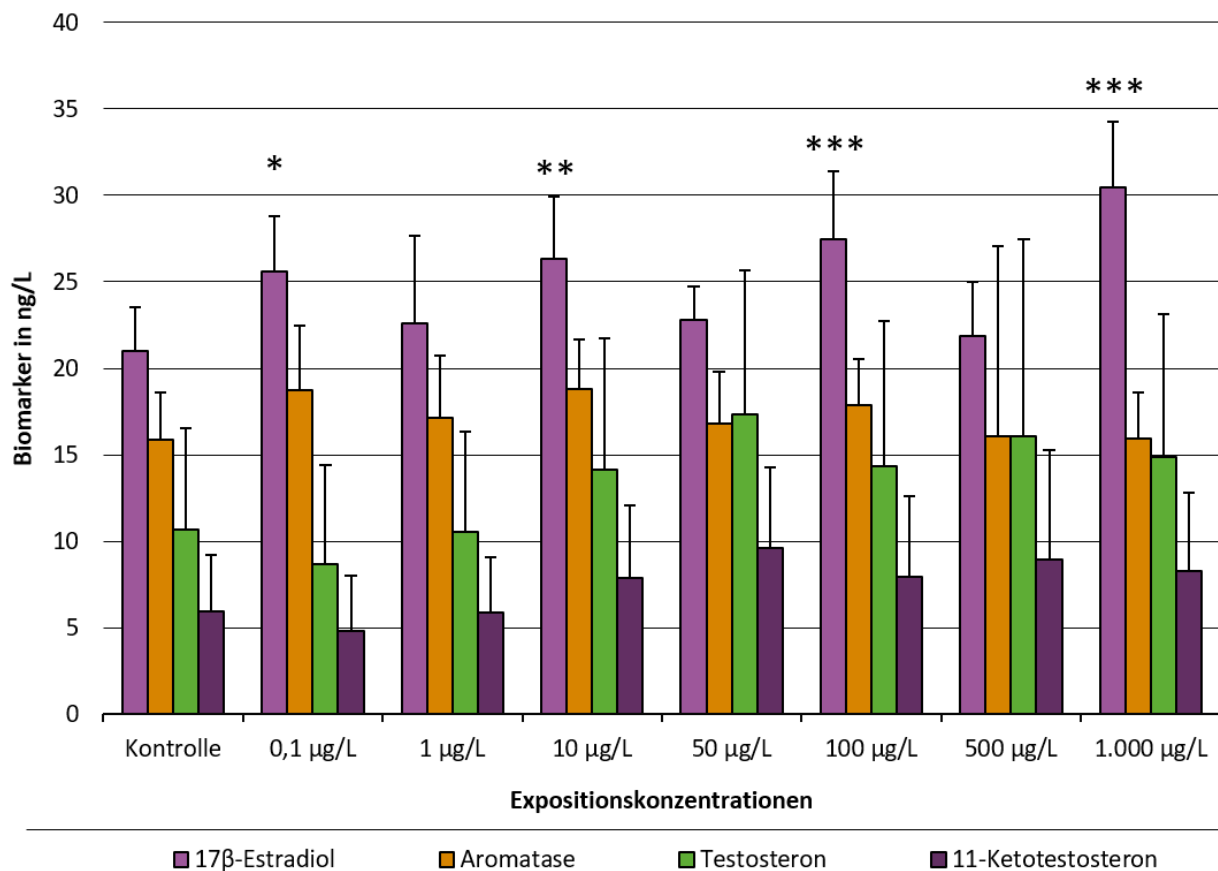
Die Auswertung der Gesamtzahl männlicher Regenbogenforellen ergab bei Fischen die 50 µg/L Guanylurea ausgesetzt wurden, eine gegenüber Kontrolltieren signifikante ($p = 0,002$) erhöhte Vitellogenin-Konzentration (Abbildung 19). Diese Erhöhung entsprach einer 2,2fachen Induktion der Vitellogenin-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Darüber hinaus zeigten männliche Versuchsfische, die in 0,1 µg/L ($p = 0,016$), 10 µg/L ($p = 0,002$), 100 µg/L ($p = 0,000$) oder 1.000 µg/L ($p = 0,000$) Guanylurea exponiert wurden, eine signifikante Zunahme der Estradiol-Konzentration im Blutplasma (Abbildung 20). Die Werte für Aromatase, Testosteron und 11-Ketotestosteron sowie der Hormonquotient E2/Ts (Abbildung 21) zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen. Die detaillierten Messergebnisse der serologischen Untersuchung sind in Tabellen 46-48 im Anhang B.5 zusammengefasst.

Abbildung 19: Vitellogenin-Konzentration bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



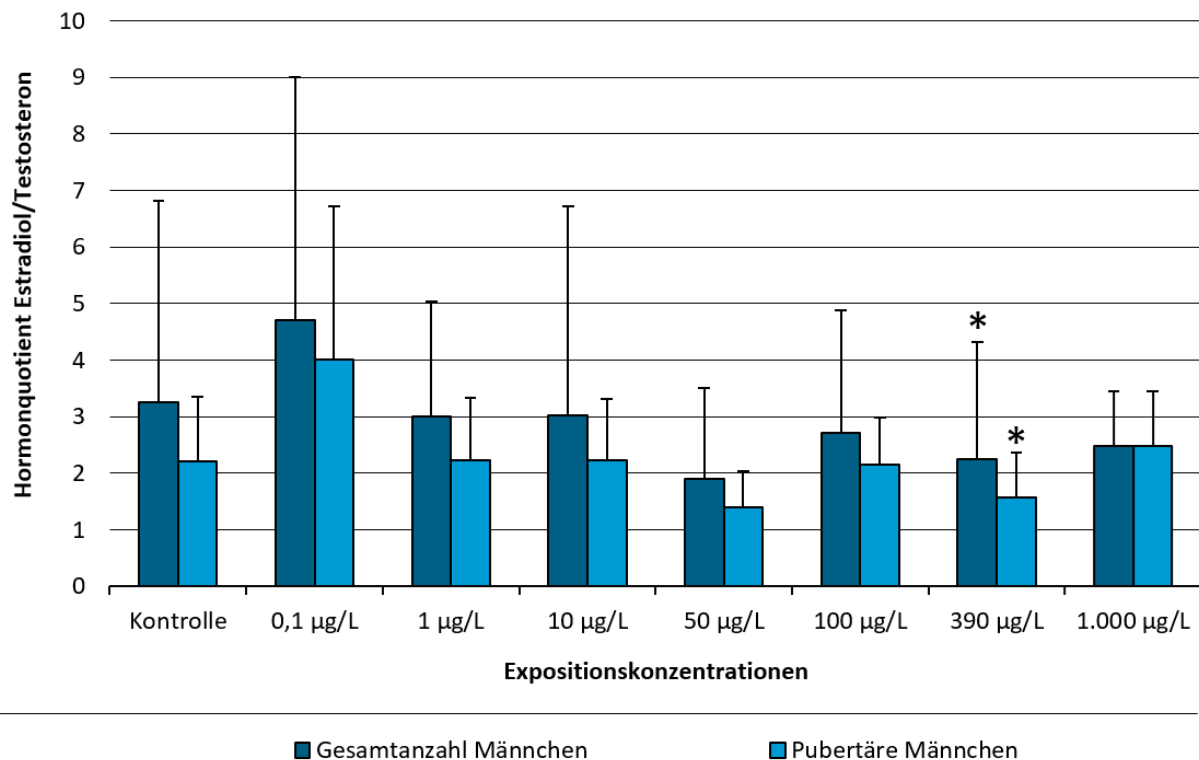
Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Ergebnisse umfassen alle männlichen Versuchsfische ($n = 160$). **: $p \leq 0,01$.
Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Abbildung 20: Biomarker bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Ergebnisse umfassen alle männlichen Versuchsfische ($n = 160$). *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.
Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Abbildung 21: Hormonquotienten von Estradiol/Testosteron bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



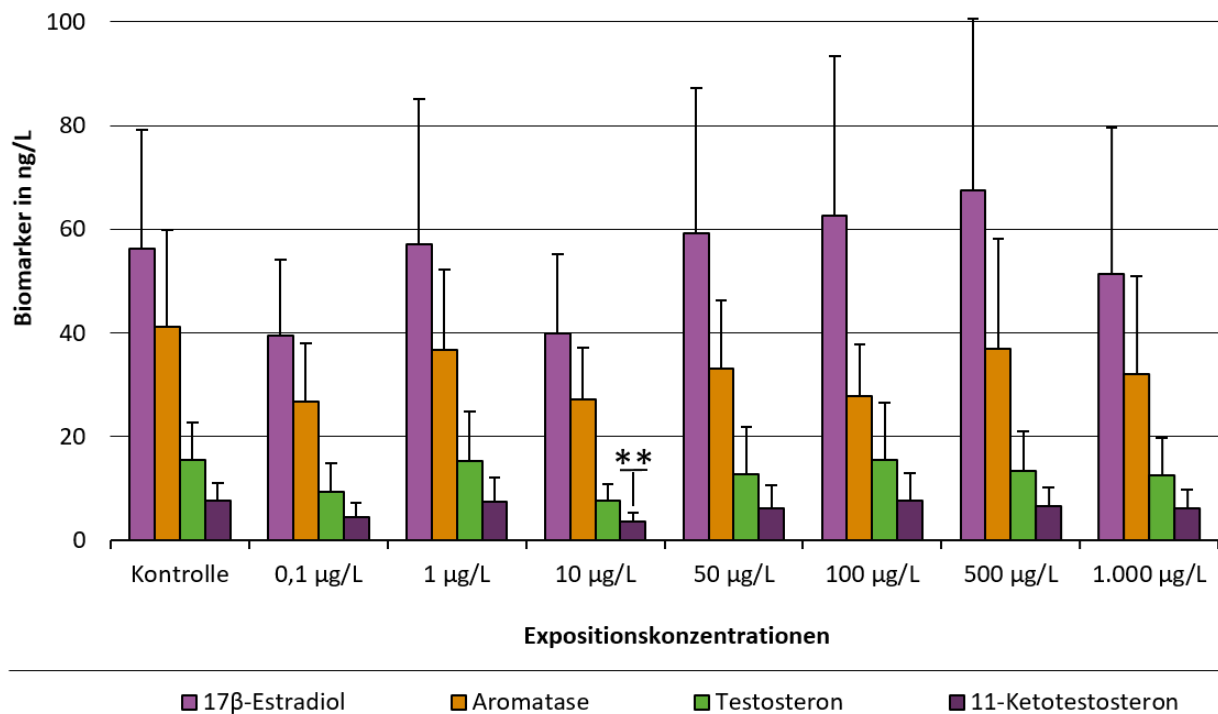
Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Ergebnisse umfassen die Gesamtzahl männlicher Versuchsfische ($n = 160$) sowie pubertäre Männchen ($n = 143$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Weibchen

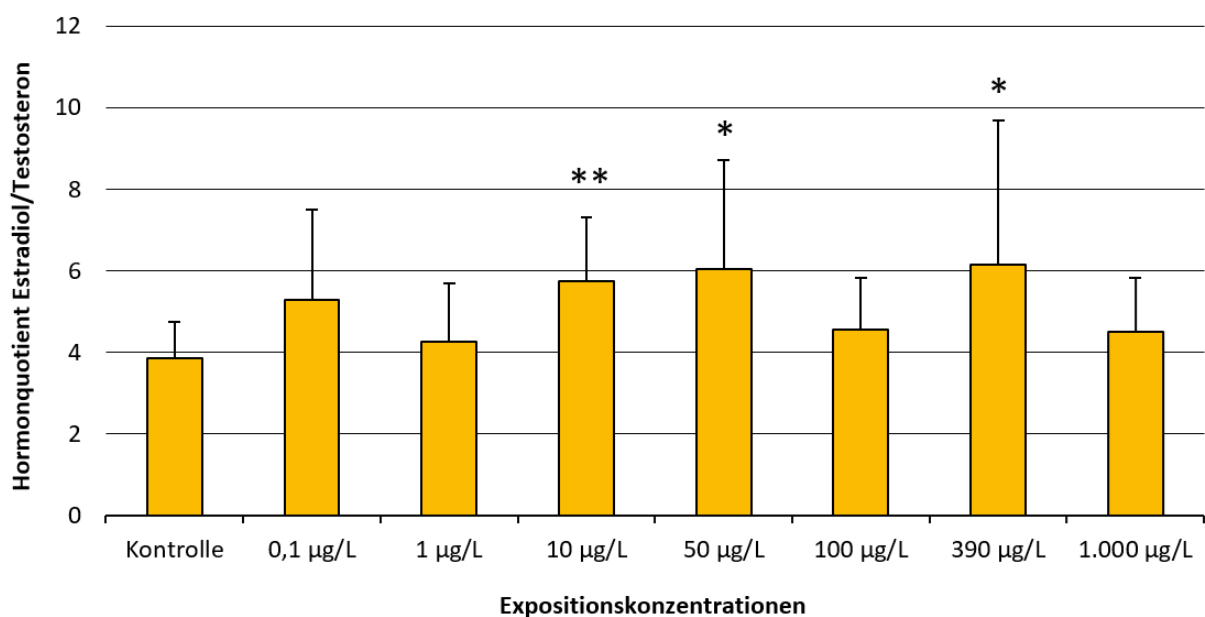
Bei den weiblichen, Guanylurea-exponierten Regenbogenforellen wurden hinsichtlich der Konzentrationen von Aromatase, Estradiol und Testosteron keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zu den Kontrollfischen festgestellt. Ausschließlich bei weiblichen Individuen, die in 10 µg/L Guanylurea exponiert wurden, zeigte sich eine signifikante ($p = 0,006$) Konzentrationsabnahme für 11-Ketotestosteron (Abbildung 22). Der Hormonquotient von Estradiol /Testosteron war hingegen bei Fischen, die 10 µg ($p = 0,004$), 50 µg ($p = 0,030$) und 390 µg ($p = 0,022$) Guanylurea/L ausgesetzt waren, gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abbildung 23). Die Messergebnisse der serologischen Untersuchung sind in Tabelle 49 im Anhang B.5 zusammengefasst.

Abbildung 22: Biomarker bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Ergebnisse umfassen alle weiblichen Versuchsfische ($n = 160$). **: $p \leq 0,01$.
Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Abbildung 23: Hormonquotienten von Estradiol/Testosteron bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Ergebnisse umfassen alle weibliche Versuchsfische ($n = 160$). *: $p \leq 0,05$;
**: $p \leq 0,01$.
Quelle: Eigene Abbildung, LfU

3.3.1.9 Qualitative und semiquantitative Histopathologie

► Innere Organe

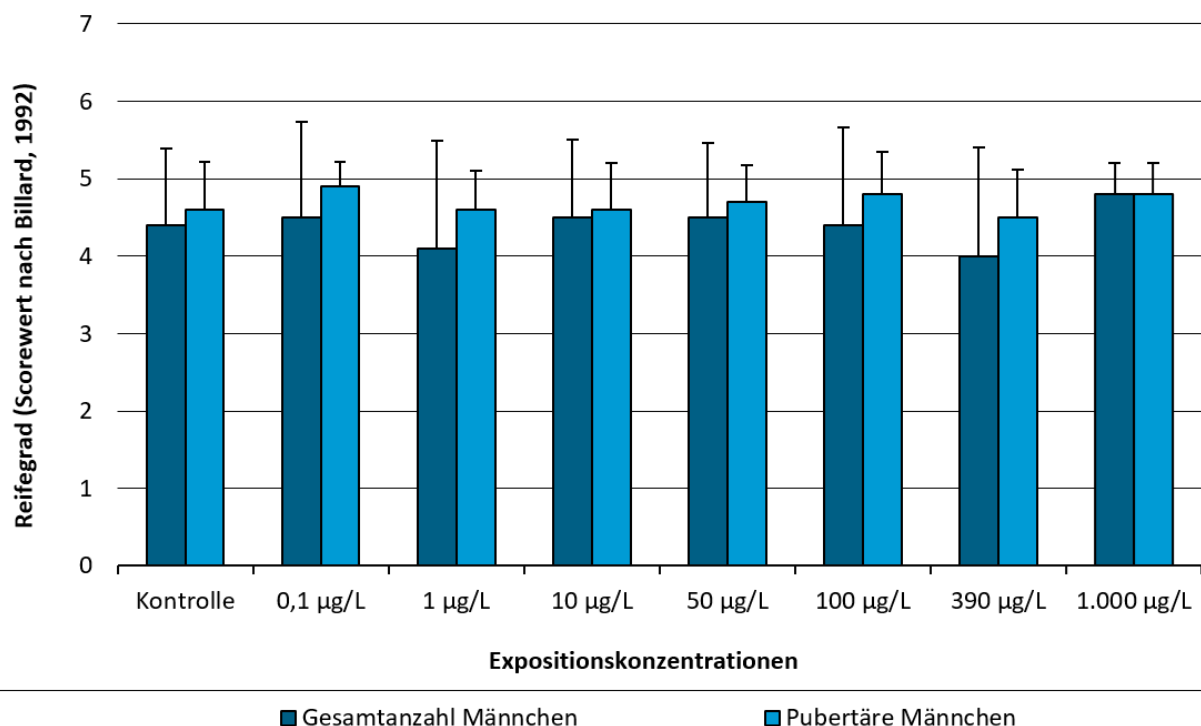
Die semiquantitative histologische Untersuchung der Niere ergab nach Exposition in Guanylurea eine tendenzielle Abnahme neuer Nephronen. Der durchschnittliche Scorewert nahm von $1,1 \pm 0,72$ bei der Kontrolle auf $0,8 \pm 0,40$ ab. Eine Ausnahme bildeten die Tiere der $390 \mu\text{g/L}$ -Versuchsgruppe. Hier lag der Scorewert bei $1,0 \pm 0,61$. Auch im Rahmen der stereologischen Untersuchung wurde diese Abnahme neuer Nephronen in der Niere festgestellt (Punkt 3.3.1.10).

Die anderen untersuchten Organe wiesen keine histopathologischen Veränderungen und somit auch keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Scorewerte auf (Daten in Tabelle 50 in Anhang B.5).

► Hoden

Die histologische Ermittlung des Reifegrades der Hoden ergab im Durchschnitt bei allen Männchen ($n_{\text{Gesamt}} = 159$) einen Scorewert von $4,4 \pm 1,13$ (Abbildung 24, Daten in Tabelle 52 in Anhang B.5). Bei pubertären Fischen ($n = 143$) wiesen alle Hoden den Reifegrad 4 oder 5 auf, woraus sich ein durchschnittlicher Scorewert von $4,7 \pm 0,52$ ergab. Der mittlere Scorewert für den Reifegrad der Hoden präpubertärer Männchen ($n = 16$) betrug $1,6 \pm 1,21$. Der Reifegrad der Hoden aller Männchen wies eine statistisch hoch signifikante Korrelation zu dem Gesamthodengewicht ($p = 0,000$), sowie zu den Konzentrationen von 11-Ketotestosteron ($p = 0,000$) und Testosteron ($p = 0,000$) auf. Zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt.

Abbildung 24: Reifegrade der Hoden (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen die Gesamtanzahl männlicher Versuchsfische ($n_{\text{Gesamt}} = 159$) sowie pubertäre Männchen ($n = 143$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Darüber hinaus wurden bei keinem der untersuchten Fische histopathologische Veränderungen oder Hinweise auf endokrin disruptive Effekte an den Hoden festgestellt.

3.3.1.10 Quantitative Histopathologie die Niere (Stereologie)

► Nierenvolumina

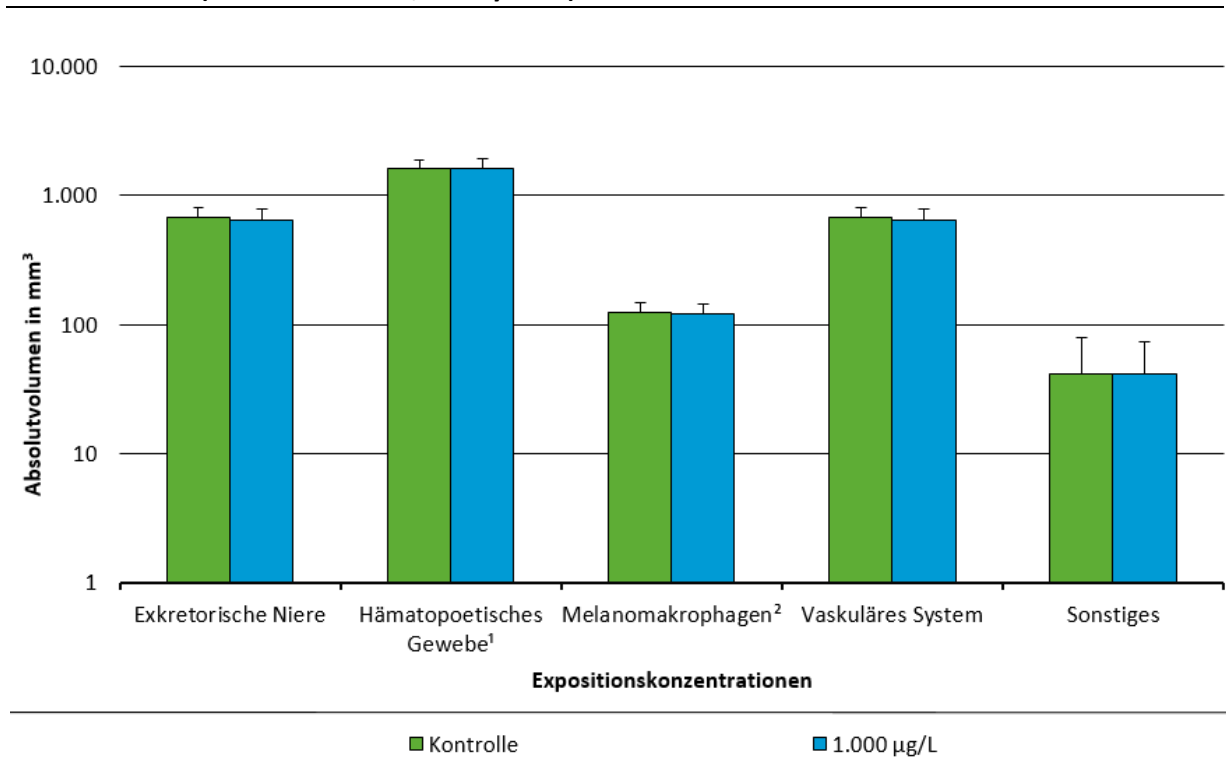
Voraussetzung für die stereologische Untersuchung der Niere stellte eine an Test- und Kontrollfischen ($n = 160$) durchgeführte, systematische Probenahme dar. Dazu wurden die Nieren mit einer mittleren Gesamtlänge von $144 \pm 6,37$ mm in durchschnittlich $28 \pm 2,17$ Lamellen (L_N) zerteilt. Der reale Intervallabstand betrug $5,1 \pm 0,34$ mm. Insgesamt hatten die Lamellen im Durchschnitt eine Anschnittsfläche von 606 ± 93 mm². Anhand dieser Daten wurde ein durchschnittliches absolutes Nierenvolumen von 3070 ± 470 mm³ errechnet. Das relative Nierenvolumen betrug im Mittel $7,23 \pm 0,88$ mm³/g KGW (Tabelle 56 im Anhang B.5). Eine statistische Analyse der Daten ergab weder hinsichtlich des absoluten noch des relativen Nierenvolumens signifikante Unterschiede zwischen den Tieren der Kontroll- und Expositionsgruppen.

Der nach Gundersen & Jensen (1987) für das absolute Nierenvolumen berechnete Fehlerquotient (CE) betrug in Replikat A der Kontrollgruppe durchschnittlich $0,76 \pm 0,25$ % (Bereich: 0,55 – 1,38 %) ($n = 10$), in Replikat A der 1.000 µg/L-Versuchsgruppe $0,88 \pm 0,20$ % (Bereich: 0,57 – 1,40 %) ($n = 10$).

► Schätz- und Absolutvolumina aller Nierenkompartimente

Die erhobenen Daten zu den Schätzvolumina der verschiedenen Nierenkompartimente sind in Tabelle 54 und Tabelle 55 im Anhang B.5 zusammengestellt. Bei jedem Versuchsfisch wurden in insgesamt 60 ± 30 Geschichtsfeldern eine durchschnittliche Gesamtpunktzahl ($P_{C \text{ Niere}}$) von 1329 ± 239 ausgezählt. Eine Überprüfung der Validität der mit dem Protokoll A erhobenen Daten ergab für die Schätzvolumina der gesamten exkretorischen Niere, des hämatopoetischen Gewebes inklusive Melanomakrophagen sowie des vaskulären Systems aller Versuchsfische ein Konfidenzintervall von ± 10 % des Mittelwertes und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (Tabelle 53 im Anhang B.5). Die Ergebnisse hinsichtlich der Schätzvolumina der *Corpuscula renalia*, Tubuli und Sammelrohre aller Versuchsfische entsprachen einem Konfidenzintervall von ± 20 % des Mittelwertes und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Die Ergebnisse zu den Schätzvolumina der neuen Nephrone ergaben auf der Basis von Protokoll A auf Grund ihres seltenen Vorkommens nur für 11 % der Versuchsfische ein Konfidenzintervall von ± 20 % des Mittelwertes und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Bei den Schätz- und Absolutvolumina der exkretorischen Niere (alle Kompartimente zusammengefasst), hämatopoetischem Gewebe (inkl. Melanomakrophagen), Melanomakrophagen, vaskulärem System und sonstigen Zellen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der 1.000 µg/L-Versuchsgruppe festgestellt (Abbildung 25).

Abbildung 25: Absolutvolumina (V) der Nierenkompartimente subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

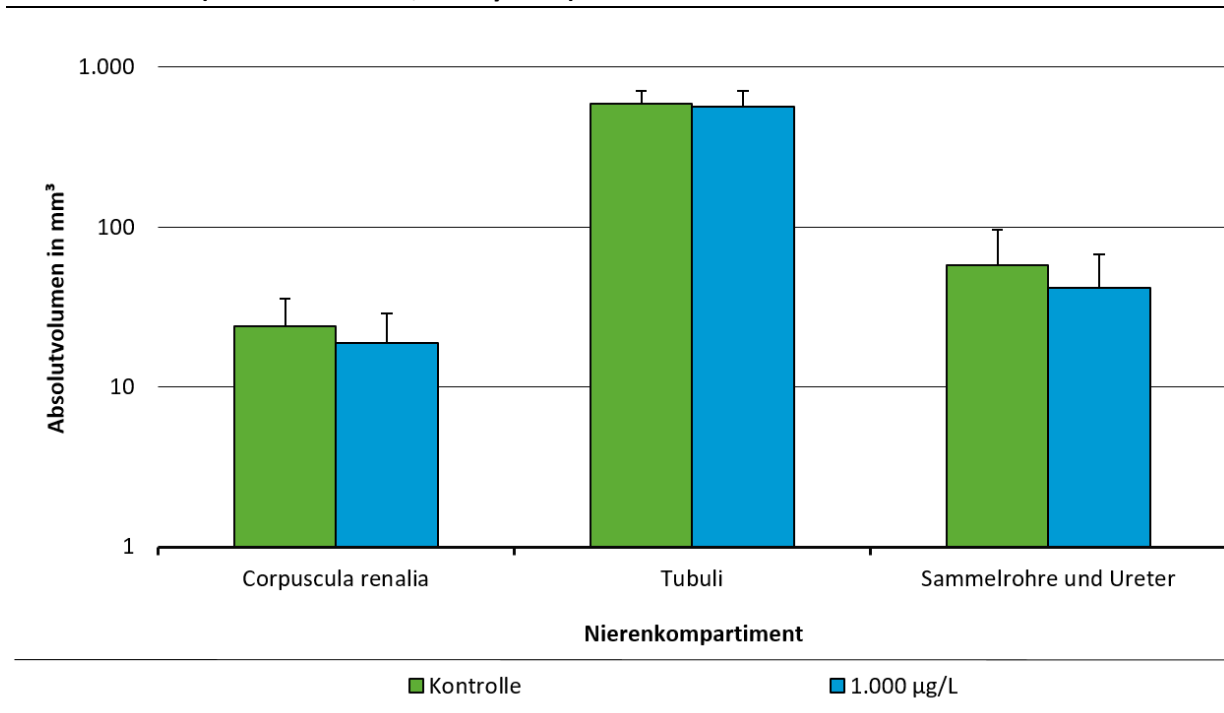


Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen alle Versuchsfische der Kontrolle und der 1.000 µg/L-Versuchsgruppe ($n = 40$). ¹inklusive Melanomakrophagen, Punktzählmethode, ²zusätzliche planimetrische Auswertung mittels HSV-Schwellenwerten.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Die Betrachtung der einzelnen funktionellen Einheiten der exkretorischen Niere ergab ausschließlich bei der 1.000 µg/L-Versuchsgruppe hinsichtlich des Schätzvolumens der neuen Nephronen eine signifikante Abnahme gegenüber der Kontrolle ($p = 0,007$). Diese Beobachtung wurde allerdings nur bei Männchen ($p = 0,002$), nicht jedoch bei Weibchen ($p = 0,631$) gemacht. Auch die Absolutvolumina der neuen Nephronen wiesen in der 1.000 µg/L-Versuchsgruppe eine signifikante ($p = 0,005$) Abnahme auf. Im Vergleich der Geschlechter war diese Abnahme ebenfalls nur bei den männlichen Tieren signifikant ($p = 0,001$) unterschiedlich zu den Kontrolltieren. Da diese stereologischen Daten auf Grund des seltenen Vorkommens neuer Nephronen in der Niere nur für 11 % der Versuchsfische als ausreichend valide eingestuft wurden und im Rahmen der semiquantitativen histologischen Untersuchung ebenfalls Hinweise auf eine Abnahme der neuen Nephronen festgestellt wurde, erfolgte eine erneute Überprüfung dieses Nierenkompartiments bei allen Expositionsgruppen (siehe unten). Bei den anderen Nierenkompartimenten der exkretorischen Nieren wurden weder beim Schätz- noch beim Absolutvolumen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt (Abbildung 26).

Abbildung 26: Absolutvolumina (V) der exkretorischen Niere subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



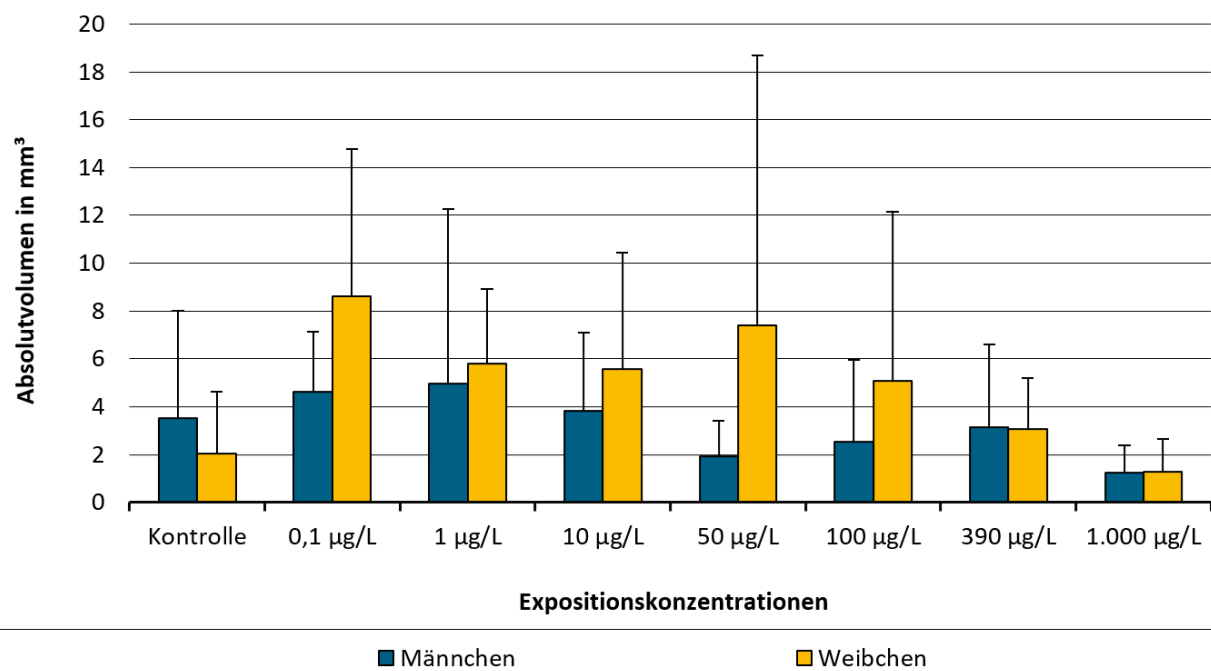
Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen alle männliche und weibliche der Kontrolle und der 1.000 µg/L-Versuchsgruppe ($n = 40$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Schätz- und Absolutvolumina neuer Nephronen

Die zunächst festgestellte, signifikante Abnahme neuer Nephronen bei männlichen Regenbogenforellen wurde mit einem, an das seltene Vorkommen dieses Nierenkompartimentes angepassten stereologischen Verfahren (Protokoll B), bei allen Versuchsfischen überprüft. Hierfür wurden pro Versuchsfisch in 170 ± 27 Gesichtsfeldern der Niere eine durchschnittliche Gesamtpunktzahl ($P_{C \text{ Niere}}$) von 6820 ± 1.291 ausgezählt. Die Überprüfung der Validität der Daten ergab für 83 % ($n = 132$) der Versuchsfische ein Konfidenzintervall von ± 10 % des Mittelwertes und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % (Tabelle 59 im Anhang B.5). Bei 98 % ($n = 157$) der Tiere entsprachen die Ergebnisse hinsichtlich der Schätzvolumina der neuen Nephronen einem Konfidenzintervall von ± 20 % des Mittelwertes und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Durchschnittlich wurde bei den Regenbogenforellen ein mittleres Schätzvolumen (V_V) der neuen Nephronen von $0,001 \pm 0,002$ und ein mittleres Absolutvolumen (V) von $4,04 \pm 5,07 \text{ mm}^3$ ermittelt. Anhand des neuen Protokolls B wurden weder bei Männchen noch bei Weibchen hinsichtlich der Schätz- beziehungsweise Absolutvolumina der neuen Nephronen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Expositionsgruppen festgestellt (Abbildung 27).

Abbildung 27: Absolutvolumina (V) neuer Nephronen subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)



Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen alle männliche und weibliche Versuchsfische ($n = 160$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

3.3.2 Teilversuch Nr. 2: Exposition von subadulten Regenbogenforellen in Metformin

3.3.2.1 Chemisch-physikalische Wasserparameter

Die chemisch-physikalischen Wasserparameter während des Expositionsversuchs Versuchslaufzeit sind in Tabelle 22 zusammengefasst dargestellt (weiterführende Daten zu einzelnen Versuchsaquarien in Tabelle 60 im Anhang B.6).

Tabelle 22: Chemisch-physikalische Wasserparameter (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Parameter	Messergebnisse
Wassertemperatur ¹ (°C)	12,07 ± 0,17
Leitfähigkeit ¹ (µS/cm)	198,74 ± 1,07
pH-Wert ¹	7,09 ± 0,04
Gelöster Sauerstoff ² (mg/L)	9,54 ± 0,26
Sauerstoffsättigung ³ (%)	95
Wassertemperatur ² (°C)	12,63 ± 0,23
Ammonium-Stickstoff ² (mg/L)	0,2 ± 0,03
Ammoniak-Stickstoff ⁴ (µg/L)	0,65 ± 0,08

Die Messung von Wassertemperatur, Leitfähigkeit, pH-Wert sowie der Sauerstoffkonzentration erfolgte kontinuierlich. Die Ammonium-Stickstoff-Konzentration wurde mindestens einmal wöchentlich in jedem Versuchsaquarium gemessen ($n_{\text{Gesamt}} = 68$). Daten: Mittelwerte aller Versuchsaquarien ± SD.

¹ Nach Wasseraufbereitung.

² Im Ablauf der Versuchsaquarien.

³ Einzelwert, berechnet aus dem Mittelwert des gesamten Versuchszeitraums.

⁴ berechnet.

3.3.2.2 Chemische Analyse der Testsubstanz Metformin

Die Ergebnisse der chemischen Analysen der realen Wasserkonzentrationen von Metformin können der Tabelle 23 entnommen werden. Die maximale Abweichung der realen von den nominalen Testkonzentrationen lag mit 4 % deutlich unterhalb des Grenzwertes der aktuellen Anforderungen der OECD zur Toxizitätsprüfung an Fischen von 20 % (OECD 2014). Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse beziehen sich somit auf die nominalen Testkonzentrationen.

Tabelle 23: Reale Testkonzentrationen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Nominalkonzentration Metformin (in µg/L)	Mittelwert realer Konzentrationen (in µg/L)	Differenz reale und nominale Konzentration (in µg/L)	Wiederfindungsrate (in %)
Kontrolle	< NG	-	-
0,1	0,1	0	100
1	1,1	0,1	110
10	10,4	0,425	104
50	52,0	2	104
100	98,0	-2	98
500	515,0	15	103
1.000	1032,5	32,5	103

Die realen Testkonzentrationen wurden für jede Testkonzentration insgesamt 4x bestimmt ($n_{\text{Gesamt}} = 32$).

NG: Nachweisgrenze.

3.3.2.3 Versuchsbeobachtungen

Im Teilversuch Nr. 2 trat keine Mortalität bei den Versuchsfischen auf. Darüber hinaus wurden bei den Versuchsfischen keine Hinweise auf stoffbedingte Veränderungen des Verhaltens, klinische Symptome oder äußerliche pathologische Veränderungen festgestellt. Die Atemfrequenz betrug durchschnittlich $61 \pm 6,30$ x/min. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und Expositionsgruppen oder Abweichungen im Versuchsverlauf festgestellt (Tabelle 61 im Anhang B.6).

3.3.2.4 Biometrische Daten

► Körpergewicht

Die männlichen Regenbogenforellen wiesen präexpositionell ein durchschnittliches Körpergewicht von 301 ± 19 g, postexpositionell von 342 ± 26 g auf. Bei den weiblichen Regenbogenforellen nahm das Körpergewicht von durchschnittlich 293 ± 17 g bei Versuchsbeginn auf 337 ± 25 g am Versuchsende zu. Die durchschnittliche Gewichtszunahme pro Versuchsfisch während der 28-tägigen Expositionszeit betrug 40 ± 17 g bei Männchen und 44 ± 19 g bei Weibchen. Es wurden weder bei Männchen noch bei Weibchen signifikante Unterschiede hinsichtlich des postexpositionellen Körpergewichts oder der Gewichtszunahme zwischen den Kontroll- und Expositionsgruppen festgestellt (Tabelle 62 im Anhang B.6).

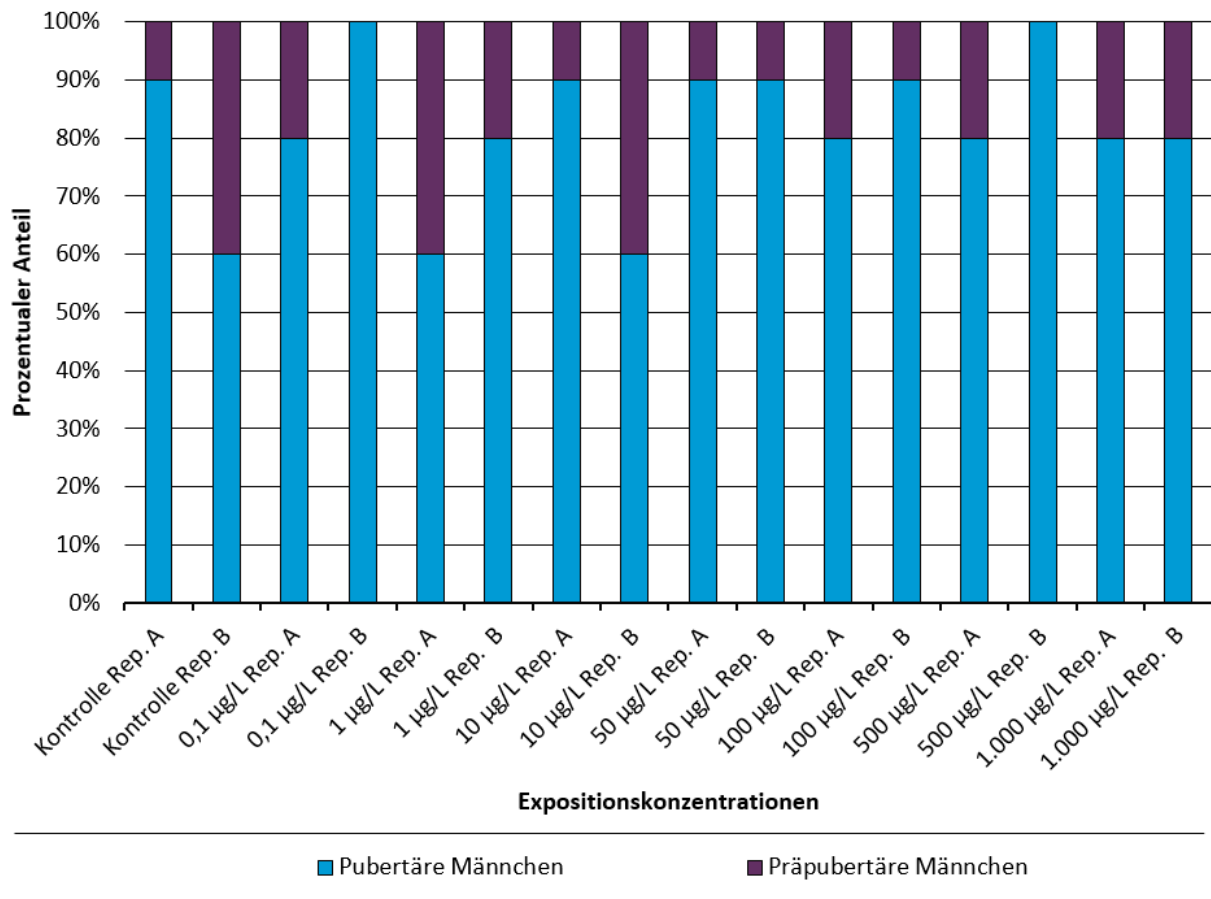
► Gesamtlänge

Im Teilversuch Nr. 2 betrug die Gesamtlänge vor Expositionsbeginn im Durchschnitt $29,6 \pm 0,68$ cm bei den männlichen und $29,4 \pm 0,70$ cm bei den weiblichen Versuchsfischen. Die Gesamtlänge der weiblichen Regenbogenforellen nahm in allen Versuchsgruppen mit durchschnittlich $1,4 \pm 0,48$ cm mehr zu als die der männlichen Fische mit $1,0 \pm 0,39$ cm. Bei Versuchsende wiesen Männchen eine durchschnittliche Gesamtlänge von $30,6 \pm 0,70$ und Weibchen von $30,8 \pm 0,73$ auf. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Expositionsgruppen festgestellt (Tabelle 63 im Anhang B.6).

► Gonadengewichte

Das durchschnittliche Hodengewicht pro Fisch betrug unter Berücksichtigung aller männlichen Versuchsfische 19.326 ± 10.582 mg (Tabelle 65 im Anhang B.6). Insgesamt wurden die Hoden bei 29 von 160 Fischen (18 %) als präpubertär eingestuft. Es wurde kein gehäuftes Auftreten präpubertärer Männchen in Korrelation zur Expositionskonzentration beobachtet (Abbildung 28).

Abbildung 28: Geschlechtsreife männlicher subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

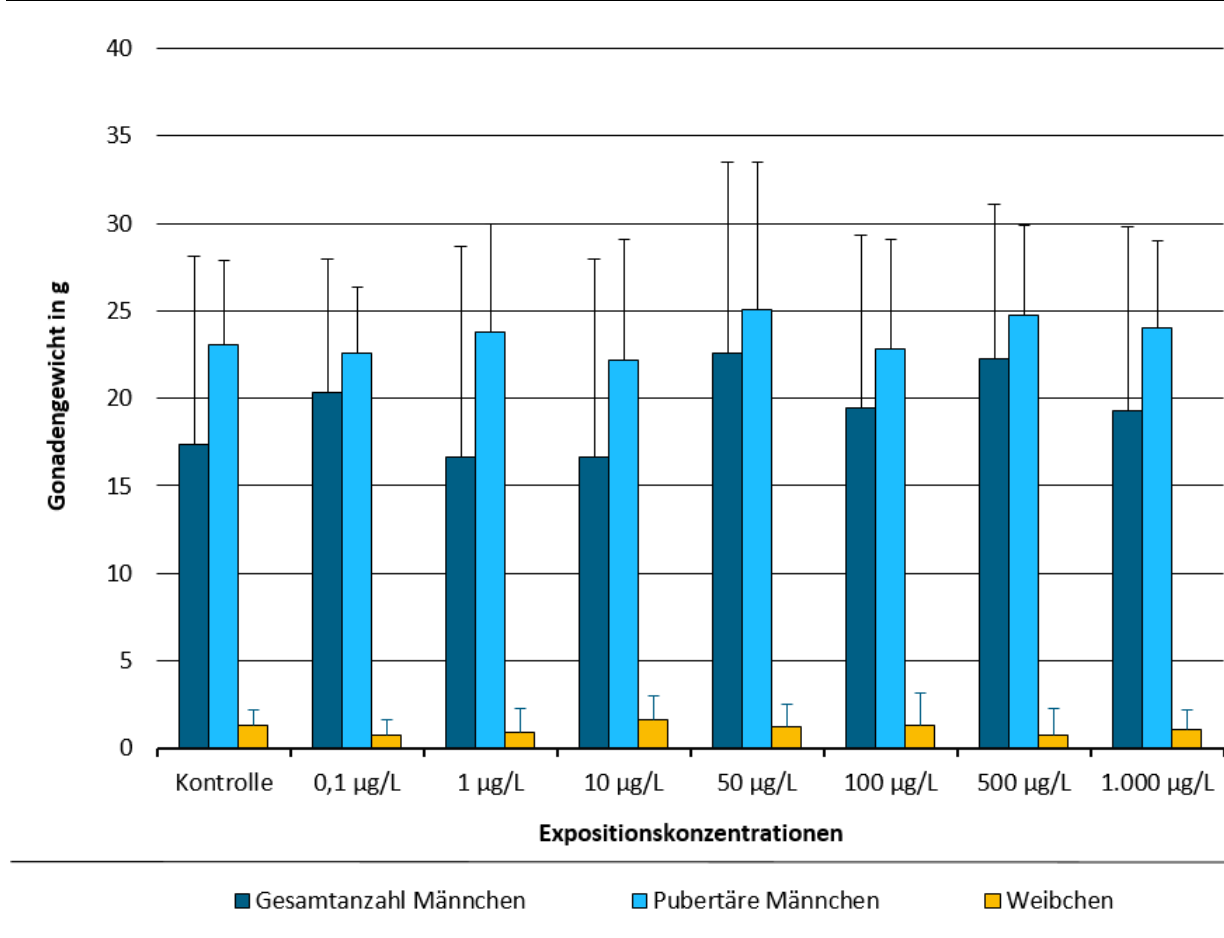


Daten: Mittelwerte mit SD. In jedem Aquarium befanden sich 10 männliche Regenbogenforellen. Die Gesamtanzahl der Männchen ($n = 160$) umfasste pubertäre ($n = 131$) und präpubertäre ($n = 29$) Männchen.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Die Hoden präpubertärer Fische wiesen ein mittleres Gesamtgewicht pro Fisch von 174 ± 78 mg auf. Bei insgesamt 131 männlichen Versuchsfischen befanden sich die Hoden im Stadium der Spermatogenese. Für diese pubertären Männchen wurde ein durchschnittliches Hodengewicht pro Versuchsfisch von 23.566 ± 6.084 mg ermittelt (Tabelle 64 im Anhang B.6). Bei weiblichen Fischen ($n = 159$) betrug das mittlere Ovariengewicht 1.112 ± 1.239 mg (Tabelle 66). Weder bei Weibchen noch bei Männchen wurden bezüglich der Gonadengewichte signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Expositionsgruppen nachgewiesen (Abbildung 29).

Abbildung 29: Gonadengewichte subadulter Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2)



Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen die Gesamtanzahl der Männchen ($n = 160$) sowie pubertäre Männchen ($n = 131$) und Weibchen ($n = 159$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Lebergewicht

Die Lebern wiesen im Durchschnitt ein Gewicht von $3,03 \pm 0,46$ g bei männlichen und $3,02 \pm 0,58$ g bei weiblichen Versuchsfischen auf (Tabelle 67 im Anhang B.6). Statistisch wurden weder bei Männchen noch bei Weibchen signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und Expositionsgruppen nachgewiesen.

3.3.2.5 Biologische Indices

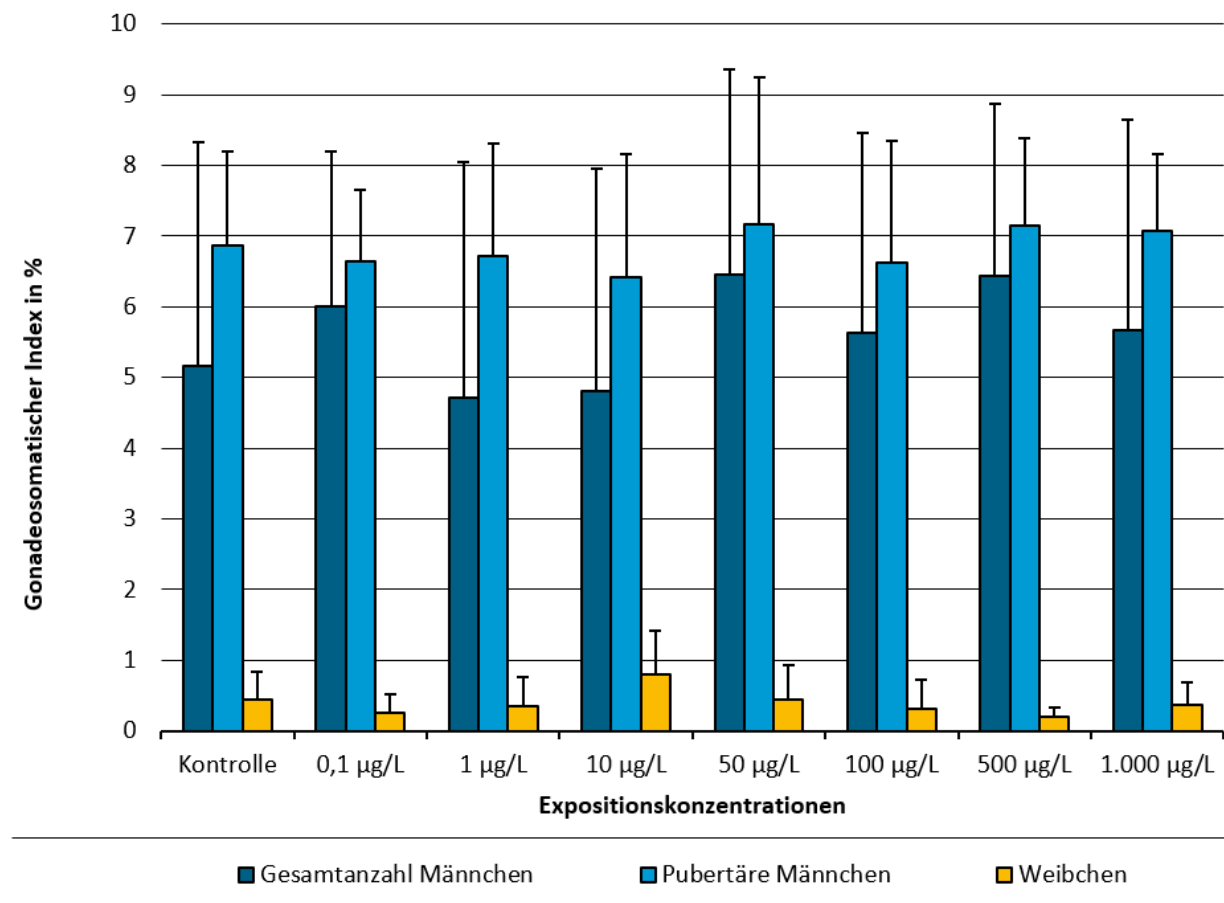
► Korpulenzfaktor

Im Teilversuch Nr. 2 lag unter Berücksichtigung aller Versuchsfische der durchschnittliche Korpulenzfaktor bei $1,18 \pm 0,07$ ($n = 320$). Bei den Männchen ($n = 160$) war der Korpulenzfaktor im Durchschnitt mit $1,20 \pm 0,07$ geringfügig höher als bei den Weibchen ($n = 160$) mit $1,16 \pm 0,06$ (Tabelle 68 im Anhang B.6). Weder bei Männchen noch bei Weibchen wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und Expositionsgruppen nachgewiesen.

► Gonadosomatischer Index (GSI)

Im Teilversuch Nr. 2 wurde für alle männliche Versuchsfische ($n_{\text{Gesamt}} = 160$) ein mittlerer GSI von $5,61 \pm 2,97$, für pubertäre Männchen mit Hoden in Spermatogenese ($n = 131$) ein GSI von $6,84 \pm 1,54$ errechnet (Abbildung 30). Bei den Weibchen betrug der durchschnittliche GSI $0,33 \pm 0,37$ ($n = 159$). Eine statistische Analyse der Daten ergab unabhängig vom Geschlecht keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Expositionsgruppen (Tabelle 68 im Anhang B.6).

Abbildung 30: Gonadosomatische Indices subadulte Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)



Daten: Mittelwerte mit SD. Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen die Gesamtanzahl der Männchen ($n = 160$) sowie pubertäre Männchen ($n = 131$) und Weibchen ($n = 159$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Hepatosomatischer Index (HSI)

Der HSI lag insgesamt bei durchschnittlich $0,90 \pm 0,14$, wobei zwischen Männchen mit $0,88 \pm 0,12$ und Weibchen $0,92 \pm 0,16$ keine relevanten Unterschiede bestanden (Tabelle 68 im Anhang B.6). Unabhängig vom Geschlecht wurden bezüglich des HSI keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Expositionsgruppen nachgewiesen.

3.3.2.6 Klinische Chemie

Die Bestimmung der Aktivitäten der Plasmaenzyme im Blut Metformin-exponierter Regenbogenforellen ergab keine von den Kontrollwerten abweichenden Befunde. Bezüglich der Parameter Cholesterol, HDL, Triglyceride, Glukose, Harnsäure, Blut-Harnstoff-Stickstoff, Kreatinin und Calcium wurden ebenfalls keine signifikanten Abweichungen nachgewiesen. Für die LDL-Fraktion wurde hingegen eine statistisch signifikante Abnahme bei den in 100 µg ($2,9 \pm 0,59$ mg/dL, $p = 0,004$) und 1.000 µg ($3,1 \pm 1,48$ mg/dL, $p = 0,006$) Metformin/L exponierten Fischen im Vergleich zu Kontrolltieren ($6,3 \pm 5,12$ mg/dL) ermittelt (Daten in Tabelle 69 im Anhang B.6).

3.3.2.7 Hämatologie

Die hämatologischen Untersuchungen ergaben bezüglich des Hämatokrits, des Hämoglobin-Gehaltes, der Erythrozytenindices (MCV, MCH, MCHC) sowie der Gesamtzellzahlen der Erythrozyten und Leukozyten keine signifikanten Auffälligkeiten. Nur bei Regenbogenforellen, die 0,1 µg/L Metformin ausgesetzt waren, wies das Differentialblutbild einen gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöhten prozentualen Anteil stabkerniger Granulozyten auf ($2,5 \pm 1,66$ % vs. $1,3 \pm 1,19$ %, $p = 0,015$). Die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen werden im Detail in der Tabelle 70 im Anhang B.6 dargestellt.

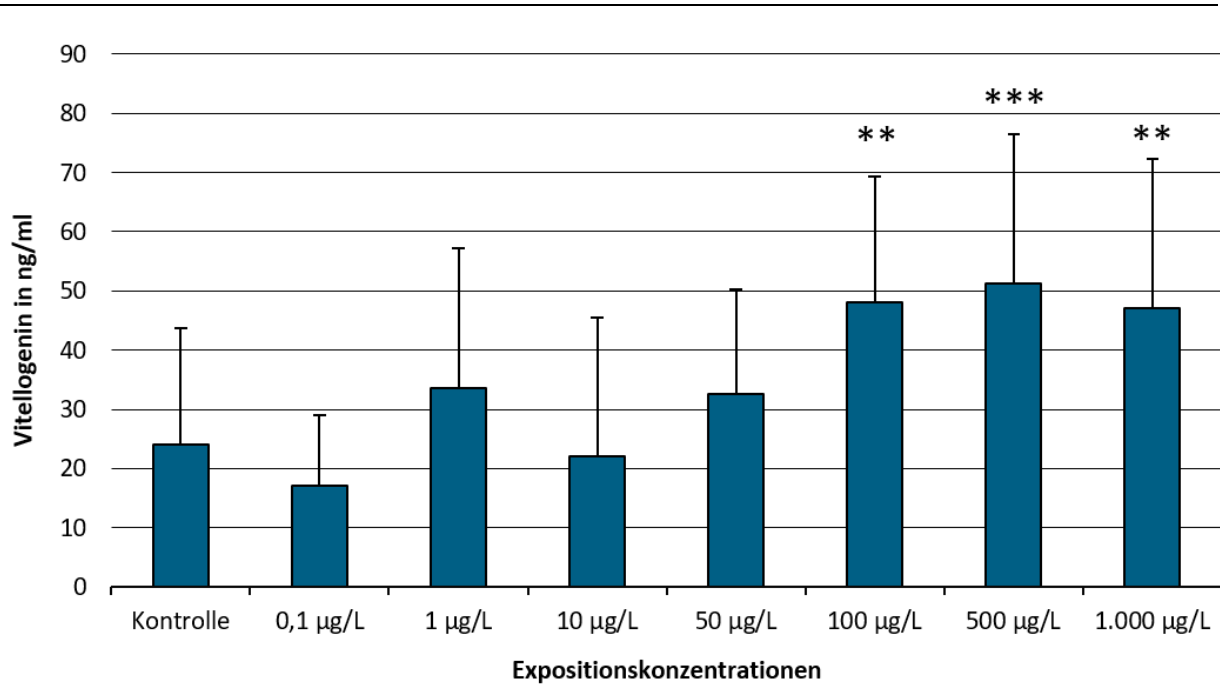
3.3.2.8 Serologische Untersuchungen (Biomarker)

► Männchen

Die statistische Überprüfung ergab eine signifikante Korrelation zwischen dem Reifegrad der Hoden (GSI) und der Konzentrationen der Biomarker für Testosteron ($p = 0,000$), 11-Ketotestosteron ($p = 0,000$) sowie dem Hormonquotienten von Estradiol/Testosteron (E2/Ts) ($p = 0,000$). Hingegen bestand keine Korrelation zwischen GSI und der Konzentration von Vitellogenin ($p = 0,567$), 17β-Estradiol (E2) ($p = 0,442$), und Aromatase ($p = 0,935$). Dementsprechend werden die Ergebnisse für Vitellogenin, E2 und Aromatase für alle Männchen zusammenfassend dargestellt, während die Testosteron- und 11-Ketotestosteron-Werte sowie der Hormonquotient E2/Ts auch separat nur für pubertäre Männchen betrachtet werden (alle Daten in den Tabellen 71-73 im Anhang B.6).

Männliche Versuchsfische zeigten ab einer Expositionskonzentration von 100 µg/L Metformin eine statistisch signifikante Zunahme der Vitellogeningehalte im Blutplasma (Abbildung 31). Diese Zunahme entsprach einer bis zu 2,1fachen Induktion der Vitellogenin-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe. E2 war hingegen ab einer Konzentration von 10 µg/L Metformin mit Ausnahme der 100 µg/L-Versuchsgruppe signifikant erniedrigt (Abbildung 32). Zudem wurde bei männlichen Regenbogenforellen nach Exposition in Metformin-Konzentrationen zwischen 0,1 µg/L ($p = 0,001$) und 50 µg/L ($p = 0,001$) ein signifikanter Anstieg der Aromatase im Blutplasma beobachtet (Abbildung 33). Hinsichtlich der Blutplasmakonzentrationen von Testosteron und 11-Ketotestosteron wurden bei männlichen Versuchsfischen keine signifikanten Veränderungen zwischen Kontrolltieren und Metformin-exponierten Fischen festgestellt (Abbildung 34). Eine signifikante Abnahme des Hormonquotienten E2/Ts wurde nach Exposition in 500 µg/L Metformin sowohl für die Gesamtanzahl männlicher Versuchsfische ($p = 0,031$) als auch für die Gruppe der pubertären Männchen ($p = 0,026$) nachgewiesen (Abbildung 35).

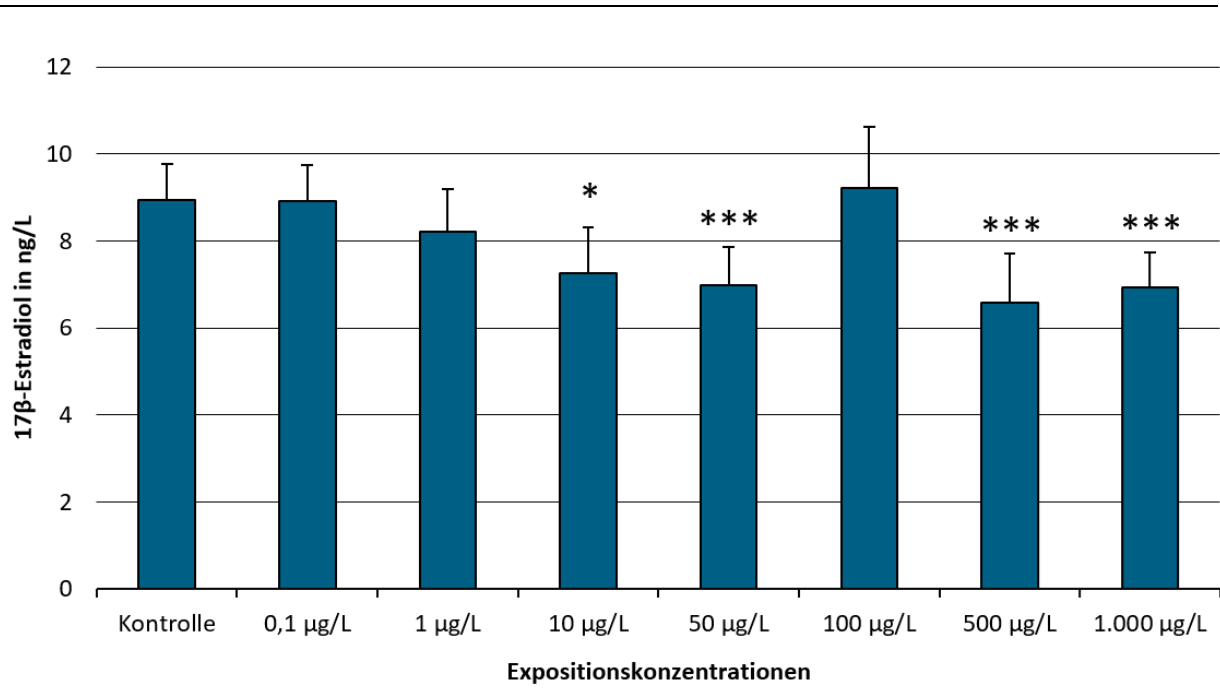
Abbildung 31: Vitellogenin-Konzentration bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)



Daten: Mittelwerte mit SD. Dargestellt sind die Ergebnisse für alle männlichen Versuchsfische ($n = 160$). **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

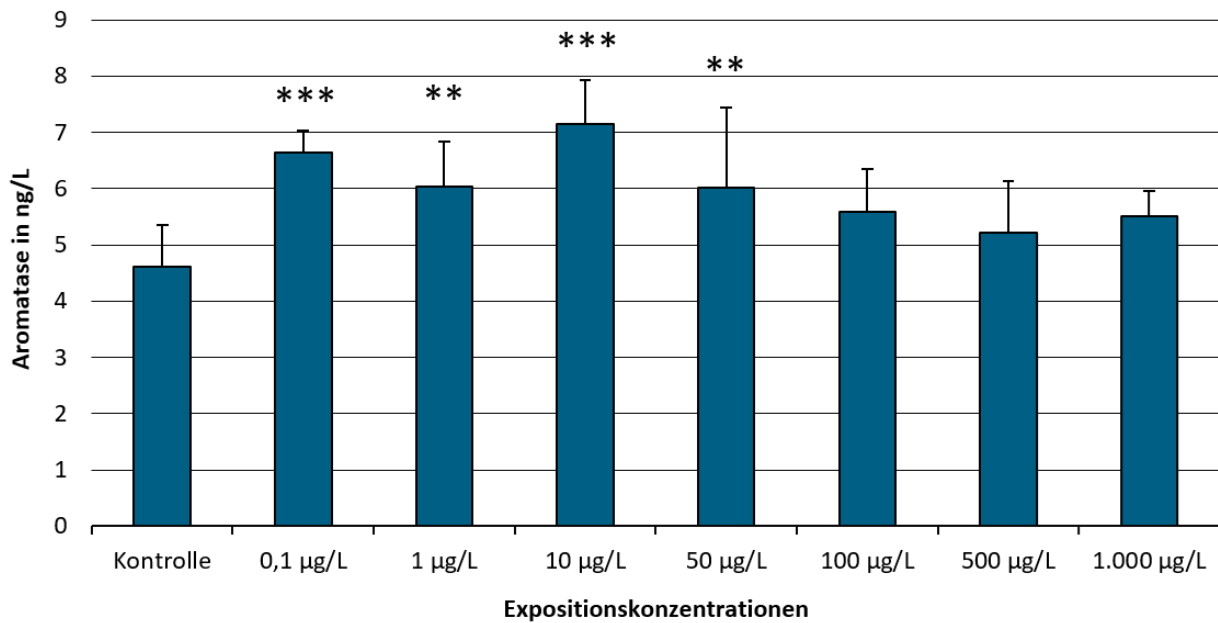
Abbildung 32: 17 β -Estradiol bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)



Daten: Mittelwerte mit SD. Dargestellt sind die Ergebnisse für alle männlichen Versuchsfische ($n = 160$). *: $p \leq 0,05$; ***: $p \leq 0,001$.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

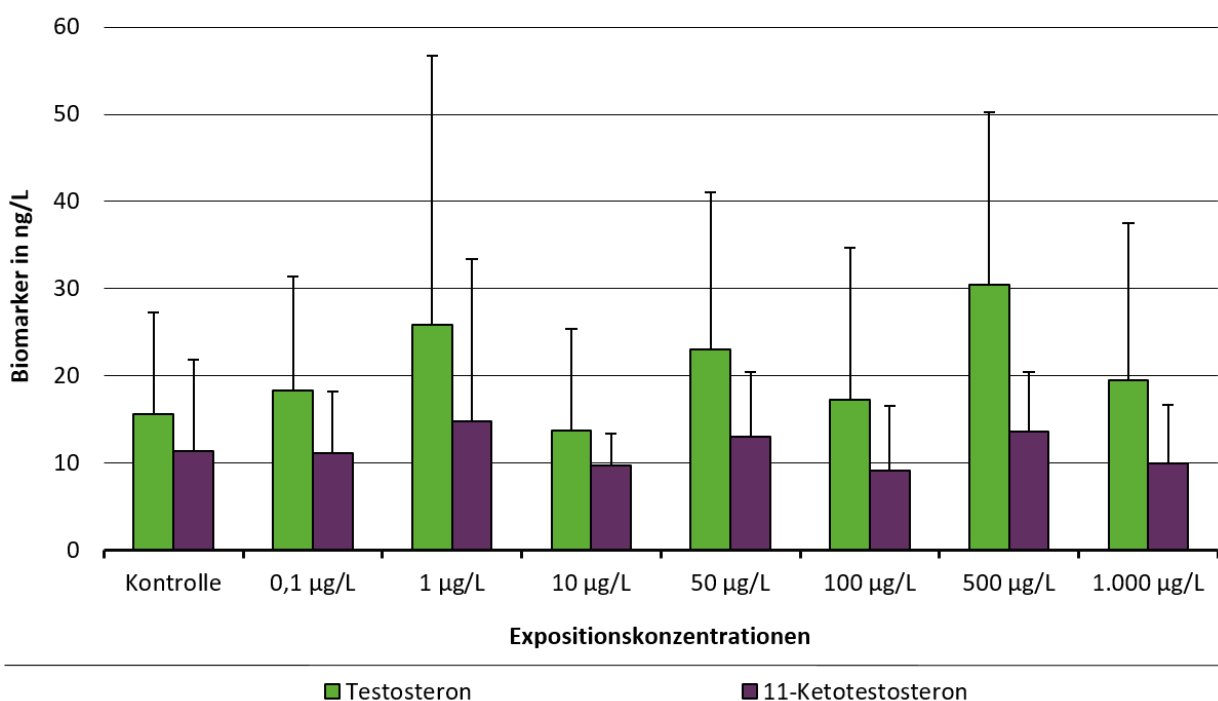
Abbildung 33: Aromatase bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)



Daten: Mittelwerte mit SD. Dargestellt sind die Ergebnisse für alle männlichen Versuchsfische ($n = 160$). **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

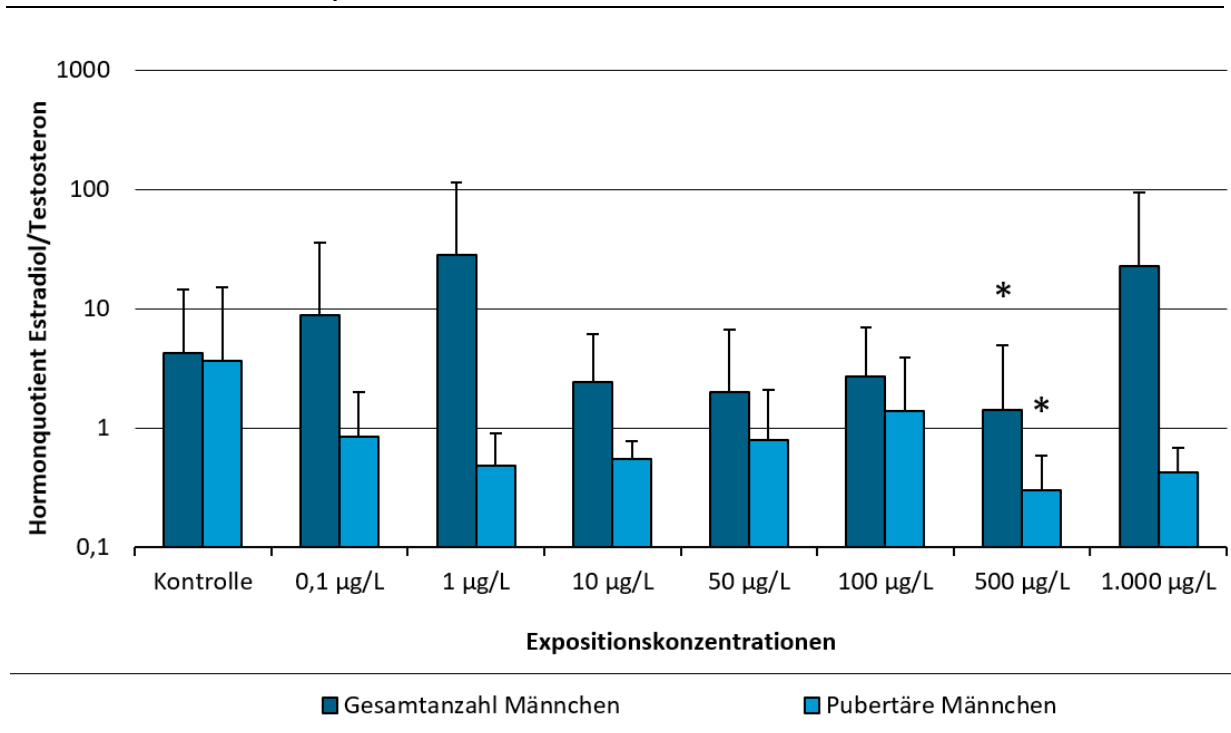
Abbildung 34: Testosteron und 11-Ketotestosteron bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)



Daten: Mittelwerte mit SD. Dargestellt sind die Ergebnisse für alle männlichen Versuchsfische ($n = 160$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Abbildung 35: Hormonquotienten bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)



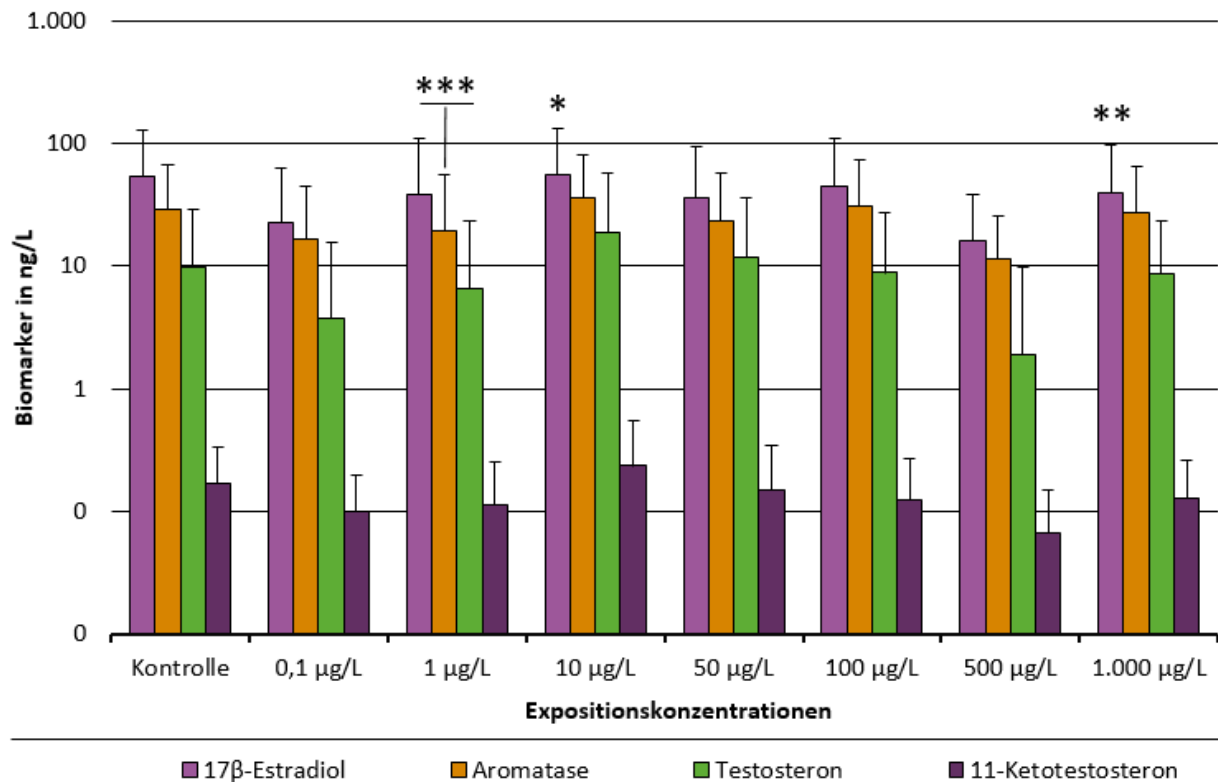
Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen den Hormonquotienten bei der Gesamtanzahl männlicher Versuchsfische sowie pubertärer Männchen ($n = 131$). *: $p \leq 0,05$.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Weibchen

Bei weiblichen Versuchsfischen war nach Exposition in 1 µg/L Metformin die Plasmakonzentration der Aromatase signifikant ($p = 0,000$) erniedrigt (Abbildung 36). Für Estradiol im Blutplasma wurden signifikant geringere Werte nach Exposition in 10 µg/L ($p = 0,029$) und 1.000 µg/L ($p = 0,001$) Metformin ermittelt (Abbildung 36). Weibliche Tiere dieser Versuchsgruppen zeigten ebenfalls signifikant reduzierte Hormonquotienten (Abbildung 37). Hinsichtlich der Blutplasmakonzentrationen von Testosteron und 11-Ketotestosteron wurden bei weiblichen Versuchsfischen keine signifikanten Veränderungen zwischen Kontrolltieren und Metformin-exponierten Fischen festgestellt (Abbildung 36, Tabelle 74 im Anhang B.6).

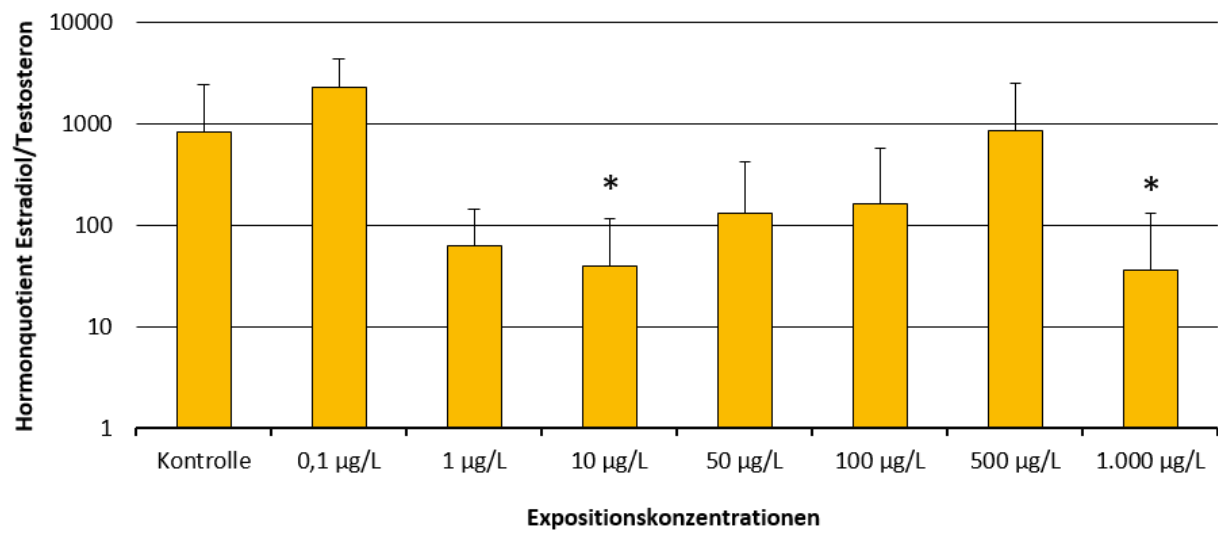
Abbildung 36: Biomarker bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)



Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen alle weiblichen Versuchsfische ($n = 160$). *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Abbildung 37: Hormonquotienten bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)



Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen den Hormonquotienten allen weiblichen Versuchsfischen ($n = 160$). *: $p \leq 0,05$.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

3.3.2.9 Qualitative und semiquantitative Histopathologie

Die semiquantitative histologische Untersuchung der Niere ergab bei Regenbogenforellen, die in 1.000 µg/L Metformin exponiert wurden, im Vergleich zu Kontrolltieren eine Abnahme neuer Nephrone. Der durchschnittliche Scorewert nahm hierbei von $1,2 \pm 0,86$ bei der Kontrolle auf $1,0 \pm 0,79$ ab (Daten in Tabelle 75 im Anhang B.6).

Die anderen untersuchten Organe wiesen keine histopathologischen Veränderungen und somit auch keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Scorewerte auf (Daten in Tabelle 75 und Tabelle 76 im Anhang B.6).

Die semiquantitative Auswertung des Reifegrads des Hodens ergab keine relevanten Unterschiede zwischen dem durchschnittlichen Scorewert bei allen Fischen der Kontrollgruppe ($5,0 \pm 2,26$, $n = 20$) sowie der 1.000 µg/L Versuchsgruppe ($5,3 \pm 2,35$, $n = 20$). Ebenso wurden bei ausschließlicher Betrachtung der pubertären Männchen dieser beiden Versuchsgruppen keine relevanten Unterschiede festgestellt (Kontrolle: $6,1 \pm 0,98$, $n = 15$ vs. 1.000 µg/L-Gruppe: $6,4 \pm 0,86$, $n = 16$) (Daten in Tabelle 77 im Anhang B.6).

Bei pubertären Männchen aller Versuchsgruppen ($n = 131$) wurde zudem eine stereologische Auswertung der Volumina männlicher Keimzellen durchgeführt (siehe Punkt 3.3.2.10), während der Reifegrad der Hoden präpubertärer Männchen ausschließlich semiquantitativ beurteilt wurde. Die Hoden der präpubertären Männchen aller Versuchsgruppen zeigten einen filamentartigen Aufbau. Bei 93 % ($n = 27$) dieser Tiere wurden die Hoden dem Reifegrad Io (präpubertär) nach Billard (1992) zugeordnet. Die männlichen Keimzellen lagen dabei ausschließlich als Spermatogonien vor. Bei 7 % der präpubertären Fische ($n = 2$; jeweils $n = 1$ aus Kontrolle und 0,1 µg/L-Gruppe) wurden die Hoden in Stadium 4 eingestuft. Bei diesen Fischen wurden neben Spermatogonien auch Spermatozyten beobachtet. Im Durchschnitt betrug der Scorewert für den Reifegrad bei präpubertären Männchen aller Versuchsgruppen $1,2 \pm 0,77$. Bei keinem der pubertären oder präpubertären Männchen aus dem Teilversuch Nr. 2 wurden im Hoden histopathologische Veränderungen oder Anzeichen eines endokrin disruptiven Effektes festgestellt (Daten in Tabelle 77 im Anhang B.6).

Die Ovarien der Regenbogenforellen der Kontroll- und 1.000 µg/L-Versuchsgruppe wiesen Oozyten in verschiedenen Entwicklungsstadien bis hin zu vitellogenen Oozyten auf. Entsprechend dem reifsten Oozytenstadium wurden die Ovarien aller Fische als Stadium 4 oder 5 nach Billard (1992) eingestuft. Im Durchschnitt betrug der Reifegrad der Ovarien der Kontrollfische $4,2 \pm 0,53$ und der Weibchen der 1.000 µg/L-Versuchsgruppe $4,2 \pm 0,47$ (Daten in Tabelle 77 im Anhang B.6).

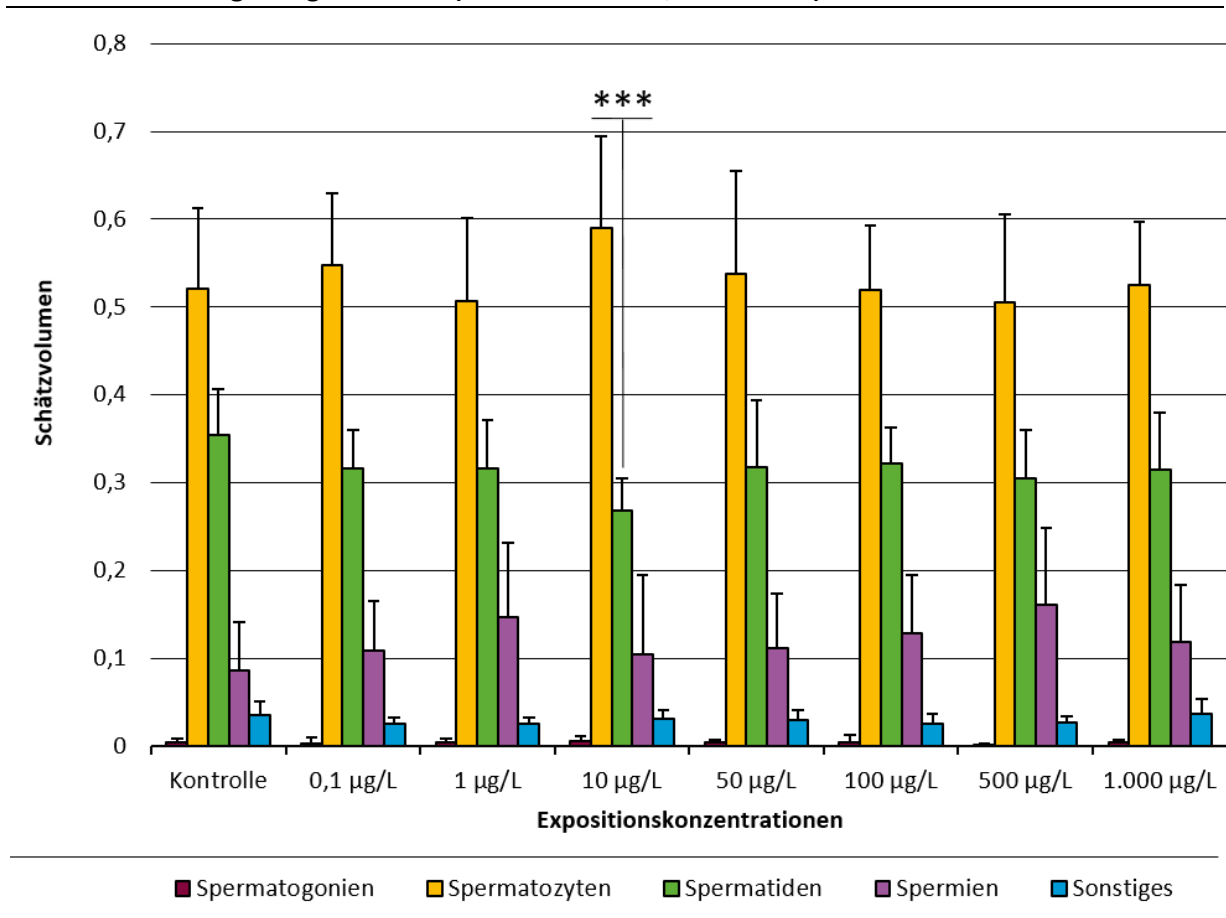
3.3.2.10 Quantitative Histologie des Hodens (Stereologie)

► Schätzvolumina der Hodenzelltypen

Die stereologische Untersuchung des Hodens erfolgte an Fischen in aktiver Spermatogenese (pubertäre Männchen, Reifegrad $\neq$ Io) ($n_{\text{Gesamt}} = 131$). Vorab wurden im Rahmen der stereologischen Probenahme im Durchschnitt 14 Hodenlamellen pro Versuchsfisch zur weiteren Auswertung präpariert. Zur Ermittlung der Schätzvolumina der unterschiedlichen Zelltypen wurde pro Fisch eine durchschnittliche Gesamtpunktzahl (P_c) von 1.389 ± 395 Punkten, aufgeteilt auf durchschnittlich $30 \pm 8,67$ Gesichtsfelder, ausgezählt. Insgesamt wurde bei den männlichen Versuchsfischen ein Schätzvolumen (V_v) von $0,004 \pm 0,00$ bei Spermatogonien, $0,531 \pm 0,09$ bei Spermatozyten, $0,314 \pm 0,06$ bei Spermiden, $0,121 \pm 0,07$ bei Spermien und $0,029 \pm 0,01$ bei sonstigen Zellen ermittelt (Abbildung 38). Eine Überprüfung der Validität der Daten ergab für ≥ 94 % der Versuchsfische ein Konfidenzintervall von ± 10 % des Mittelwertes

und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % für die Schätzvolumina von Spermatozyten, Spermatiden und Spermien (Tabelle 78 im Anhang B.6). Bei einer Gesamtanzahl von ≥ 99 % der Versuchsfische entsprachen die Ergebnisse hinsichtlich der Schätzvolumina von Spermatozyten, Spermatiden und Spermien einem Konfidenzintervall von ± 20 % des Mittelwertes und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Ausschließlich die Versuchsfische, die 10 $\mu\text{g/L}$ Metformin ausgesetzt waren, zeigten ein signifikant ($p = 0,001$) geringeres Schätzvolumen für Spermatiden als Fische der Kontrollgruppe (Daten in Tabelle 79 im Anhang B.6). Darüber hinaus wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und Metformin-exponierten Fischgruppen festgestellt.

Abbildung 38: Schätzvolumina (V_v) verschiedener Hodenzelltypen bei pubertären, subadulten Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)



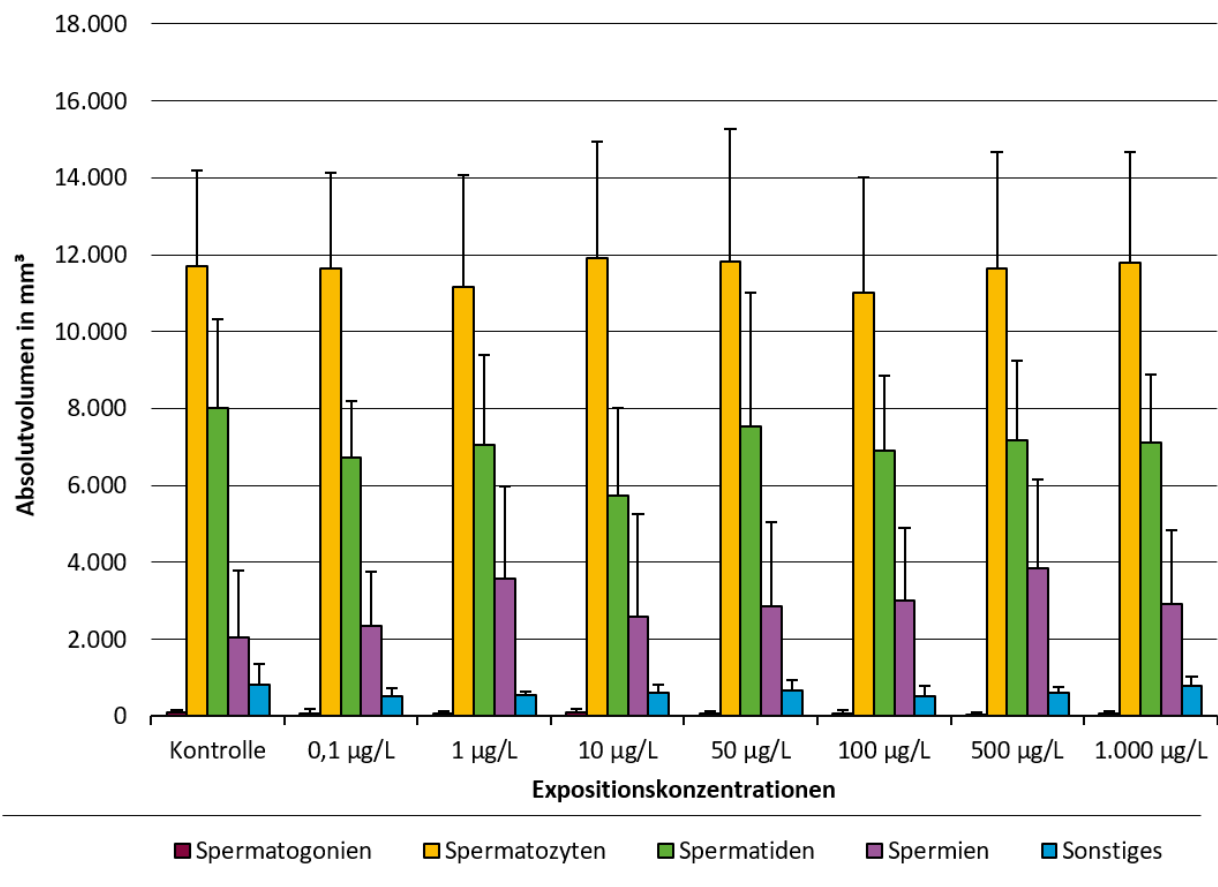
Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen den die Schätzvolumina allen pubertären Männchen ($n = 131$). ***: $p \leq 0,001$.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Absolutvolumina der Hodenzelltypen

Anhand der ermittelten Schätzvolumina wurden nachfolgend die Absolutvolumina (V) berechnet. Im Durchschnitt betrug das Absolutvolumen der Spermatogonien $78 \pm 68 \text{ mm}^3$, der Spermatozyten $11.588 \pm 2.871 \text{ mm}^3$, der Spermatiden $7.041 \pm 2.299 \text{ mm}^3$, der Spermien $2.905 \pm 2.103 \text{ mm}^3$ und sonstiger Zellen $635 \pm 289 \text{ mm}^3$ (Abbildung 39). Es wurden hinsichtlich der Absolutvolumina keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Metformin-exponierten Fischen und Kontrolltieren ermittelt (Daten in Tabelle 80 im Anhang B.6).

Abbildung 39: Absolutvolumina (V) verschiedener Hodenzelltypen bei pubertären, subadulten Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)



Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen die Absolutvolumina bei allen pubertären Männchen ($n = 131$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

3.3.3 Teilversuch Nr. 3: Exposition von juvenilen Regenbogenforellen in Metformin

3.3.3.1 Chemisch-physikalische Wasserparameter

Die im Rahmen von Teilversuch Nr. 3 ermittelten Werte chemisch-physikalischer Wasserparameter werden in Tabelle 24 zusammengefasst (weiterführende Daten zu einzelnen Versuchsaquarien in Tabelle 81 im Anhang B.7).

Tabelle 24: Chemisch-physikalische Wasserparameter (Teilversuch Nr. 3, Metformin)

Parameter	Messergebnisse
Wassertemperatur ¹ (°C)	11,46 ± 0,12
Leitfähigkeit ¹ (µS/cm)	206,08 ± 1,6
pH-Wert ¹	7,14 ± 0,06
Sauerstoff ² (mg/L)	10,17 ± 0,25
Sauerstoffsättigung ³ (%)	98
Wassertemperatur ² (°C)	11,39 ± 0,32
Ammonium-Stickstoff ² (mg/L)	0,02 ± 0,01 ($n_{\text{Gesamt}} = 224$)
Ammoniak-Stickstoff ⁴ (µg/L)	0,05 ± 0,04 ($n_{\text{Gesamt}} = 224$)

Die Messung von Wassertemperatur, Leitfähigkeit, pH-Wert sowie der Sauerstoffkonzentration erfolgte kontinuierlich. Die Ammonium-Stickstoff-Konzentration wurde mindestens einmal wöchentlich in jedem Versuchsaquarium gemessen.

Daten: Mittelwert aller Versuchsaquarien ± SD, n_{Gesamt} = Gesamtanzahl der Messungen.

¹ Nach Wasseraufbereitung.

² Im Ablauf der Versuchsaquarien.

³ Einzelwert, berechnet aus dem Mittelwert des gesamten Versuchszeitraums.

⁴ berechnet.

3.3.3.2 Chemische Analyse der Testsubstanz Metformin

Die Ergebnisse der chemischen Analysen der realen Konzentrationen der Testsubstanz Metformin werden in der Tabelle 25 aufgeführt. Die maximale Abweichung der realen von der nominalen Testkonzentration betrug 5 %, weshalb nachfolgend die nominalen Testkonzentrationen verwendet werden (OECD 2014).

Tabelle 25: Reale Testkonzentrationen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)

Nominalkonzentration Metformin (in µg/L)	Mittelwert realer Konzentrationen (in µg/L)	Differenz reale und nominale Konzentration (in µg/L)	Wiederfindungsrate (in %)
Kontrolle	< NG	-	-
0,1	0,1	0,0	93
1	0,9	-0,1	95
10	10,4	0,4	104
50	48,8	-1,2	98
100	97,0	-3,0	97
500	485,4	-14,6	97
1.000	972,3	-27,7	97

Die realen Testkonzentrationen wurden für jede Testkonzentration insgesamt 13x bestimmt ($n_{\text{Gesamt}} = 104$).

NG: Nachweisgrenze.

3.3.3.3 Versuchsbeobachtungen

Im Teilversuch Nr. 3 wurden keine Hinweise auf Metformin-bedingte Veränderungen des Verhaltens der Versuchsfische, klinische Symptome oder äußerliche pathologische Veränderungen festgestellt. Die Futteraufnahme wurden bei Regenbogenforellen aller Versuchs- sowie der Kontrollgruppen als gut bewertet.

Die während der Versuchsphase verabreichte Gesamtfuttermenge pro Testaquarium betrug $204 \pm 1,62$ mg (Daten in Tabelle 82 im Anhang B.7).

3.3.3.4 Mortalität

Im Teilversuch Nr. 3 auftretende Tierverluste sind in der nachfolgenden Tabelle 26 dargestellt. Die Mortalität lag zwischen 1-2 % ($n_{\text{Gesamt}} = 12$).

Tabelle 26: Mortalität (Teilversuch Nr. 3, Metformin)

Expositionskonzentration (in µg/L)	Verluste pro Expositionskonzentration (Fischanzahl)	Mortalität (in %)
Kontrolle	2	1
0,1	1	1
1	1	1
10	0	0
50	3	2
100	3	2
500	0	0
1.000	2	1

$n = 200$ Versuchsfische pro Expositionskonzentration.

3.3.3.5 Scoring äußerlicher Veränderungen

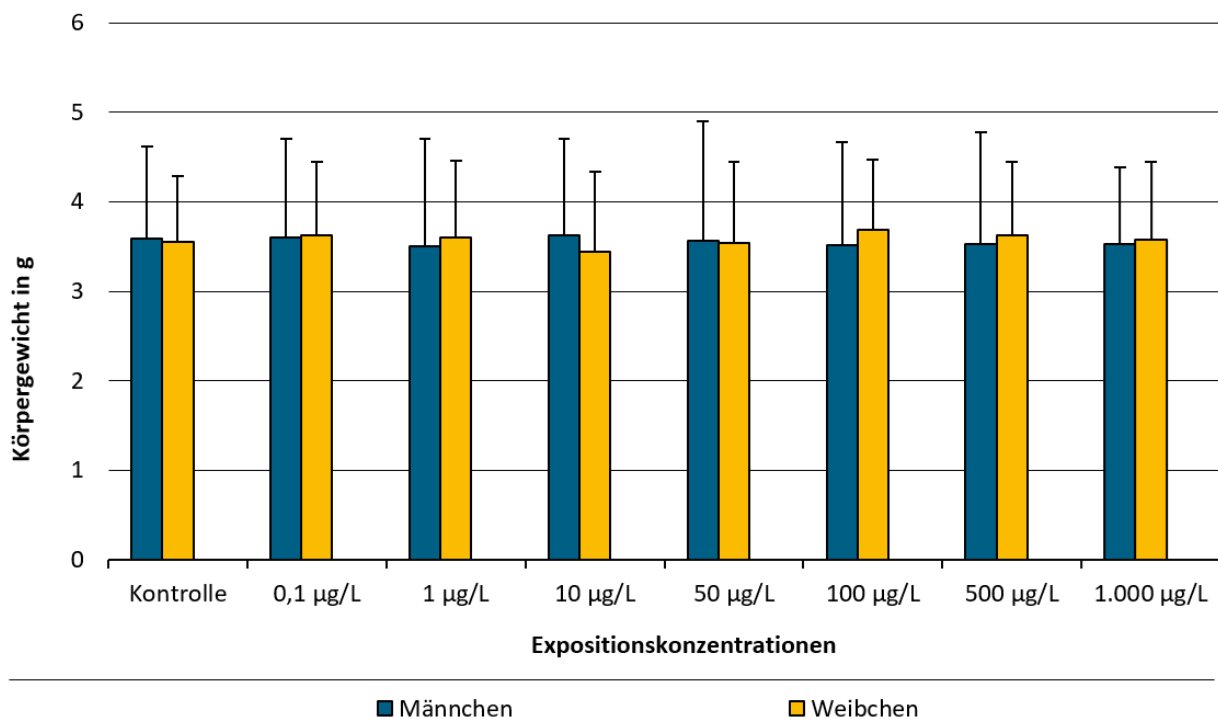
Die juvenilen Regenbogenforellen zeigten bei der Sektion lediglich geringstgradige äußerliche Veränderungen (maximal Score 1). Bei diesen handelte es sich um typische, durch die Aufzucht unter Aquakulturbedingungen bedingte Veränderungen der Kiemendeckel (Verkürzung) sowie der Flossen (z. B. Verkürzung Rückenflosse). Es wurden keine Hinweise auf Metformin bedingte pathologische Veränderungen festgestellt.

3.3.3.6 Biometrische Daten

► Körpergewicht

Das mittlere Körpergewicht der juvenilen Regenbogenforellen betrug nach 93-tägiger Metformin-Exposition bei den männlichen Tieren $3,56 \pm 0,97$ g, bei den weiblichen Tieren $3,58 \pm 0,92$ g (Daten in Tabelle 83 in Anhang B.7). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und Metformin-exponierten Gruppen festgestellt (Abbildung 40).

Abbildung 40: Körpergewichte juveniler Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)



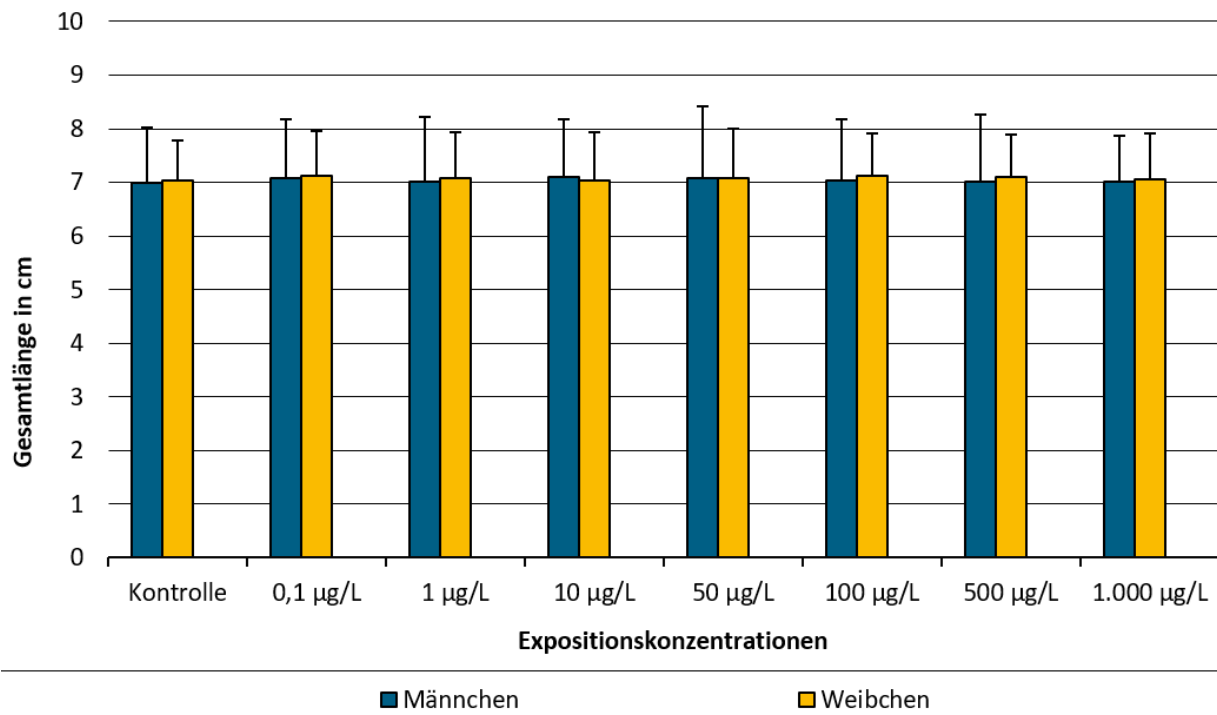
Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen allen Männchen und Weibchen am Versuchsende.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Gesamtlänge

Nach 93-tägiger Metformin-Exposition wiesen die männlichen, juvenilen Regenbogenforellen eine mittlere Gesamtlänge von $7,04 \pm 0,62$ cm, die weiblichen Individuen von $7,08 \pm 0,62$ cm auf (Daten in Tabelle 83 im Anhang B.7). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und den Expositionsgruppen festgestellt (Abbildung 41).

Abbildung 41: Gesamtlängen juveniler Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)



Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen allen Männchen und Weibchen am Versuchsende.

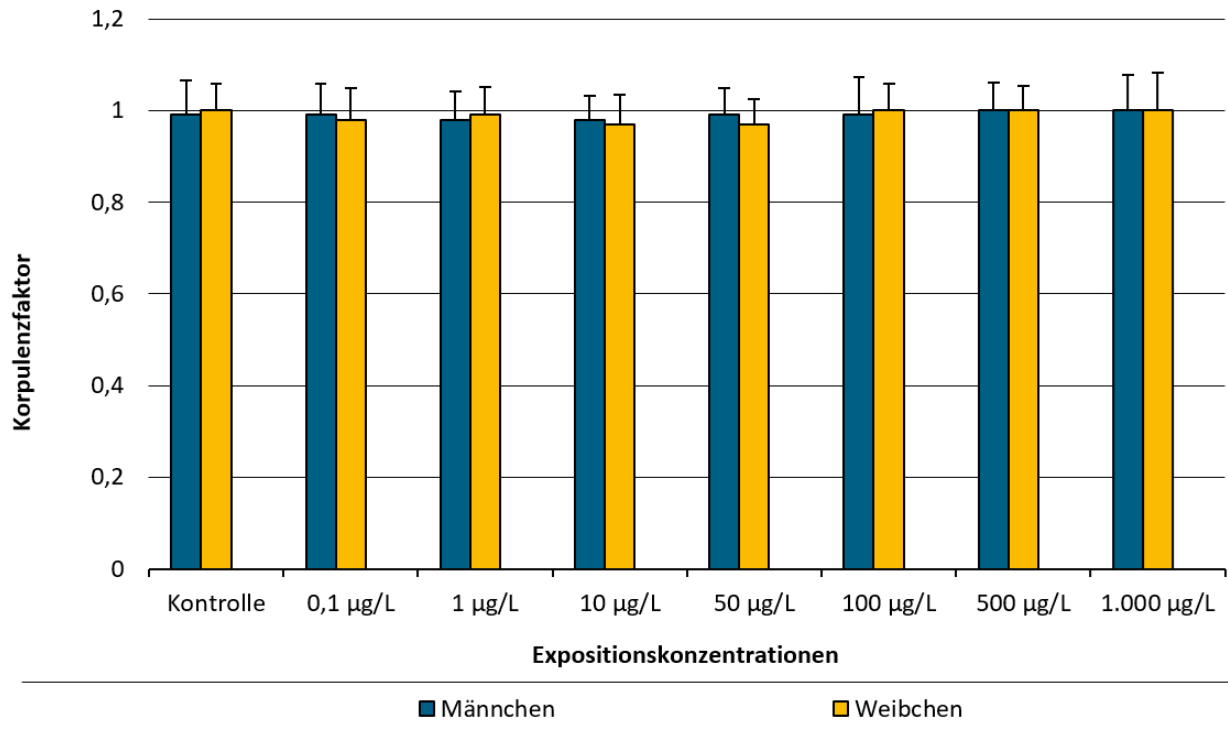
Quelle: Eigene Abbildung, LfU

3.3.3.7 Biologische Indices

► Korpulenzfaktor

Der mittlere Korpulenzfaktor juveniler Regenbogenforellen betrug nach 93-tägiger Metformin-Exposition $0,99 \pm 0,07$ bei männlichen sowie $0,99 \pm 0,06$ bei weiblichen Tieren (Daten in Tabelle 84 im Anhang B.7). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Expositionsgruppen festgestellt (Abbildung 42).

Abbildung 42: Korpulenzfaktoren juveniler Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)



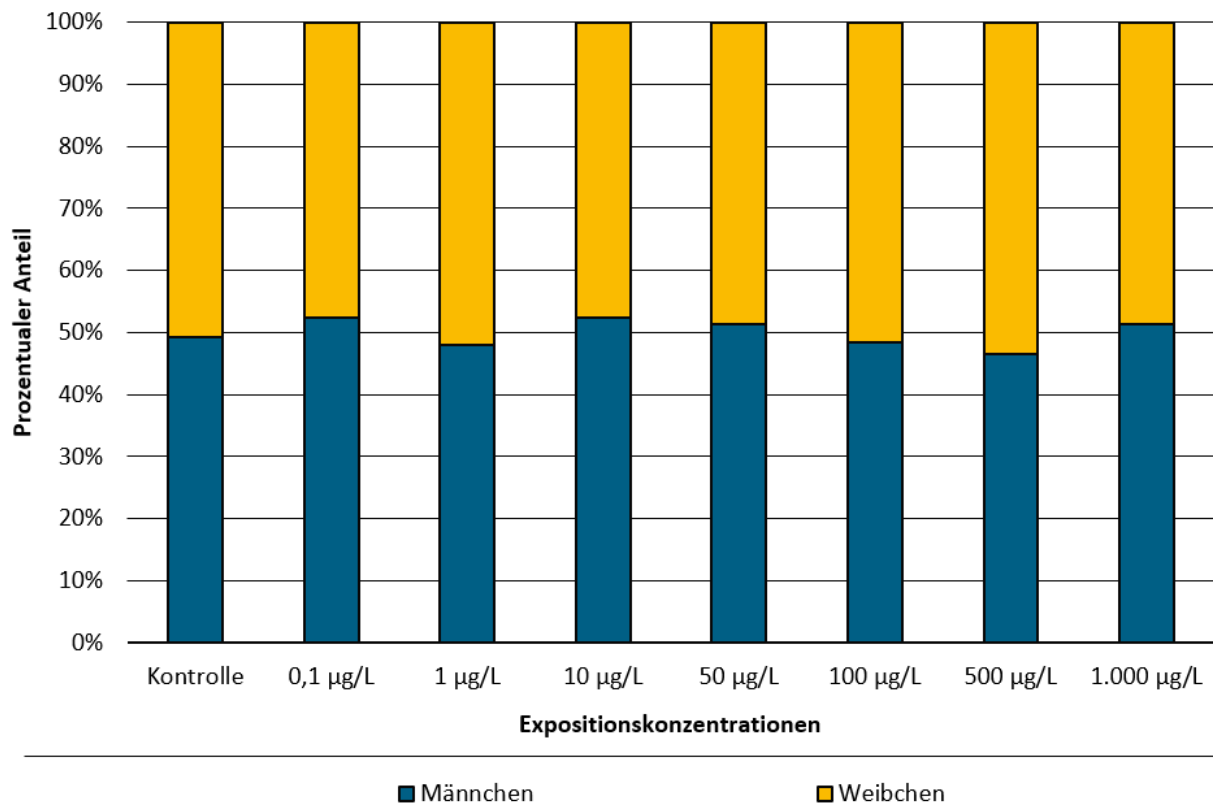
Daten: Mittelwerte mit SD. Die dargestellten Daten umfassen allen Männchen und Weibchen am Versuchsende.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

3.3.3.8 Qualitative und semiquantitative Histologie

Bei der Prozessierung der juvenilen Regenbogenforellen kam es in Einzelfällen zum Verlust des filigranen Gonadengewebes. Dies hatte zur Folge, dass rund 2,4 % ($n = 38$) der Versuchsfische von den Untersuchungen ausgeschlossen wurden (Tabelle 85 im Anhang B.7). Die histopathologische Untersuchungen wurde somit an insgesamt 1.550 Regenbogenforellen durchgeführt. Das Geschlechterverhältnis der Versuchspopulation lag bei nahezu 1:1. Histologisch wurden 49,9 % ($n = 774$) als männlich, sowie 50,1 % ($n = 776$) als weiblich identifiziert (Abbildung 43).

Abbildung 43: Histologisches Geschlecht juveniler Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)



200 Versuchsfische pro Testkonzentration; nGesamt = 1550, nMännlich = 774; nWeiblich = 776.

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

► Phänotypische Männchen

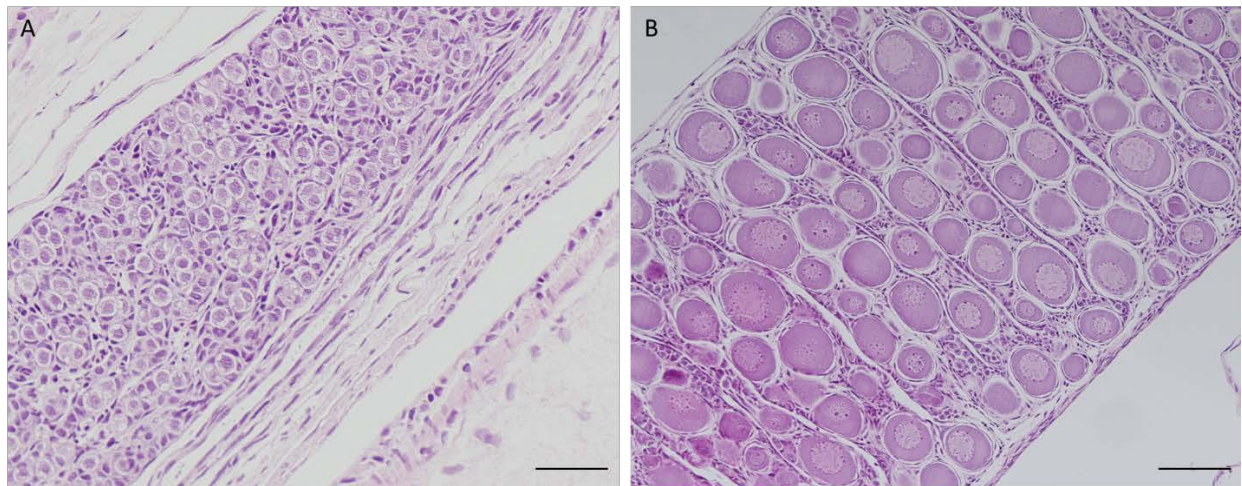
Die Hoden der untersuchten Regenbogenforellen ($n = 774$) zeigten einen filamentartigen Aufbau (Abbildung 44). Als Keimzellen wurden ausschließlich Gonozyten (spätere Spermatogonien) und Spermatogonien beobachtet. Das Auftreten von Spermatogonien markiert das präpubertäre Stadium (I_0) der Spermatogenese nach Billard (1992). Es wurden keine Hinweise auf stoffbedingte pathologische Veränderungen (z. B. Ovotestis) gefunden.

► Phänotypische Weibchen

Die Ovarien der untersuchten weiblichen Regenbogenforellen ($n = 776$) waren stets durch eine lamelläre Struktur gekennzeichnet und wurden entsprechend dem Auftreten bestimmter Keimzellen in zwei Reifestadien eingeteilt (Grier et al. 2007; Billard 1992).

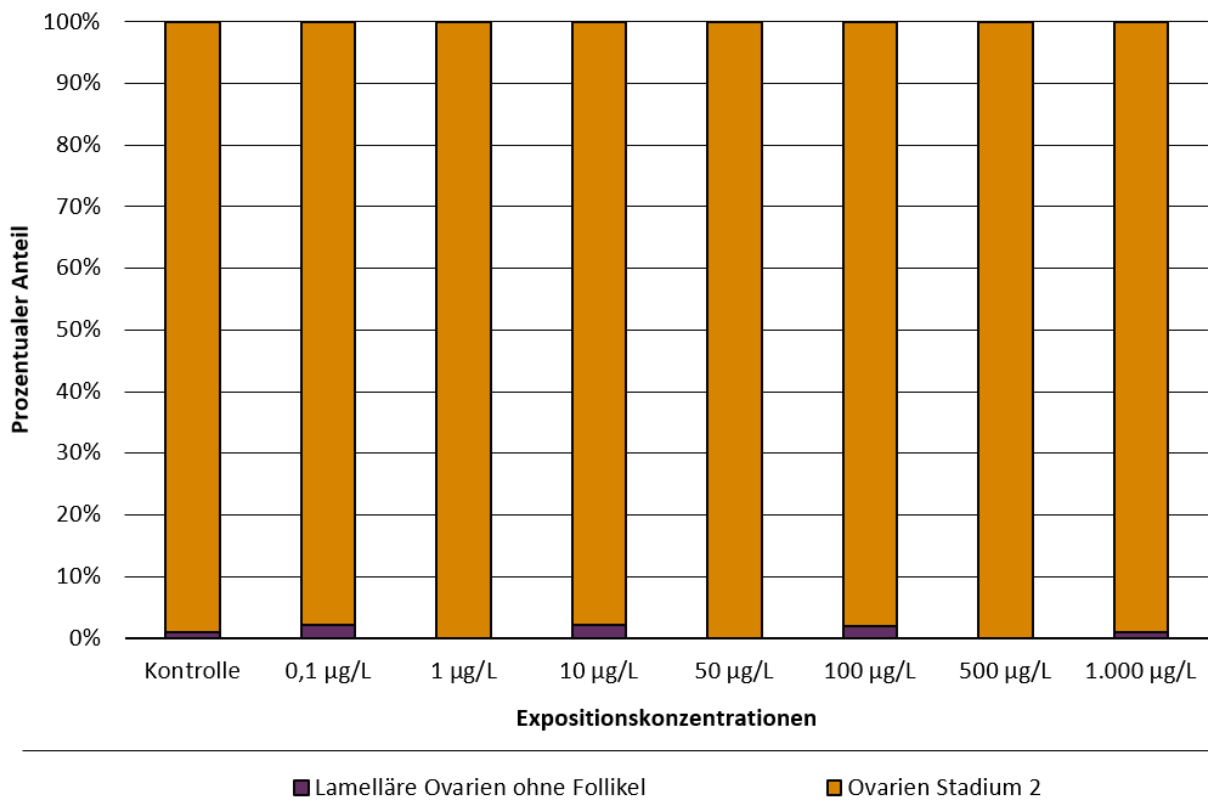
Bei 1 % der Fische ($n = 8$) wurde lediglich eine lamelläre Struktur mit ausschließlich Oogonien als einzigem Keimzelltyp nachgewiesen. Diese Fische wurden bezüglich des Reifegrades als juvenil eingestuft. Insgesamt 98,9 % ($n = 768$) der Weibchen wiesen Follikel im Stadium 2 der Prävitellogenese auf. Von diesen enthielten 9,5 % ($n = 73$) der Ovarien vereinzelt, stets primäre Oozyten [„early perinucleolar“ nach Billard (1992)]. Bei 90,5 % ($n = 695$) der Individuen mit Follikeln des Stadiums 2 traten im Stroma des gesamten Ovars konsistent primäre Oozyten auf (Abbildung 45). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Metformin-exponierten Tieren und Kontrollen hinsichtlich des Auftretens der verschiedenen Stadien der Oogenese festgestellt.

Abbildung 44: Histologische Untersuchung der Gonaden (Teilversuch Nr. 3, Metformin)



A: Physiologischer Hoden, juvenile Regenbogenforelle (137 dpf), Stadium I₀ nach Billard (1992); B: Physiologisches Ovar, juvenile Regenbogenforelle (137 dpf), Stadium 2a nach Billard (1992); Messbalken in beiden Abbildungen: 50 µm.
Quelle: Eigene Abbildung, LfU

Abbildung 45: Reifestadien juveniler, weiblicher Regenbogenforellen in der histologischen Untersuchung (Teilversuch Nr. 3, Metformin)



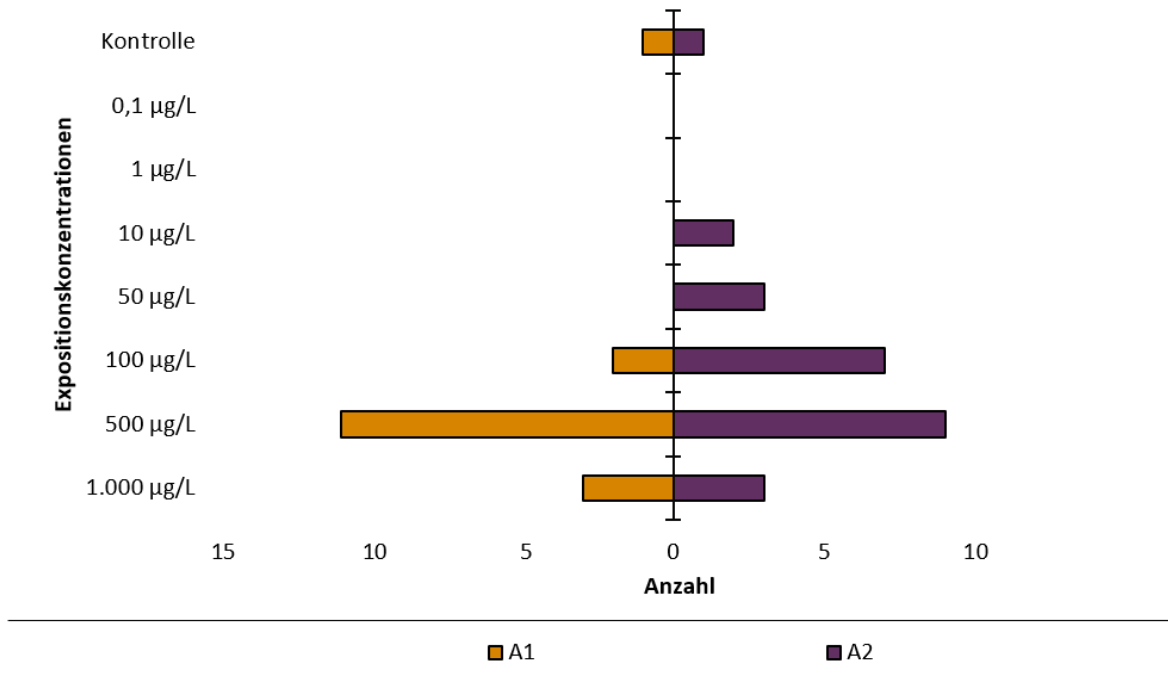
Gesamtanzahl Weibchen mit lamelläre Ovarien ohne Follikel ($n = 8$) sowie mit Ovarien mit Follikel des Stadiums 2 (nach Billard, $n = 768$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

3.3.3.9 Genetische Geschlechtsbestimmung

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Geschlechtsbestimmung mittels PCR zeigten im Vergleich mit der histologischen Geschlechtsbestimmung eine Abweichung von 2,8 % ($n = 42$) (Abbildung 46). Dabei waren sowohl histologisch weibliche als auch histologisch männliche Fischen von den Abweichungen betroffen.

Abbildung 46: Unterschiede bezüglich der Geschlechteridentifikation in Abhängigkeit von der Nachweismethode (Teilversuch Nr. 3, Metformin)



Fische der Gruppe A1: PCR-Ergebnis weiblich, Histologie männlich ($n_{\text{Gesamt}} = 17$).

Fische der Gruppe A2: PCR-Ergebnis männlich, Histologie weiblich ($n_{\text{Gesamt}} = 25$).

Quelle: Eigene Abbildung, LfU

3.4 Diskussion

3.4.1 Versuchsbedingungen

In allen drei Teilversuchen lagen die Messwerte der überprüften chemisch-physikalischen Wasserparameter (Wassertemperatur, Leitfähigkeit, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration, Ammoniak-Konzentration) über den gesamten Versuchszeitraum in dem für Regenbogenforellen angegebenen Referenzbereich (Hochleithner 2001). Sie entsprachen zudem den aktuellen Anforderungen der OECD zur Toxizitätsprüfung an Fischen (OECD 2014).

Die Mortalität lag in den drei Teilversuchen bei den Kontrollgruppen unterhalb der von der OECD zur Toxizitätsprüfung an Fischen geforderten maximalen 10 % (OECD 2014). Es wurde keine Expositions-bedingte Mortalität bei den Versuchsfischen festgestellt. Bereits publizierte Daten aus Standard-Biotests zur akuten und chronischen Toxizität von Metformin (z. B. Moermond und Smit (2015)) sowie aus chronischen, Nicht-Standard Biotests zu Auswirkungen von Metformin und Guanylhurea bei Fischen ergaben ebenfalls keine letalen Effekte der Substanzen in einem umweltrelevanten Konzentrationsbereich (Niemuth et al. 2015; Niemuth und Klaper 2015; Crago et al. 2016; Niemuth und Klaper 2018; Jacob et al. 2018; Ussery et al. 2018).

Das Studiendesign wurde darauf ausgerichtet die CRED-Kriterien hinsichtlich Verlässlichkeit und Relevanz zu erfüllen (Moermond und Smit 2015). Die für die Studienbewertung erforderlichen Daten finden sich unter Punkt 3.2 sowie im Anhang B.1.

3.4.2 Toxische Wirkungen von Metformin

Das Antidiabetikum Metformin wird beim Menschen vorwiegend für die Behandlung von Typ-2 (nicht-insulinabhängigem) Diabetes mellitus eingesetzt (Reitman und Schadt 2007). Im Menschen wird Metformin nicht metabolisiert, sondern unverändert über die Nieren ausgeschieden (Kümmerer et al. 2009). Somit kann die gesamte eingesetzte Arzneimitteldosis in das Abwasser gelangen. Bei der biologischen Reinigung des Abwassers im Klärwerk entsteht als aerob-bakterielles Transformationsprodukt Guanylhurea (Trautwein et al. 2011; Oliver Straub et al. 2018). Sowohl Metformin, als auch Guanylhurea sind in der aquatischen Umwelt stabil (LANUV 2015; Trautwein et al. 2011). Dementsprechend wurden in Deutschland hohe Konzentrationen von bis zu 39 µg/L Metformin in Kläranlagenabflüssen (LUBW 2014) sowie von bis zu 4,4 µg/L Metformin (bis zu 35 µg/L in der Emscher) in Oberflächengewässern nachgewiesen (LANUV 2015).

Die bisher im Rahmen von Standard-Biotests an Fischen ermittelte, niedrigste NOEC (No Observed Effect Concentration) von Metformin hinsichtlich chronischer Wirkungen (32 d, amerikanische Dickkopflritze (*Pimephales promelas*)) betrug $\geq 7,8$ mg/L (Moermond und Smit 2015). Diese NOEC lag somit deutlich oberhalb des in dieser Studie überprüften, z. T. umweltrelevanten Konzentrationsbereiches von 0,1 - 1.000 µg/L Metformin. In Bezug auf akute Toxizitätsdaten wurde als niedrigste EC₅₀ (96 h, Mortalität, Zebrafisch (*Danio rerio*)) bei Fischen eine Konzentration von > 86 mg/L beschrieben (Moermond und Smit 2015). Im Rahmen von Nicht-Standard Biotests wurden in der Regel keine Metformin-bedingten Mortalitäten oder Verhaltensveränderungen beschrieben (Niemuth et al. 2015; Niemuth und Klaper 2015; Ussery et al. 2018; Lee et al. 2018; Jacob et al. 2018).

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurde bei subadulten Regenbogenforellen nach Metformin-Exposition keine Mortalität festgestellt. Bei den juvenilen Regenbogenforellen betrug die Mortalität während des Versuchszeitraums 1-2 %. Bei anderen Langzeit-Studien mit Metformin in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich wurde bei Bachforellen (*Salmo*

trutta) eine vergleichbare Mortalität von 1-4 % beobachtet (Jacob et al. 2018). Die beobachteten Verluste lagen deutlich unterhalb der unter Aquakulturbedingungen normalerweise auftretenden mittleren Verluste bei Salmoniden dieses Entwicklungsstadiums (Hochleithner 2014). Vergleichbar den genannten Untersuchungen mit Bachforellen (Jacob et al. 2018) wurden auch in vorliegender Studie nach Metformin-Exposition keine Verhaltensauffälligkeiten oder Veränderungen des Schwimmverhaltens bei juvenilen oder subadulten Regenbogenforellen festgestellt. Weder bei juvenilen noch bei subadulten Regenbogenforellen wurden nach Metformin-Exposition pathologische oder histopathologische Veränderungen nachgewiesen.

Darüber hinaus wurden weder bei juvenilen noch bei subadulten Regenbogenforellen nach Metformin-Exposition Auswirkungen auf das Wachstum der Fische (Körpergewicht, Gesamtlänge, Korpulenzfaktor) nachgewiesen. Die Futteraufnahme war bei beiden Altersgruppen sowohl bei exponierten als auch bei den Kontrollfischen gut.

Im Vergleich mit Literaturdaten führte in einer Studie an Zebrafischen eine 100-tägige Metformin-Exposition in bis zu 120 µg/L ebenfalls zu keinen Effekten auf die Gewichtsentwicklung der Fische (Souza et al. 2019). Adulte Medakas (*Oryzias latipes*) wiesen nach 165-tägiger Exposition in 3,2 µg/L Metformin ebenso keine signifikanten Veränderungen biometrischer Daten oder biologischer Indices auf (Ussery 2018). Andere Untersuchungen an verschiedenen Fischarten ergaben hingegen negative Auswirkungen von Metformin auf das Wachstum insbesondere juveniler Fische. So wiesen männliche amerikanische Dickkopfelritzen nach Exposition in 40 µg/L Metformin über ein Jahr ein signifikant geringeres Gewicht auf als die Kontrollfische (Niemuth und Klaper 2015). Bei juvenilen Bachforellen wurde eine signifikante Abnahme des Körpergewichts nach Exposition in Metforminkonzentrationen von 10 µg/L und 100 µg/L (bei 7 °C) sowie 1 µg/L (bei 11°C) beschrieben, allerdings ohne dass eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung darstellbar war (Maximal-Konzentration: 1.000 µg/L) (Jacob et al. 2018). Bei juvenilen Medakas wurde nach 22-tägiger Exposition in ≥ 10 µg/L Metformin eine signifikant reduzierte Fischlänge, nach ≥ 3,2 µg/L Metformin ein reduziertes Fischgewicht ohne signifikante Veränderung des Korpulenzfaktors festgestellt (Ussery et al. 2018).

Im Zusammenhang mit negativen Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung von juvenilen Bachforellen (Jacob et al. 2018) und Medakas (Ussery et al. 2018) wurde als mögliche Ursache eine, beim Menschen beobachtete Verringerung der Aktivität der Adenosinmonophosphat-Kinase (AMPK) angeführt, die mit Auswirkungen auf den Appetit (Malin und Kashyap 2014; Jacob et al. 2018) bzw. den Stoffwechsel einhergehen kann (Ussery et al. 2018).

Literaturangaben zufolge wurden mittels histologischer und biochemischer Methoden Veränderungen der Glykogengehalte der Lebern von Bachforellen durch Metformin beschrieben. Die Versuchsfische zeigten bei einer Testkonzentration von 1 µg/L bei 7°C Wassertemperatur eine signifikante Erhöhung sowie bei 1.000 mg/L eine erhöhte Variabilität der Glykogenkonzentration (Jacob et al. 2018). Hingegen wurde die reduzierte Gewichtsentwicklung von männlichen Dickkopfelritzen auf eine endokrine Wirkung von Metformin zurückgeführt (siehe Punkt 3.4.3) (Niemuth und Klaper 2015).

Im Gegensatz zu den Veränderungen der Glykogengehalte in Lebern von Bachforellen wurden bei subadulten Regenbogenforellen weder in der HE-Färbung noch in der Spezialfärbung relevante Veränderungen der Scorewerte für die Speicherung von Glykogen und Fett festgestellt. Die Konzentrationen von Cholesterol, Triglyceriden, HDL und Glucose im Blut waren bei Versuchsfischen nach Metformin-Exposition gegenüber Kontrollfischen unverändert. Auch die Leberparameter Lebergewicht und HSI blieben von der Metformin-Exposition unbeeinflusst, sodass sich ein konsistentes Gesamtbild ergab.

Die Unterschiede zwischen den Literaturdaten zu Bachforellen, Medakas und Dickkopfelritzen (Jacob et al. 2018; Ussery et al. 2018; Niemuth und Klaper 2015) und den für Regenbogenforellen erhobenen Daten können zum einen durch speziesspezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber diesen Wirkungen von Metformin bedingt sein. So wurden Effekte von Metformin auf den Stoffwechsel von Regenbogenforellen bisher bei Konzentrationen im mg/L-Bereich beschrieben (Panerat et al. 2009; Polakof et al. 2011a). Generell haben Regenbogenforellen nur eine limitierte Fähigkeit zur Verwertung von Kohlenhydraten im Futter, weshalb sie nach kohlenhydratreichen Mahlzeiten eine Hyperglykämie entwickeln. Regenbogenforellen werden daher als eine Glukose-intolerante Fischart eingestuft (Moon 2001). Andere Studien untersuchten die Effekte von Metformin und Insulin auf diese postprandiale Hyperglykämie bei Regenbogenforellen. Im Gegensatz zu der Metformin-Wirkung bei Säugetieren wurde bei Regenbogenforellen keine Inhibition der Glukoneogenese in der Leber festgestellt (Panerat et al. 2009). Die postprandiale Hyperglykämie konnte jedoch durch orale Verabreichung von 50 mg Metformin/Kg KGW über 2 Wochen, möglicherweise durch Erhöhung der Aktivitäten von Enzymen der Lipogenese, gesenkt werden. Die Insulin-sensibilisierende Wirkung von Metformin beim Säugetier (Tang et al. 2012) wurde bei der Regenbogenforelle nur in der Leber nach intraperitonealer Gabe von Metformin beobachtet, während in Muskulatur und weißem Fettgewebe eine Insulinresistenz auftrat (Polakof et al. 2009). Nach intraperitonealer Gabe von 20 mg/Kg/Tag über 11 Tage führte Metformin daher bei der Regenbogenforelle zwar zu einer nicht signifikanten Erhöhung der Glykogengehalte der Leber jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Glykogengehalte in Muskulatur sowie weißem Fettgewebe (Polakof et al. 2011a). Als Wirkmechanismus für einige dieser Effekte wurde eine Aktivierung der AMPK identifiziert (Polakof et al. 2011b).

Darüber hinaus wird die Gewichtszunahme von Fischen von zahlreichen Parametern, darunter Futter-korrelierten Faktoren (z. B. Futtermenge, Futterregime, Futterqualität), äußerliche Faktoren wie Haltungsbedingungen (z. B. Fischdichte, Konzentrationen von gelöstem Sauerstoff) sowie innere Faktoren (z. B. Schilddrüsenhormone) beeinflusst (Weatherley 1976; Cacho et al. 1991; Boisclair und Leggett 1989; Johnsson und Björnsson 1994; LeBrasseur 1969). Unter kontrollierten, identischen Expositionsbedingungen in allen Testbecken sind die wesentlichen Einflussfaktoren auf die Gewichtszunahme der Versuchsfische abgesehen von der Testsubstanz die verabreichte sowie die tatsächlich aufgenommene (Appetit) Futtermenge. In der vorliegenden Studie mit Regenbogenforellen wurden zum Ausschluss von Variationen bei der verabreichten Futtermenge zwischen den Testaquarien die Futterportionen mittels Messbecher portioniert und abgewogen. Die gute Futteraufnahme der Versuchsfische sowie die frequenten Fütterungen in allen Testaquarien führten zu einer so gut wie vollständigen Aufnahme des verabreichten Futters.

Hinsichtlich möglicherweise Fütterungs-assoziierten Parameter wurde lediglich bei den subadulten Regenbogenforellen der 100 µg/L- und 1.000 µg/L-Versuchsgruppe ausschließlich für die LDL (Low-Density Lipoprotein)-Fraktion eine signifikante Abnahme festgestellt. Bei LDL handelt es sich um Lipoproteine, die als Transportvesikel für im Blutplasma wasserunlösliche Substanzen wie Triglyceriden oder fettlösliche Vitaminen fungieren (Kocaman et al. 2005). Erhöhte Konzentrationen von LDL stehen beim Menschen in Zusammenhang mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen, während für erniedrigte LDL-Werte keine Krankheitsrelevanz besteht (Morris et al. 2014). Im Zusammenhang mit Metformin-Behandlungen wurde bei Patienten mit Diabetes mellitus eine Abnahme erhöhter LDL-Konzentrationen beschrieben (Kirpichnikov et al. 2002). Als möglicher Wirkmechanismus hierfür wurde eine, durch die Aktivierung der AMPK bedingte, Suppression der FADs (Fatty Acid Desaturase)-Gene angenommen (Xu et al. 2015). Bei Fischen wurden bislang keine Auswirkungen einer Metformin-Exposition auf die LDL-Fraktion

beschrieben. Da in der Literatur Hinweise auf Metformin-Wirkungen über den AMPK-Mechanismus bei Fischen beschrieben wurden (Ussery et al. 2018; Polakof et al. 2011b; Xu et al. 2018; Zhou et al. 2019) könnten die Effekte auf die LDL-Fraktion ebenfalls auf die Metformin-Exposition zurückzuführen sein. Die Konzentration von LDL unterliegt bei Fischen, abhängig beispielsweise vom Reproduktionsstatus (Kocaman et al. 2005) und der Fütterung (Furné et al. 2012), physiologischen Schwankungen. Über die pathologische Relevanz erniedrigter LDL-Werte bei Fischen ist bislang nichts bekannt.

Im Hinblick auf die hämatologischen Untersuchungen wurde ausschließlich bei der 0,1-µg/L-Versuchsgruppe eine signifikante Zunahme stabkerniger neutrophiler Granulozyten ermittelt. Insgesamt entsprach das Verteilungsmuster der weißen Blutzellen im Differentialblutbild den für Regenbogenforellen publizierten Daten (Modrá et al. 1998). Bei der festgestellten Veränderung bestand keine Abhängigkeit zur Höhe der Expositionskonzentration. Im Hinblick auf Entzündungszellen ist bei Metformin eine inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren bekannt (Pandey und Kumar 2016). So wurde beispielsweise bei Frauen mit polyzystischem Ovarsyndrom nach einer 6monatiger Gabe von 850 mg Metformin zweimal täglich eine Abnahme der Gesamtleukozytenzahl beobachtet (Orio et al. 2007). Veränderungen hinsichtlich der Leukozytenzahlen wurden bei den subadulten Regenbogenforellen nach Metformin-Exposition jedoch nicht festgestellt. Spezifische Wirkungen von Metformin auf Granulozyten sind bislang nicht bekannt.

Zusammenfassend wurde bei subadulten Regenbogenforellen als mögliche Folge einer Exposition in umweltrelevanten Konzentrationen von Metformin lediglich eine tendenzielle Abnahme von LDL mit einer statistischen Signifikanz in den Versuchsgruppen mit 100 µg/L und 1.000 µg/L Metformin festgestellt. Die pathologische Relevanz dieser Veränderung ist bei Fischen noch ungeklärt.

3.4.3 Endokrine Wirkung von Metformin

Metformin stellt ein, in der Humanmedizin sehr häufig eingesetztes Arzneimittel zur Behandlung von Typ 2-Diabetes dar. Neben der gewünschten therapeutischen Wirkung einer Absenkung des Blutzuckerspiegels kann Metformin zu einer Beeinflussung des Hormonsystems bei Menschen und Säugetieren führen (Ferreira et al. 2015; Bertoldo et al. 2014; Faure et al. 2018). In der Literatur finden sich zudem Hinweise auf endokrin disruptive Effekte in Form einer estrogenen Wirkung bei männlichen Fischen (Niemuth et al. 2015; Niemuth und Klaper 2015; Crago et al. 2016; Niemuth und Klaper 2018).

Die vorliegenden Untersuchungen an subadulten Regenbogenforellen hinsichtlich möglicher endokriner Wirkungen von Metformin konzentrierten sich in erster Linie auf eine Beeinflussung geschlechtshormoneller Regelkreise. Die Studie umfasste neben der Analyse von biometrischen Daten und Sexualhormonen auch die histopathologische Beurteilung der Hoden. Um mögliche Effekte speziell auf die Geschlechtsentwicklung männlicher Fische abzuklären, erfolgte eine Bestimmung des Reifegrades des Hodengewebes mittels stereologischer Methoden. Zur Erfassung möglicher endokriner Wirkungen auf Regenbogenforellen in einer besonders empfindlichen, frühen Entwicklungsphase wurden zusätzliche Untersuchungen an juvenilen Regenbogenforellen durchgeführt. In der vorliegenden Studie wurde mit der Regenbogenforelle gearbeitet, bei der es sich um eine geschlechtlich eindeutig differenzierte Fischart (Takashima et al. 1980) und zudem um eine der am häufigsten in unseren Gewässern anzutreffende Fischart handelt. In den bisher veröffentlichten Studien, die eine estrogenen Wirkung von Metformin beschreiben, wurden hingegen Laborfischarten wie die amerikanischen Dickkopfelritze oder

Medaka verwendet. In keiner dieser Studien erfolgte eine stereologische und damit quantitative histologische Untersuchung zur Bestimmung des Reifegrades der Hoden.

Bei den im Rahmen der aktuellen Studie durchgeführten Biomarker-Untersuchungen wurden statistisch signifikante Effekte nach Metformin-Exposition bei subadulten, männlichen und weiblichen Regenbogenforellen beobachtet. Von den Veränderungen betroffen waren die Blutplasmakonzentrationen von Vitellogenin (VTG), 17 β -Estradiol (E2), Aromatase sowie die Hormonquotienten aus 17 β -Estradiol und Testosteron (E2/Ts).

Die Untersuchung von VTG im Blut männlicher Fische ist eine weit verbreitete Methode zum Nachweis estrogenen Wirkungen von Substanzen (Sumpter und Jobling 1995; Christiansen et al. 1998; Schwaiger und Negele 1998; Jones et al. 2000) und stellt in verschiedenen OECD-Guidelines (OECD-Guidelines 229, 230, 234) (OECD 2014, 2004) einen wesentlichen Endpunkt zur Überprüfung estrogenen Wirksamkeit von Substanzen dar

Ab einer Testkonzentration von 100 μ g/L Metformin lag die Konzentration des Biomarkers VTG bei subadulten, männlichen Regenbogenforellen bei maximal 51 μ g/L und war damit gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Obwohl diese VTG-Konzentrationen noch im Bereich physiologischer VTG-Spiegel bei männlichen Regenbogenforellen liegen (Copeland et al. 1986) wird diese 2fache Induktion von VTG auf Grund ihrer Konzentrationsabhängigkeit als geringer aber relevanter Effekt bewertet. Im Vergleich zu Veränderungen von VTG im Blutplasma männlicher Regenbogenforellen durch bekannte estrogen wirksame Substanzen war die festgestellte Induktion von VTG zudem gering. In Laborversuchen wurden beispielsweise nach Exposition mit der estrogen wirksamen Substanz Nonylphenol eine 11fache VTG-Induktion beschrieben (Schwaiger et al. 2002). Eine Exposition mit den Estrogenen E2, Ethinylestradiol und Diethylstilbestrol verursachte sogar eine bis zu 100.000fache Erhöhung der VTG-Konzentration (Christiansen et al. 1998). In Freilandversuchen wurde eine Zunahme der VTG-Konzentrationen auf über 10 mg/mL beobachtet (Harries et al. 1999; Harries et al. 1997).

Die in vorliegender Studie beobachtete, geringe Induktion von VTG entspricht den bei anderen Fischarten beschriebenen Effekten nach Metformin-Exposition. Bei adulten amerikanischen Dickkopfelritzen führte Metformin in einer Konzentration von 40 μ g/L, bei juvenilen Fischen hingegen bereits in einer Konzentration von 1 μ g/L, zu einer signifikanten Induktion der VTG-mRNA (Crago et al. 2016; Niemuth et al. 2015). Dies hatte jedoch keine signifikante Erhöhung der VTG-Proteinkonzentration im Blutplasma zur Folge (Niemuth et al. 2015). Eine Exposition von Medakas beiderlei Geschlechts in 3,2 μ g/L Metformin über 165 Tage führte zu keiner Erhöhung der VTG-Konzentrationen in der Leber (Ussery 2018). Eine zwei Generationen umfassende Studie mit Medakas zeigte nach Metformin-Exposition eine Beeinflussung der Expression der VTG1- und VTG2-mRNA bei beiden Geschlechtern der F0 und der F1 Generation (Lee 2017).

Bei verschiedenen Fischarten wurden unterschiedliche Formen von VTG nachgewiesen, die in Abhängigkeit von Umweltfaktoren in variablen Anteilen vorliegen können und je nach Nachweismethode die Ergebnisse beeinflussen können (Hiramatsu et al. 2006). Bei Regenbogenforellen wurden 20 vollständige VTG-Gene und 10 Pseudogene im haploiden Genom nachwiesen (Trichet et al. 2000), die jedoch alle zum VTG-A Gencluster zählen (Buisine et al. 2002). Da sich diese Gene auf dem Nukleotidlevel nur um weniger als 3 % unterscheiden werden die synthetisierten Proteine sehr wahrscheinlich alle mittels des in vorliegender Studie verwendeten, enzymatischen Immunadsorptionsverfahren erfasst.

Ein Anstieg von VTG im Blutplasma männlicher Fische kann prinzipiell durch die Beeinflussung der Wirkungsweise von Estrogen-Rezeptor (ER), anti-ER, Androgen-Rezeptor (AR), anti-AR,

Steroidogenese, Schilddrüsenhormon-Rezeptor, Adrenozeptoren, Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor, Cyclooxygenase, Gamma-Aminobuttersäure(GABA-)Agonisten, Progesteronrezeptor oder unspezifisch erfolgen (Dang 2016). In den meisten Studien wurde der Anstieg der VTG-Konzentration bei männlichen Fischen über eine Bindung der Testsubstanz an den ER vermittelt. Nach Metformin-Exposition wurde auf Genexpressionsebene ebenfalls eine signifikante Hochregulation des ERs bei amerikanischer Dickkopfelritze, Medaka und Zebrafisch beschrieben (Crago et al. 2016; Lee 2017; Crago und Klaper 2018). Bei *in vitro* Versuchen wurde jedoch keine Bindung von Metformin an den ER festgestellt (Zang et al. 2013). Somit ist der Mechanismus für die beobachtete estrogene Wirkung von Metformin bei Fischen noch nicht abschließend geklärt (Dang 2016; Niemuth und Klaper 2018). Bei anderen Spezies beeinflusst Metformin die Funktion von Hoden und Ovar sowohl über einen Adenosinmonophosphat-Kinase (AMPK)-abhängigen als auch über einen AMPK-unabhängigen Weg, welcher noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Faure et al. 2018). Hinweise auf eine AMPK-abhängige Wirkung von Metformin wurden bereits bei verschiedenen Fischarten beschrieben (Polakof et al. 2011b; Ussery et al. 2018; Zhou et al. 2019; Xu et al. 2018). Neben endokrinen Disruptoren können generell auch andere Faktoren wie die Fütterung, Infektionskrankheiten und Haltungsbedingungen die VTG-Konzentrationen im Blut von Fischen beeinflussen (Dang 2016). Allerdings wurde im Rahmen der vorliegenden Studie unter kontrollierten Laborbedingungen gearbeitet, sodass diese Faktoren als mögliche Ursachen für den VTG-Anstieg weitestgehend auszuschließend sind.

VTG wird physiologisch auch bei männlichen Regenbogenforellen in geringen Konzentrationen durch Einwirkung von körpereigenem E2 gebildet (Copeland et al. 1986). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde bei männlichen Regenbogenforellen neben einem signifikanten Anstieg der VTG-Konzentration jedoch eine Abnahme von E2 festgestellt. Ab einer Konzentration von 10 µg/L Metformin, war mit Ausnahme der 100 µg/L-Versuchsgruppe, eine statistisch signifikante Abnahme der E2-Konzentrationen im Blutplasma zu beobachten. Weibliche Regenbogenforellen zeigten in den beiden Expositionsgruppen mit 10 µg/L sowie 1.000 µg/L Metformin ebenfalls signifikant erniedrigte Gehalte von Estradiol. Bei beiden Geschlechtern wurden zudem signifikante Veränderungen des Hormonquotienten aus E2/Ts nachgewiesen.

Bei Medaka beider Geschlechter führte Metformin in einer Konzentrationen von 3,2 µg/L zu keiner Veränderung der E2-Produktion in der Leber (Ussery et al. 2018). Ebenfalls an dieser Fischart durchgeführte Untersuchungen ergaben nach Exposition in 0,03/0,3 und 3 mg/L Metformin keine Veränderungen, während bei 30 mg/L eine statistisch signifikante Zunahme von E2 im Blutplasma festgestellt wurde (Lee 2017).

Eine mögliche Ursache für die bei Regenbogenforellen festgestellte Abnahme der E2 Konzentrationen sind negative Feedback-Mechanismen infolge der erhöhten Vitellogenin-Konzentrationen. Regenbogenforellen zeigten zum Beispiel nach Injektion von Vitellogenin eine signifikante Abnahme von körpereigenem E2 (Reis-Henriques et al. 1997). Eine Kombination aus signifikanter Zunahme von Vitellogenin sowie Abnahme von körpereigenem E2 wurde auch bei subadulten Regenbogenforellen nach Einwirkung von Ethinylestradiol (EE2) beobachtet. Als ursächlich wurden zentrale, endokrine Rückkopplungsmechanismen vermutet (Nardy 1999). Im Gegensatz dazu führte die endokrin wirksame Substanz Nonylphenol zwar zu einer 5fachen Induktion von VTG, jedoch nur zu einer nicht signifikanten Reduktion von körpereigenem E2 (Nardy 1999). Es ist nicht auszuschließen, dass auch die in vorliegender Studie nach Metformin-Exposition ermittelte 2fache VTG-Induktion möglicherweise nicht ausreichend hoch war, um

über eine negative, hormonelle Rückkopplung alleine für die signifikante Reduktion von körpereigenem E2 verantwortlich zu sein.

Eine Metformin-bedingte signifikante Abnahme von E2 wurde ebenfalls bei *in vitro* Versuchen mit Granulosazellen von Ratten und Rindern nachgewiesen (Mansfield et al. 2003; Tosca et al. 2006; Tosca et al. 2007). Als Ursachen für diese Abnahme der E2-Konzentration bei Säugetieren wurde sowohl eine Hemmung der Enzymaktivität als auch eine Inhibition der Genexpression der Aromatase beschrieben. Bei den Aromatasen handelt es sich um Enzyme, die die Umwandlung von Androgenen zu Estrogenen katalysieren (Piferrer und Blazquez 2006). *In vitro* Versuche mit verschiedenen menschlichen Zelltypen zeigten eine Hemmung der Aromatase-Aktivität durch Metformin (Takemura et al. 2007; Dean et al. 2016; Zhou et al. 2015). Eine Abnahme von E2 durch kompetitive Hemmung der Aromatase wurde beispielsweise auch für endokrin wirksame Flavonoide, sogenannte Phytoestrogene, nachgewiesen (Moon et al. 2006; Kao et al. 1998; van Meeuwen et al. 2008). Bei Regenbogenforellen wurde ebenfalls eine Hemmung der Aromatase-Aktivität durch zahlreiche Stoffe beschrieben (Pelissero et al. 1996; Hinfrey et al. 2006). Allerdings führen klassische Aromatase-Hemmer bei Säugetieren und Fischen nicht in jedem Fall zu vergleichbaren Effekten. *In vitro* Versuche an Ovarien-Mikrosomen der Regenbogenforelle mit verschiedenen Aromatase-Hemmern zeigten zwar bei Regenbogenforellen ebenfalls eine Inhibition der Aromatase, dieser Effekt war *in vivo* jedoch nicht darstellbar (Shilling et al. 1999). Aufgrund der nun für Regenbogenforellen vorliegenden Ergebnisse kann eine Hemmung der Aromatase-Aktivität durch Metformin nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Allerdings ergaben sich bei den im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten Regenbogenforellen *in vivo* abgesehen von einer Abnahme von Estradiol keine weiteren Hinweise auf eine Hemmung der Aromatase wie beispielsweise eine Abnahme von VTG oder eine gehemmte Ovarienentwicklung.

Als eine weitere Ursache für eine Abnahme der Estradiol-Konzentration nach Metformin-Exposition ergaben *in vitro* Untersuchungen an menschlichen Zellen eine Inhibition der Genexpression der Aromatase (Rice et al. 2009; Fuhrmeister et al. 2014). Im Gegensatz hierzu wurde bei Fischen als Effekte von Metformin eine unveränderte oder vermehrte Expression des die Aromatase codierenden Gens CYP19 beschrieben. So verursachte Metformin in Konzentrationen von 10 µg/L bzw. 40 µg/L bei adulten amerikanischen Dickkopfelritzen und Zebrafisch-Embryos eine signifikante Hochregulation von CYP19A (Crago und Klaper 2018; Niemuth und Klaper 2018; Crago et al. 2016). In einer anderen Studie führte eine vierwöchige Exposition mit 40 µg/L Metformin bei adulten männlichen amerikanischen Dickkopfelritzen hingegen nicht zu einer signifikanten Genexpressionsänderung von CYP19A (Niemuth et al. 2015). Bei Medakas der F0-Generation führte eine Exposition in 3 und 30 mg/L Metformin zu einer signifikanten Zunahme der Genexpression von CYP19a in männlichen Gonaden während in weiblichen Gonaden keine Veränderungen festgestellt wurden (Lee et al. 2018). Demnach scheinen Spezies-spezifische Unterschiede zwischen der Wirkung von Metformin auf die Genexpression der Aromatase zu bestehen.

Die Konzentration der Aromatase im Blutplasma männlicher Regenbogenforellen zeigte nach Metformin-Exposition in Konzentrationen zwischen 0,1 µg/L und 50 µg/L einen signifikanten Anstieg. Bei höheren Testkonzentrationen wurde jedoch kein weiterer Anstieg der Aromatase-Konzentration, sondern ein den Kontrolltieren vergleichbarer, stabiler Aromatase-Spiegel beobachtet. Ausschließlich bei weiblichen Regenbogenforellen, die 1 µg/L Metformin ausgesetzt waren, zeigten sich zudem eine signifikante Reduktion der Aromatase-Konzentration. Wie bei

anderen Fischarten wurden somit auch bei Regenbogenforellen geschlechtsspezifisch unterschiedliche Effekte durch Metformin festgestellt. Bei männlichen Regenbogenforellen wurde entsprechend der bei anderen Fischarten beobachteten Induktion von CYP19 eine erhöhte Konzentration der Aromatase ermittelt. Dieser Effekt trat jedoch nur bei Metformin-Konzentrationen zwischen 0,1 µg/L und 50 µg/L. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern somit keine Hinweise auf eine Inhibition der Genexpression der Aromatase und damit auch keine Erklärung zur möglichen Ursache, der bei Regenbogenforellen beobachteten, Abnahme der E2-Konzentrationen.

In der vorliegenden Studie wurden außerdem die Konzentrationen der Androgene 11-Ketotestosteron und Testosteron im Blutplasma bestimmt. Diese beiden Hormone werden bei Knochenfischen (Teleostei) durch Stimulation von FSH (Follikel-Stimulierendes Hormon) hauptsächlich in den Gonaden gebildet und steuern unter anderem die Sexualentwicklung (Borg 1994; Billard et al. 1982). Die nun vorliegenden Untersuchungen ergaben weder bei männlichen noch bei weiblichen subadulten Regenbogenforellen nach Metformin-Exposition signifikante Veränderungen der Blutplasma-Konzentrationen von 11-Ketotestosteron und Testosteron.

Je nach untersuchter Spezies und Allgemeinzustand wurden unterschiedliche Effekte von Metformin auf die Androgen-Konzentrationen im Blut beschrieben. Vergleichbar den an Regenbogenforellen erhobenen Ergebnissen hatte eine Metformin-Exposition keine Auswirkungen auf die Testosteron-Konzentrationen männlicher amerikanischer Dickkopflritzen (Niemuth et al. 2015; Niemuth und Klaper 2018) sowie auf die 11-Ketotestosteron-Konzentrationen männlicher Medakas (Ussery 2018). In einer anderen Studie wurde hingegen bei männlichen Medakas ein signifikant abnehmender Trend für Testosteron sowie eine nicht signifikante Abnahme von 11-Ketotestosteron beobachtet (Lee 2017). Bei männlichen Säugetieren wurde nach Metformin-Exposition insbesondere eine Abnahme der Testosteron-Konzentrationen beschrieben, wohingegen beispielsweise adipöse Individuen einen Anstieg der Testosteron-Konzentration aufwiesen (Ferreira et al. 2015; Faure et al. 2018; Bertoldo et al. 2014). Für weibliche Tiere sind nur wenige Literaturdaten zu Effekten von Metformin auf Androgen-Konzentrationen verfügbar. Bei weiblichen Medaka wurde ein signifikanter Anstieg von 11-Ketotestosteron nachgewiesen (Ussery 2018; Lee 2017). Bei Frauen wurde nach Metformin-Exposition eine Abnahme von Testosteron beobachtet (Bertoldo et al. 2014).

Die Auswertung der Gonadengewichte und des gonadosomatischen Index ergab keine Hinweise auf eine Metformin-bedingte Beeinflussung der Geschlechtsentwicklung subadulte Regenbogenforellen. In Verbindung mit einer Metformin-Exposition stehende Untersuchungsergebnisse zu diesen Parametern bei anderen Fischarten sind bislang nicht verfügbar. Bei Mäuseembryonen und Kaninchen wurde jedoch nach Metformin-Exposition eine Abnahme der Hodengröße bzw. des Hodengewichts ermittelt (Tartarin et al. 2012; Naglaa et al. 2010).

Die im Rahmen der aktuellen Studie durchgeführten histopathologischen und stereologischen Untersuchungen des Hodengewebes männlicher, subadulte Regenbogenforellen lieferten keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Gonadenreife durch Veränderungen der Keimzellzahlen nach 28tägiger Metformin-Exposition. Die signifikante Reduktion des Schätzzvolumens von Spermatiden nach Exposition in 10 µg/L Metformin stand nicht im Zusammenhang mit einer klaren Dosis-Wirkungskurve und war anhand des Absolutvolumens nicht mehr darstellbar. Histopathologische Veränderungen wie beispielsweise Intersex-Hoden mit dem Auftreten von Ovotestis wurden nicht beobachtet. Ebenso wurden bei den exponierten subadulten, weiblichen

Regenbogenforellen keine histopathologischen Veränderungen oder Abweichungen des Reifegrades der Ovarien gegenüber den Kontrollfischen festgestellt.

Darüber hinaus wurden Untersuchungen zu Auswirkungen einer Metformin-Exposition auf die Geschlechtsentwicklung juveniler Regenbogenforellen (137 dpf) durchgeführt. Bei der Regenbogenforelle handelt es sich im Gegensatz zu manchen anderen Fischarten um eine geschlechtlich eindeutig differenzierte Fischart ohne physiologisches Auftreten von Intersex-Gonaden (Takashima et al. 1980). Eine belastbare histologische Geschlechtsbestimmung ist nach Abschluss der labilen Entwicklungsphase der Gonaden, gekennzeichnet durch den Übergang der Oozyten in die erste Meiose, möglich (Krisfalusi und Nagler 2000; Piferrer und Blazquez 2006). Bei weiblichen Regenbogenforellen ist die phänotypisch charakteristische, lamelläre Struktur der Ovarien im Alter von 12-16 Wochen vollständig ausgebildet. Die erste meiotische Aktivität und der damit verbundene Anstieg der Keimzellzahl finden bereits im Alter von 5 Wochen statt (Billard 1992). Das Geschlecht der Regenbogenforelle ist genetisch determiniert. Weibchen besitzen einen „XX“ Karyotyp wogegen die Männchen einen „XY“ Karyotyp aufweisen. Das genetische Geschlecht bleibt von umweltassoziierten Einflüssen unberührt (Quillet et al. 2002). Eine Exposition mit estrogen wirksamen Substanzen kann jedoch sowohl bei adulten (Schwaiger et al. 2002) als auch bei juvenilen (Depiereux et al. 2014; Krisfalusi und Nagler 2000) Regenbogenforellen zu morphologischen Veränderungen des Hodengewebes und zur Bildung von Ovotestis führen.

Bei den, im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchten, juvenilen Regenbogenforellen wiesen die Hoden histologisch einen filamentartigen Aufbau auf und enthielten als Keimzellen Gonozyten und Spermatogonien (Stadium I₀ nach Billard (1992)). Die Ovarien der juvenilen Regenbogenforellen zeigten eine lamelläre Struktur sowie bei 98,9 % der Fische Follikel des Stadiums 2 (Prävitellogenese nach Billard (1992)). Die histologische Untersuchung der Metformin-exponierten Individuen ergab ein nahezu ausgeglichenes Geschlechterverhältnis. In keiner der Versuchsgruppen wurden Hinweise auf Intersex-Gonaden beispielsweise durch das Auftreten von Ovotestis festgestellt.

Aus biologischer sowie evolutionärer Sicht erfährt eine Population durch Selektion am Einzelindividuum ein nahezu ausgeglichenes Geschlechterverhältnis (Fisher's Regel) (Conover und van Voorhees 1990). Diese Beobachtung gilt sowohl für wildlebende als auch für Forellen aus der Aquakultur (Janowicz et al. 2018; Schwaiger et al. 2002).

Neben der histologischen Untersuchung erfolgte eine molekularbiologische Ermittlung des Geschlechts mittels PCR. Die Bestimmung erfolgt über das für männliche Individuen charakteristische *sdY*-Gen, welches bereits in frühen Altersstufen exprimiert wird (Yano et al. 2012). Während in Teilversuch Nr. 2 die genetische Geschlechtsbestimmung an subadulten Fischen eine 100 %ige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der histologischen Geschlechtsbestimmung aufwies, wurde im Teilversuch Nr. 3 bei juvenilen Fischen insgesamt eine Abweichung der Ergebnisse von Molekularbiologie und Histologie von 2,7 %, verteilt auf verschiedene Versuchsgruppen festgestellt. Prinzipiell können endokrine Disruptoren mit estrogen oder androgener Wirkung sowie Aromatase-Hemmer zu einer vollständigen Geschlechtsumwandlung bei Fischen und damit zu einem Unterschied zwischen phänotypischem und genetischem Geschlecht führen (Johnstone et al. 1978; Afonso et al. 2001; Devlin und Nagahama 2002). Je nach Wirkungsweise des endokrinen Disruptors werden dabei entweder genetisch weibliche Tiere phänotypisch vermännlicht oder genetisch männliche Tiere phänotypisch verweiblicht. In vorliegendem Versuch wurden in juvenilen Regenbogenforellen jedoch geringe Abweichungen von histologischem und genetischem Geschlecht in beide Richtungen festgestellt (1,1 % Histologie: männlich, PCR: weiblich; 1,6 % Histologie: weiblich, PCR: männlich). Literaturangaben zufolge entstehen selbst bei der gezielten Erzeugung von

geschlechtsumgewandelten Regenbogenforellen Tiere mit Intersex-Gonaden (Kuzminski und Dobosz 2010). In den aktuellen Untersuchungen wurden histologisch jedoch keine Tiere mit Anzeichen von Intersex-Gonaden identifiziert. Darüber hinaus wurden auch bei Kontrollfischen Abweichungen zwischen den molekularbiologischen und histologischen Ergebnissen festgestellt. Ein kausaler Zusammenhang dieser Abweichungen zur Metformin-Exposition kann daher nicht hergestellt werden. In vorliegender Studie lag der Gesamtanteil von Fischen, für die anhand molekularbiologischer und histologischer Untersuchungen eine unterschiedliche Bestimmung des Geschlechts erfolgte, bei 2,7 %. Dies entsprach einem für Regenbogenforellen beschriebenen Anteil von 3-4 %, bei dem die Bestimmung des *sdY*-Gens zu einer fehlerhaften Geschlechtsidentifikation führte (Komrakova et al. 2018). Diese Diskrepanz zwischen dem genetischen Marker *sdY* und dem phänotypischen Geschlecht wurde auf Unterschiede in der Lokalisation des Markers, auf Umweltfaktoren, epigenetische Mechanismen (Quillet et al. 2002) sowie gelegentliche Deletionen von Regionen des Y-Chromosoms zurückgeführt (Brunelli et al. 2008). In einer aktuellen Studie wurde das *sdY* Gen zudem aus Flossenproben und Fischschleim adulter Individuen isoliert (Komrakova et al. 2018). Bei den Fischen mit molekularbiologisch männlichem und histologisch weiblichem Geschlecht ist als Ursache für diese Diskrepanz eine Übertragung von Fischschleim von männlichen auf weibliche Fische und somit eine artifizielle Kontamination der Proben mit männlicher DNA als Ursache für die abweichenden Ergebnisse nicht auszuschließen.

Literaturangaben zufolge führte eine einjährige Exposition in 40 µg/L Metformin bei männlichen amerikanischen Dickkopfelritzen zu einem Anstieg des Anteils und der Intensität des Auftretens von Intersex-Hoden (Niemuth und Klaper 2018, 2015). Diese histologischen Veränderungen waren durch eine 4-wöchigen Exposition in 40 µg/L Metformin nicht reproduzierbar (Niemuth et al. 2015). Im Gegensatz dazu führte eine Metformin-Exposition von Medakas über zwei Generationen hinweg (133 Tage) zu keinen histologisch nachweisbaren Veränderungen des Hodengewebes (Lee et al. 2018). Bei anderen Spezies wurden Auswirkungen einer Metformin-Exposition auf die Morphologie der Hoden z. B. in Form einer reduzierten Hodengröße oder Spermienzahl beobachtet (Faure et al. 2018; Bertoldo et al. 2014). Intersex-Gonaden traten jedoch in keiner dieser Studien auf.

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Daten auf eine dezente Beeinflussung des Hormonsystems subadulter, männlicher Regenbogenforellen nach 28-tägiger Metformin-Exposition hin. Die statistisch signifikanten Veränderungen beschränkten sich auf Veränderungen im Blutplasma und umfassten eine geringe Induktion der VTG-Plasmaproteine, eine Abnahme der E2-Konzentrationen sowie einen Anstieg der Aromatase. Darüber hinaus führte Metformin zu keinen Veränderungen im Hinblick auf biometrische Daten, biologische Indices und Organveränderungen.

In der Regel liegen die Konzentrationen einer estrogen wirksamen Substanz, die zu einer Induktion von VTG führen, deutlich niedriger als die Konzentrationen, die zu morphologischen Veränderung der Geschlechtsorgane und ggf. zu Fortpflanzungsstörungen führen können. Bei juvenilen Fischen hingegen können VTG-Induktion und Anomalien des Geschlechtssystems schon in vergleichbaren Konzentration auftreten (Hara et al. 2016). In vorliegender Studie führten allerdings Metformin-Konzentrationen, die um das 10-fache über der Wirkschwelle zur Induktion von VTG bei subadulten Fischen lagen, auch nach 94-tägiger Expositionszeit zu keinen Effekten auf das Wachstum oder die Morphologie und Entwicklung der Gonaden juveniler Regenbogenforellen.

Eine Interpretation der beobachteten Effekte auf die Konzentrationen von Aromatase und E2 im Blut subadulter Regenbogenforellen gestaltet sich schwierig. Die Befunde ergeben im Zusammenhang mit den anderen erhobenen Ergebnissen kein in sich stimmiges Gesamtbild und

bedürfen weiterer Überprüfung. Zur Ableitung eines PNECs werden daher die Veränderungen der VTG-Konzentration herangezogen, ein seitens der OECD (OECD 2014) etablierter Parameter. Die NOEC hinsichtlich der VTG-Induktion lag mit 50 µg/L im Bereich der maximal in deutschen Oberflächengewässern gemessenen Metformin-Konzentrationen von 35 µg/L (LANUV 2015) beziehungsweise von 39 µg/L im Kläranlagenablauf (LUBW 2014). Die Berechnung einer EC₁₀ bzw. EC₅₀ ist auf Grund einer fehlenden Dosis-Wirkungskurve nicht möglich. Aus der NOEC leitet sich nach TGD-EQS mit einem Sicherheitsfaktor von 10 eine PNEC von 5 µg/L ab. Im Hinblick auf die in Oberflächengewässern gemessenen Konzentrationen ist Metformin somit als gewässerrelevant einzustufen.

3.4.4 Toxische Wirkungen von Guanylurea

Guanylurea ist ein Transformationsprodukt, welches in Kläranlagen aus der Muttersubstanz Metformin gebildet wird. Obwohl die Erstzulassung des Antidiabetikums Metformin bereits Ende der 1950er Jahre erfolgte, wurde das Transformationsprodukt Guanylurea erst 2011 identifiziert (Trautwein et al. 2011). Aufgrund des weit verbreiteten Einsatzes von Metformin wurde die Tochtersubstanz Guanylurea in den folgenden Jahren entsprechend häufig in Kläranlagenabläufen und Oberflächengewässern in Konzentrationen bis zu 160 µg/L bzw. 32 µg/L nachgewiesen (LUBW 2014; Scheurer et al. 2012; Trautwein et al. 2014).

Bisher stehen in der Literatur keine ökotoxikologischen Untersuchungsergebnisse für Fische aus Standard-Biotests zur Verfügung. Daten aus Nicht-Standard-Biotests liefern bezüglich der Toxizität von Guanylurea bei aquatischen Organismen ein uneinheitliches Bild. Bei juvenilen Medakas wurde ein reduziertes Wachstum schon nach Exposition in 1 ng/L Guanylurea beschrieben, während bei adulten Medakas in Testkonzentrationen von bis zu 100 ng/L keine Effekte auf das Wachstum der Fische festgestellt wurden (Ussery et al. 2019). Bei Jungendstadien von Bachforellen und Posthornschnellen (*Planorbharius corneus*) traten selbst bei Testkonzentrationen von bis zu 1.000 µg/L keine negativen Effekte auf (Jacob et al. 2019b; Jacob et al. 2019a).

Die vorliegenden Untersuchungen an subadulten Regenbogenforellen hinsichtlich möglicher toxischer Wirkungen von Guanylurea umfassten neben der Analyse von biometrischen Daten, biologischen Indices und Blutparametern auch die histopathologische Beurteilung der Fische.

Umweltrelevante Konzentrationen von Guanylurea führten bei den Tieren zu keinen signifikanten Effekten auf die Wachstumsparameter Körpergewicht, Standardlänge sowie Lebergewicht und HSI. Bei der 50 µg/L-Versuchsgruppe wurden signifikant erniedrigte Konzentrationen der Blutlipide (Cholesterol, HDL und Triglyceriden) ermittelt. Trotz der statistisch signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe lagen die Werte für die genannten Parameter noch im physiologischen Referenzbereich für Regenbogenforellen (Manera und Britti 2006). Ebenfalls nach Exposition in 50 µg/L Guanylurea wurde bei männlichen Fischen zudem ein signifikant niedrigerer Korpulenzfaktor beobachtet. Diese Tiere zeigten außerdem bei gleichem Fütterungsprotokoll für alle Versuchsaquarien die mit 26 ± 23 g geringste, mittlere Gewichtszunahme im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen (Durchschnitt aller Männchen 34 ± 24 g). Insgesamt zeigte die 50 µg/L-Versuchsgruppe daher Veränderungen verschiedener Parameter, die mit Fütterung und Wachstum assoziiert sein können. Insgesamt ließen die Daten jedoch keine klare Tendenz oder Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen. Lediglich die Triglycerid-Konzentration zeigten zusätzlich noch bei der 0,1 µg/L und 1 µg/L-Versuchsgruppe eine signifikante Erniedrigung.

Effekte einer Guanylurea-Exposition auf HDL und Triglyceride wurden bislang an keiner Spezies untersucht. Für Metformin ist bekannt, dass die Substanz beim Menschen über eine Aktivierung

der AMPK eine Stimulation der Fettsäure-Oxidation mit Inhibition der Cholesterol- und Triglycerid-Synthese verursachen kann (Gong et al. 2012). Für Regenbogenforellen wurde dieser Effekt jedoch weder in vorliegender Studie noch in anderen Untersuchungen beschrieben (Panserat et al. 2009). Beim Medaka verursachte bereits 1 ng/L Guanylurea eine signifikante Veränderung der Konzentration verschiedener Stoffwechsel-Metabolite wie D-Glukose-6 Phosphatase, Pantothersäure, Stearinsäure, Putrescin, O-Phosphocolamin und Adenosinmonophosphat, wobei die Cholesterol-Konzentration unverändert war (Ussery 2018). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Guanylurea schon in umweltrelevanten Konzentrationen das Metabolom von Medakas beeinflussen kann. Der Wirkmechanismus von Guanylurea bei Organismen ist allerdings noch ungeklärt (Ussery 2018).

Die Untersuchung der Plasmaenzyme ergab zudem ausschließlich bei Fischen, die 100 µg/L Guanylurea ausgesetzt waren, eine gegenüber Kontrolltieren signifikante Erniedrigung der Aktivität der ALP (Alkalische Phosphatase). Die Ergebnisse wiesen somit keine Abhängigkeit von der Höhe der Expositionskonzentration oder eine Dosis-Wirkungsbeziehung auf. Bei allen Versuchsgruppen lagen die ALP-Aktivitäten noch im speziesspezifischen Referenzbereich (Manera und Britti 2006). Bei Alkinen Phosphatasen handelt es sich um Enzyme, deren Bestimmung beim Menschen routinemäßig zur Diagnose von Erkrankungen von Leber, Gallengängen oder Knochen eingesetzt wird (McComb et al. 1979). Für die Muttersubstanz Metformin wurde beim Menschen nach oraler Gabe eine Erhöhung des ALP-Wertes beschrieben (Hegazy 2015; Kanazawa et al. 2008). Die Metformin-exponierten Regenbogenforellen zeigten jedoch keine Auffälligkeiten hinsichtlich des ALP-Wertes. Da die ALP-Aktivität beim Fisch zudem sehr variabel ist (Skonberg et al. 1997) wird der nur bei einer Versuchsgruppe detektierte Effekt nicht im Sinne einer validen, pathogenetisch relevanten Wirkung interpretiert.

Die klinisch-chemische Blutuntersuchung ergab bei subadulten Regenbogenforellen, die 390 µg/L und 1.000 µg/L Guanylurea ausgesetzt waren eine gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte Konzentration von Harnstoff-Stickstoff (BUN). Die Werte lagen jedoch insgesamt noch im speziesspezifischen Referenzbereich für Regenbogenforellen (Manera und Britti 2006). Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die signifikante Erhöhung der Harnstoff-Stickstoff-Werte auf einer Miterfassung der Testsubstanz Guanylurea im Blut der Fische beruht. Untersuchungen am Medaka ergaben nach Exposition in 1 ng/L Guanylurea keine signifikante Veränderung der Harnstoff-Konzentration (Ussery 2018). Erhöhte Harnstoff-Stickstoff-Konzentrationen stellen zusammen mit den Kreatinin- und Harnsäure-Konzentrationen im Blut einen Indikator für eine Nierenfunktionsstörung dar (Finco und Duncan 1976). Bei den subadulten Regenbogenforellen zeigten Kreatinin und Harnsäure keine Auffälligkeiten.

Im Rahmen der semiquantitativen sowie der stereologischen Untersuchung der Niere wurden darüber hinaus keine Hinweise auf histopathologische Veränderungen festgestellt. Somit ist eine negative Beeinflussung der Nierenfunktion durch umweltrelevante Konzentrationen von Guanylurea unwahrscheinlich.

Bei subadulten Regenbogenforellen wurden außerdem statistisch signifikante Veränderungen hämatologischer Parameter in einzelnen Guanylurea-exponierten Gruppen nachgewiesen (Versuchsgruppen: 0,1/1/10/390 µg/L). Davon betroffen war die Werte für Hämatokrit, MCV und MCH. Zur Interpretation der Erythrozytenindices müssen weitere Laborwerte, wie Hämoglobingehalt und Gesamtzahl der Erythrozyten herangezogen werden (Clauss et al. 2008). Die Erythrozytenindices dienen dabei insbesondere der weiteren Abklärung einer Blutarmut, welche allerdings bei den Versuchsfischen nicht vorlag. Insgesamt wird diesen beobachteten Veränderungen keine klinische Relevanz beigemessen.

Hinsichtlich der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) wurde bei Regenbogenforellen der 10 µg/L-Versuchsgruppe eine signifikant erniedrigte Gesamtleukozytenzahl festgestellt. Die Auswertung des Differentialblutbildes ergab bei Fischen der 0,1 µg/L-Versuchsgruppe einen signifikant reduzierten Anteil stabkerniger, neutrophiler Granulozyten. Insgesamt war keine Konzentrationsabhängigkeit der Veränderungen bzw. Dosis-Wirkungsbeziehung darstellbar. Die Gesamtleukozytenzahl lagen bei Fischen aller Expositionsgruppen in einem, für geschlechtsreife Regenbogenforellen physiologischen Bereich (McCarthy et al. 1975). Darüber hinaus entsprachen die Ergebnisse des Differentialblutbildes einem für Regenbogenforellen beschriebenen Verteilungsmuster der weißen Blutzellen (Modrá et al. 1998). In der Literatur finden sich keine Hinweise auf mögliche Effekte von Guanylurea auf Leukozyten. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass Guanylurea ähnlich wie Metformin bei Regenbogenforellen zu keinen pathogenetisch relevanten Effekten hinsichtlich der Leukozytenpopulation führt.

Die vorliegende Studie an subadulten Regenbogenforellen ergab keine eindeutigen Hinweise auf Guanylurea-bedingte pathologische Veränderungen. Bei einzelnen Versuchsgruppen beobachtete Effekte wiesen keine Korrelation zu den jeweils eingesetzten Guanylurea-Konzentrationen auf. Die Resultate ergeben somit keine eindeutigen Hinweise auf eine negative Beeinflussung der Fischgesundheit durch umweltrelevante Konzentrationen von Guanylurea.

3.4.5 Endokrine Wirkung von Guanylurea

Bislang liegen nur wenige Untersuchungsergebnisse zu Effekten der Substanz Guanylurea auf aquatische Organismen vor (Ussery et al. 2019; Jacob et al. 2019a; Jacob et al. 2019b). Nur eine Studie widmete sich endokrinen Wirkungen der Substanz (Ussery 2018). Den Untersuchungsergebnissen zufolge führte Guanylurea allein oder in Kombination mit Metformin zu einer statistisch signifikant veränderten Produktion von E2 und 11-Ketotestosteron in der Leber adulter männlicher Medakas (Ussery 2018). Eine Auswirkung auf die VTG-Konzentration, den GSI oder den Reproduktionserfolg der Medakas wurde dabei nicht festgestellt.

Im Rahmen der vorliegenden Studie mit subadulten Regenbogenforellen wurden zur Untersuchung möglicher endokriner Wirkungen von Guanylurea neben der Analyse von biometrischen Daten, biologischen Indices und Biomarkern sowie Sexualhormonen auch eine histologische Beurteilung der Hoden sowie eine semiquantitative Bestimmung ihres Reifegrades durchgeführt.

Die serologische Untersuchung der Biomarker ergab bei männlichen Regenbogenforellen signifikante Veränderungen von VTG und E2 im Blut der Fische. Die Konzentration von VTG war ausschließlich bei Fischen der 50 µg/L-Versuchsgruppe gegenüber Kontrolltieren statistisch signifikant erhöht. Die Höhe der gemessenen VTG-Konzentration lag jedoch noch in einem, für männlichen Regenbogenforellen physiologischen Bereich (Copeland et al. 1986). Eine klare Tendenz oder Dosis-Wirkungskurve war nicht darstellbar. Bei männlichen Medakas hatte Guanylurea sowohl allein als auch in Kombination keinen Effekt auf die Produktion von VTG in der Leber (Ussery 2018).

Die E2-Konzentrationen waren bei männlichen Regenbogenforellen nach Exposition in 0,1/10/100/1.000 µg/L Guanylurea signifikant erhöht. Auch für diese Daten ergab sich keine klare Tendenz oder Dosis-Wirkungsbeziehung. Die Muttersubstanz Metformin führte bei Regenbogenforellen im Gegensatz zu Guanylurea zu einer Erniedrigung der E2-Konzentration (siehe 3.4.3). Auch männliche Medakas wiesen nach Exposition in 7,5 µg/L Guanylurea eine erhöhte E2-Produktion in der Leber auf, während Konzentrationen von 1 ng/L noch keinen diesbezüglichen Effekt zeigten (Ussery 2018). Eine Kombination von Metformin und Guanylurea

sowie Metformin allein hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die E2-Produktion (Ussery 2018). Einen Einfluss von Guanylurea auf die Konzentrationen von 11-Ketotestosteron wurde weder bei den männlichen Regenbogenforellen der vorliegenden Studie noch bei männlichen Medakas beobachtet.

Eine Exposition weiblicher Regenbogenforellen in Guanylurea führte zu signifikanten Veränderungen der 11-Ketotestosteron-Konzentration im Blut sowie des Hormonquotienten aus Estradiol und Testosteron (E2/Ts). So zeigten Tiere, der 10 µg/L-Gruppe eine signifikante Konzentrationsabnahme für 11-Ketotestosteron. Insgesamt war keine Tendenz oder Dosis-Wirkungsbeziehung nachweisbar. Im Gegensatz zu diesem Befund wiesen Medakas nach Exposition in 7,5 µg/L Guanylurea keine signifikanten Veränderungen von 11-Ketotestosteron auf (Ussery 2018). Bei weiblichen Regenbogenforellen wurden zudem trotz unveränderter Konzentrationen von E2 und Testosteron signifikante Veränderungen des E2/Ts-Hormonquotienten nachgewiesen. Andere Studien an Fischen zu möglichen Auswirkungen von Guanylurea auf die Testosteron-Konzentration sowie den E2/Ts-Hormonquotienten liegen nicht vor.

Abgesehen von den zwar signifikanten, aber nicht Dosis-abhängigen Veränderungen der Sexualhormon-Konzentrationen bei Regenbogenforellen beiderlei Geschlechts, wurden nach Exposition in Guanylurea keine weiteren Auswirkungen auf biometrische Daten, biologische Indices sowie Morphologie beziehungsweise Reifegrad des Hodengewebes ermittelt. Dies entspricht vorangegangenen Untersuchungen beim Medaka, die nach Guanylurea-Exposition ebenfalls keine Veränderungen hinsichtlich des GSI oder des Reproduktionserfolges ergeben haben (Ussery 2018).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei Regenbogenforellen beider Geschlechter nach Exposition in Guanylurea signifikante Veränderungen der Sexualhormone festgestellt wurden. Bei keinem der Sexualhormone war jedoch eine klare Tendenz oder Dosis-Wirkungsbeziehung erkennbar. Obwohl die Veränderungen hinsichtlich der E2-Werte bei den verschiedenen Versuchsgruppen keine eindeutige Abhängigkeit von der Expositionskonzentration zeigten, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ein endokriner Effekt von Guanylurea nicht endgültig ausgeschlossen werden. Die erhobenen Daten hinsichtlich des Endpunkt E2 werden jedoch als nicht ausreichend plausibel eingestuft, um sie zur Ableitung eines PNECs zu verwenden.

4 Literaturverzeichnis

- Afonso, L. O.; Wassermann, G. J.; Terezinha de Oliveira, R. (2001): Sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor. In: *J Exp Zool (Journal of Experimental Zoology)* 290 (2), S. 177–181. DOI: 10.1002/jez.1047.
- Anderson, B. G.; Loewen, R. D. (1975): Renal morphology of freshwater trout. In: *Am. J. Anat.* 143 (1), S. 93–114. DOI: 10.1002/aja.1001430105.
- Anonym (2016): EQS - Vorschlag des Oekotoxizentrums für: Metformin und das Haupttransformationsprodukt Guanylharnstoff. Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie.
- Anonym (2018): Fachinformation des Arzneimittel-Kompodium der Schweiz®. Metformin Axapharm. Hg. v. compendium.chS®. Online verfügbar unter <https://compendium.ch/mpro/mnr/23549/html/de?Platform=Desktop#9100>.
- Bernet, D.; Schmidt, H.; Meier, W.; Burkhardt-Holm, P.; Wahli, T. (1999): Histopathology in fish. Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. In: *J Fish Diseases* 22 (1), S. 25–34. DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x.
- Bertoldo, Michael J.; Faure, Melanie; Dupont, Joelle; Froment, Pascal (2014): Impact of metformin on reproductive tissues: an overview from gametogenesis to gestation. In: *Ann. Transl. Med.* 2 (6), S. 55. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.06.04.
- Billard, R. (1983): A quantitative analysis of spermatogenesis in the trout, *Salmo trutta fario*. In: *Cell Tissue Res.* 230 (3), S. 495–502. DOI: 10.1007/BF00216195.
- Billard, R. (1992): Reproduction in rainbow trout. Sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. In: *Aquaculture* 100 (1-3), S. 263–298. DOI: 10.1016/0044-8486(92)90385-X.
- Billard, R.; Fostier, A.; Weil, C.; Breton, B. (1982): Endocrine Control of Spermatogenesis in Teleost Fish. In: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39 (1), S. 65–79. DOI: 10.1139/f82-009.
- Birzle, Christoph Franz (2015): Etablierung und Validierung quantitativ-morphometrischer Parameter bei Regenbogenforellen im Rahmen ökotoxikologischer Fragestellungen. Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität. München.
- Boisclair, D.; Leggett, W. C. (1989): Among-Population Variability of Fish Growth. I. Influence of the Quantity of Food Consumed. In: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46 (3), S. 457–467. DOI: 10.1139/f89-062.
- Bon, E.; Barbe, U.; Rodriguez, J. Nuñez; Cuisset, B.; Pelissero, C.; Sumpter, J.P.; Le Menn, F. (1997): Plasma Vitellogenin Levels during the Annual Reproductive Cycle of the Female Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Establishment and Validation of an ELISA. In: *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 117 (1), S. 75–84. DOI: 10.1016/S0305-0491(96)00252-0.
- Borg, B. (1994): Androgens in teleost fishes. In: *Comp. Biochem. Phys. C* 109 (3), S. 219–245. DOI: 10.1016/0742-8413(94)00063-G.
- Brunelli, Joseph P.; Wertzler, Kelsey J.; Sundin, Kyle; Thorgaard, Gary H. (2008): Y-specific sequences and polymorphisms in rainbow trout and Chinook salmon. In: *Genome* 51 (9), S. 739–748. DOI: 10.1139/G08-060.
- Buisine, N.; Trichet, V.; Wolff, J. (2002): Complex evolution of vitellogenin genes in salmonid fishes. In: *Mol. Genet. Genomics* 268 (4), S. 535–542. DOI: 10.1007/s00438-002-0771-5.

- Burka, J. F.; Hammell, K. L.; Horsberg, T. E.; Johnson, G. R.; Rainnie, D. J.; Speare, D. J. (1997): Drugs in salmonid aquaculture - A review. In: *J Vet Pharmacol Ther* 20 (5), S. 333–349. DOI: 10.1046/j.1365-2885.1997.00094.x.
- Cacho, Oscar J.; Kinnucan, Henry; Hatch, Upton (1991): Optimal Control of Fish Growth. In: *Am. J. Agric. Econ.* 73 (1), S. 174–183. DOI: 10.2307/1242893.
- Cavalieri, B. (1635): *Geometria Indivisibilibus Continuorum*. Typis Clemetis Feronij, Bononi.
Nachgedruckt (1966) als *Geometria degli Indivisibili*. Turin: Unione Tipografico-Editrice Torinese.
- Chen, T. T. (1983): Identification and characterization of estrogen-responsive gene products in the liver of rainbow trout. In: *Canadian journal of biochemistry and cell biology = Revue canadienne de biochimie et biologie cellulaire* 61 (7), S. 802–810. DOI: 10.1139/o83-102.
- Christiansen, L. B.; Pedersen, K. L.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P. (1998): Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using in vivo synthesis of vitellogenin as a biomarker. In: *Mar. Environ. Res.* 46 (1-5), S. 137–140. DOI: 10.1016/S0141-1136(97)00047-0.
- Clauss, Tonya M.; Dove, Alistair D. M.; Arnold, Jill E. (2008): Hematologic disorders of fish. In: *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 11 (3), 445–62, v. DOI: 10.1016/j.cvex.2008.03.007.
- Cleuvers, Michael (2003): Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. In: *Toxicol. Lett.* 142 (3), S. 185–194. DOI: 10.1016/S0378-4274(03)00068-7.
- Conover, D. O.; van Voorhees, D. A. (1990): Evolution of a balanced sex ratio by frequency-dependent selection in a fish. In: *Science (New York, N.Y.)* 250 (4987), S. 1556–1558. DOI: 10.1126/science.250.4987.1556.
- Copeland, P. A.; Sumpter, J. P.; Walker, T. K.; Croft, M. (1986): Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri richardson*) at various stages of the reproductive cycle. In: *Comp. Biochem. Physiol. B, Comp. Biochem.* 83 (2), S. 487–493. DOI: 10.1016/0305-0491(86)90400-1.
- Crago, J.; Bui, C.; Grewal, S.; Schlenk, D. (2016): Age-dependent effects in fathead minnows from the anti-diabetic drug metformin. In: *Gen. Comp. Endocr.* 232, S. 185–190. DOI: 10.1016/j.ygcen.2015.12.030.
- Crago, Jordan; Klaper, Rebecca (2018): Place-based screening of mixtures of dominant emerging contaminants measured in Lake Michigan using zebrafish embryo gene expression assay. In: *Chemosphere* 193, S. 1226–1234. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.043.
- Dang, ZhiChao (2016): Interpretation of fish biomarker data for identification, classification, risk assessment and testing of endocrine disrupting chemicals. In: *Environ. Int.* 92–93, S. 422–441. DOI: 10.1016/j.envint.2016.04.003.
- Dean, Afshan; Nilsen, Margaret; Loughlin, Lynn; Salt, Ian P.; MacLean, Margaret R. (2016): Metformin Reverses Development of Pulmonary Hypertension via Aromatase Inhibition. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 68 (2), S. 446–454. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07353.
- Delesse, M. A. (1847): Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. In: *Comptes rendus de l'Académie des sciences* 25, S. 544–545.
- Depiereux, Sophie; Liagre, Melanie; Danis, Lorraine; De Meulder, Bertrand; Depiereux, Eric; Segner, Helmut; Kestemont, Patrick (2014): Intersex occurrence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) male fry chronically exposed to ethynylestradiol. In: *PloS one* 9 (7), e98531. DOI: 10.1371/journal.pone.0098531.

- Devlin, Robert H.; Nagahama, Yoshitaka (2002): Sex determination and sex differentiation in fish. An overview of genetic, physiological, and environmental influences. In: *Aquaculture* 208 (3-4), S. 191–364. DOI: 10.1016/S0044-8486(02)00057-1.
- Dziewulska, Katarzyna; Domagala, Józef (2003): Histology of salmonid testes during maturation. In: *Reprod. Biol.* 3 (1), S. 47–61.
- Faure, Melanie; Bertoldo, Michael J.; Khoueiry, Rita; Bongrani, Alice; Brion, François; Giulivi, Cecilia et al. (2018): Metformin in Reproductive Biology. In: *Front. Endocrinol.* 9, S. 675. DOI: 10.3389/fendo.2018.00675.
- Fent, Karl (2013): Ökotoxikologie. Umweltchemie; Toxikologie; Ökologie. 4. Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-99137>.
- Ferreira, C.; Sousa, M.; Rabaça, A.; F Oliveira, P.; G Alves, M.; Sá, R. (2015): Impact of metformin on male reproduction. In: *Curr. Pharm. Des.* 21 (25), S. 3621–3633.
- Finco, D. R.; Duncan, J. R. (1976): Evaluation of blood urea nitrogen and serum creatinine concentrations as indicators of renal dysfunction. A study of 111 cases and a review of related literature. In: *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 168 (7), S. 593–601.
- Fuhrmeister, Isabela Piva; Branchini, Gisele; Pimentel, Anita M.; Ferreira, Gustavo Dias; Capp, Edison; Brum, Ilma Simoni; Eye Corleta, Helena von (2014): Human granulosa cells. Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors and aromatase expression modulation by metformin. In: *Gynecol. Obstet. Invest.* 77 (3), S. 156–162. DOI: 10.1159/000358829.
- Furné, Miriam; Morales, Amalia E.; Trenzado, Cristina E.; García-Gallego, Manuel; Carmen Hidalgo, M.; Domezain, Alberto; Sanz Rus, Ana (2012): The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. In: *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 182 (1), S. 63–76. DOI: 10.1007/s00360-011-0596-9.
- Gong, Li; Goswami, Srijib; Giacomini, Kathleen M.; Altman, Russ B.; Klein, Teri E. (2012): Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: *Pharmacogenet. Genomics* 22 (11), S. 820–827. DOI: 10.1097/FPC.0b013e3283559b22.
- Graham, G. G.; Punt, J., Arora, M., Day, R. O., Doogue, M. P., Duong, J., Timothy J. Furlong et al. (2011): Clinical Pharmacokinetics of Metformin. In: *Clin. Pharmacokinet.* 50 (2), S. 81–98.
- Grier, Harry J.; Uribe, Mari Carmen; Parenti, Lynne R. (2007): Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, protacanthopterygii, salmoniformes). In: *J. Morphol.* 268 (4), S. 293–310. DOI: 10.1002/jmor.10518.
- Gundersen, H. J. G.; Jensen, E. B. (1987): The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction*. In: *J. Microsc.* 147 (3), S. 229–263. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1987.tb02837.x.
- Hara, Akihiko; Hiramatsu, Naoshi; Fujita, Toshiaki (2016): Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. In: *Fisheries Sci* 82 (2), S. 187–202. DOI: 10.1007/s12562-015-0957-5.
- Harries, Jule E.; Janbakhsh, Afsaneh; Jobling, Susan; Matthiessen, Peter; Sumpter, John P.; Tyler, Charles R. (1999): Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. In: *Environ Toxicol Chem* 18 (5), S. 932–937. DOI: 10.1002/etc.5620180517.
- Harries, Jule E.; Sheahan, David A.; Jobling, Susan; Matthiessen, Peter; Neall, Paula; Sumpter, John P. et al. (1997): Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of

- vitellogenesis in caged male trout. In: *Environ Toxicol Chem* 16 (3), S. 534–542. DOI: 10.1002/etc.5620160320.
- Hegazy, Sahar Kamal (2015): Evaluation of the anti-osteoporotic effects of metformin and sitagliptin in postmenopausal diabetic women. In: *J. Bone Miner. Metab.* 33 (2), S. 207–212.
- Hinfray, Nathalie; Porcher, Jean-Marc; Brion, François (2006): Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. In: *Comp. Biochem. Phys. C* 144 (3), S. 252–262. DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.09.002.
- Hinton, D. E.; Baumann, P. C.; Gardner, G. R.; Hawkins, W. E.; Hendricks, J. D. et al. (1992): Histopathologic biomarkers. In: Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L. (Hg.): Biomarkers, biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress: SETAC Publication, Lewis Publishers, S. 155–209.
- Hinton, David E.; Laurén, Darell J. (1990): Integrative Histopathological Approches to Detecting Stress of Envirmental Stressors on Fishes. In: *Am. Fish. Soc. Symp.* 8, S. 51–66.
- Hiramatsu, Naoshi; Matsubara, Takahiro; Fujita, Toshiaki; Sullivan, Craig V.; Hara, Akihiko (2006): Multiple piscine vitellogenins. Biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. In: *Mar. Biol.* 149 (1), S. 35–47. DOI: 10.1007/s00227-005-0214-z.
- Hochleithner, Martin (2001): Lachsfische (Salmoniformes). Lachse, Forellen, Huchen, Saiblinge sowie Äschen und Renken; Biologie und Aquakultur. Kitzbühel: AquaTech Publ (AT-Ratgeber).
- Hochleithner, Martin (2014): Lachsfische (Salmoniformes). Biologie und Aquakultur. 3. [erw.] Aufl. Kitzbühel: AquaTech Publ (AT Ratgeber).
- Hoffmann, R. (2005): Fischkrankheiten. Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag.
- Howard, Vyvyan; Reed, M. G. (2010): Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. 2nd ed. Liverpool: QTP.
- Jacob, Stefanie; Dötsch, Andreas; Knoll, Sarah; Köhler, Heinz-R.; Rogall, Eike; Stoll, Dominic et al. (2018): Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)? In: *Environ Sci Eur* 30 (1), S. 3496. DOI: 10.1186/s12302-018-0179-4.
- Jacob, Stefanie; Knoll, Sarah; Huhn, Carolin; Köhler, Heinz-R.; Tisler, Selina; Zwiener, Christian; Triebkorn, Rita (2019a): Effects of guanylyurea, the transformation product of the antidiabetic drug metformin, on the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*). In: *PeerJ* 7 (Part A), e7289. DOI: 10.7717/peerj.7289.
- Jacob, Stefanie; Köhler, Heinz-R.; Tisler, Selina; Zwiener, Christian; Triebkorn, Rita (2019b): Impact of the Antidiabetic Drug Metformin and Its Transformation Product Guanylyurea on the Health of the Big Ramshorn Snail (*Planorbis carneus*). In: *Front. Environ. Sci.* 7, R97. DOI: 10.3389/fenvs.2019.00045.
- Janowicz, Mariola E.; Załachowski, Włodzimierz; Rybczyk, Agnieszka; Dalton, Sheri; Fernandes, Eurielle; Fontoura, Nelson F. (2018): Age, growth and reproductive biology of threatened westslope cutthroat trout *Oncorhynchus clarkii lewisi* inhabiting small mountain streams. In: *J. Fish Biol.* 93 (5), S. 874–886. DOI: 10.1111/jfb.13792.
- Jobling, S.; Sumpter, J. P. (1993): Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish. An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. In: *Aquat. Toxicol.* 27 (3-4), S. 361–372. DOI: 10.1016/0166-445X(93)90064-8.

- Johnsen, Rodney; Wolf, Jeffrey; Braunbeck, Thomas (2009): OECD Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads. OECD.
- Johnsson, Jörgen I.; Björnsson, Björn Th. (1994): Growth hormone increases growth rate, appetite and dominance in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: *Animal Behaviour* 48 (1), S. 177–186. DOI: 10.1006/anbe.1994.1224.
- Johnstone, R.; Simpson, T. H.; Youngson, A. F. (1978): Sex reversal in salmonid culture. In: *Aquaculture* 13 (2), S. 115–134. DOI: 10.1016/0044-8486(78)90106-0.
- Jones, P. D.; Coen, W. M. de; Tremblay, L.; Giesy, J. P. (2000): Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. In: *Water Sci. Technol.* 42 (7-8), S. 1–14.
- Kanazawa, Ippei; Yamaguchi, Toru; Yano, Shozo; Yamauchi, Mika; Sugimoto, Toshitsugu (2008): Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375 (3), S. 414–419. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.08.034.
- Kao, Y. C.; Zhou, C.; Sherman, M.; Laughton, C. A.; Chen, S. (1998): Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens. A site-directed mutagenesis study. In: *Environ. Health Perspect.* 106 (2), S. 85–92. DOI: 10.1289/ehp.9810685.
- Kirpichnikov, Dmitri; McFarlane, Samy I.; Sowers, James R. (2002): Metformin: an update. In: *Ann. Intern. Med.* 137 (1), S. 25–33.
- Kocaman, E. M.; Yanik, T.; Erdogan, O.; Ciltas, A. K. (2005): Alterations in cholesterol, glucose and triglyceride levels in reproduction of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: *J. Anim. Vet. Adv.* 4 (9), S. 801–804.
- Komrakova, Marina; Knorr, Christoph; Brenig, Bertram; Hoerstgen-Schwark, Gabriele; Holtz, Wolfgang (2018): Sex discrimination in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using various sources of DNA and different genetic markers. In: *Aquaculture* 497, S. 373–379. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.010.
- Krisfalusi, Michelle; Nagler, James J. (2000): Induction of gonadal intersex in genotypic male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos following immersion in estradiol-17. In: *Mol. Reprod. Dev.* 56 (4), S. 495–501. DOI: 10.1002/1098-2795(200008)56:4<495::AID-MRD7>3.0.CO;2-E.
- Kümmerer, Klaus; Schuster, Armin; Längin; Andreas; Happel, Oliver; Thoma, Astrid et al. (2009): Identifizierung und Bewertung ausgewählter Arzneimittel und ihrer Metaboliten (Ab- und Umbauprodukte) im Wasserkreislauf. Projektbericht FKZ 206 61 202. Umweltbundesamt.
- Kuzminski, Henryk; Dobosz, Stefan (2010): Effect of sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) using 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione. In: *Arch. Polish Fish.* 18 (1), S. 175. DOI: 10.2478/v10086-010-0005-0.
- LANUV (2015): ECHO-Stoffbericht: Metformin (Antidiabetikum). Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV). Recklinghausen. Online verfügbar unter <https://www.lanuv.nrw.de/umwelt/umweltanalytik/echo-schnelle-relevanzpruefung-fuer-neue-stoffe/>.
- LeBrasseur, R. J. (1969): Growth of Juvenile Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) Under Different Feeding Regimes. In: *J. Fish. Res. Bd. Can.* 26 (6), S. 1631–1645. DOI: 10.1139/f69-147.

- Lee, Jin Wuk; Shin, Yu-Jin; Kim, Hokyun; Kim, Heejung; Kim, Jieun; Min, Su-A et al. (2018): Metformin-induced endocrine disruption and oxidative stress of *Oryzias latipes* on two-generational condition. In: *J. Hazard. Mater.* 367, S. 171–181. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.12.084.
- Lee, SeonYeong (2017): Assessment of aquatic toxicity and endocrine disruption potential of metformin, an anti-diabetic drug. Dissertation. Seoul National University, Seol. Department of Environmental Health Sciences, Graduate School of Public Health.
- LUBW (2014): Spurenstoffinventar der Fließgewässer in Baden-Württemberg. Ergebnisse der Beprobung von Fließgewässern und Kläranlagen 2012/2013. Hg. v. Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg und LUBW Landesanstalt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg. Karlsruhe. Online verfügbar unter <http://www.lubw.baden-wuerttemberg.de>.
- Malin, Steven K.; Kashyap, Sangeeta R. (2014): Effects of metformin on weight loss. Potential mechanisms. In: *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 21 (5), S. 323–329. DOI: 10.1097/MED.0000000000000095.
- Manera, M.; Britti, D. (2006): Assessment of blood chemistry normal ranges in rainbow trout. In: *J Fish Biology* 69 (5), S. 1427–1434. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2006.01205.x.
- Mansfield, Rebecca; Galea, Ray; Brincat, Mark; Hole, David; Mason, Helen (2003): Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. In: *Fertility and Sterility* 79 (4), S. 956–962. DOI: 10.1016/s0015-0282(02)04925-7.
- McCarthy, D. H.; Stevenson, J. P.; Roberts, M. S. (1975): Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). II. The Shasta variety. In: *J. Fish Biol.* 7 (2), S. 215–219, zuletzt geprüft am 14.11.2017.
- McComb, Robert B.; Bowers, George N.; Posen, Solomon (1979): Alkaline Phosphatase. Boston, MA: Springer US. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4613-2970-1>.
- Modrá, H.; Svobodová, Z.; Kolářová, J. (1998): Comparison of differential leukocyte counts in fish of economic and indicator importance. In: *Acta Veterinaria Brno* 64 (4), S. 215–226.
- Moermond, Caroline T. A.; Smit, C. Els (2015): Derivation of water quality standards for carbamazepine, metoprolol, and metformin and comparison with monitoring data. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (4), S. 882–888. DOI: 10.1002/etc.3178.
- Mommsen, Thomas P.; Walsh, Patrick J. (1988): 5 Vitellogenesis and Oocyte Assembly. In: *The Physiology of Developing Fish - Eggs and Larvae*, Bd. 11: Elsevier (Fish Physiology), S. 347–406.
- Moon, Thomas W. (2001): Glucose intolerance in teleost fish. Fact or fiction? In: *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 129 (2-3), S. 243–249. DOI: 10.1016/S1096-4959(01)00316-5.
- Moon, Young Jin; Wang, Xiaodong; Morris, Marilyn E. (2006): Dietary flavonoids. Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 20 (2), S. 187–210. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.06.048.
- Morris, Pamela B.; Ballantyne, Christie M.; Birtcher, Kim K.; Dunn, Steven P.; Urbina, Elaine M. (2014): Review of clinical practice guidelines for the management of LDL-related risk. In: *J. Am. Coll. Cardiol.* 64 (2), S. 196–206. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.05.015.
- Nævdal, Gunnar; Lerøy, Rita; Møller, Dag (1981): Variation in growth rate and age at first maturation in rainbow trout. In: *FiskDir. Skr. Ser. HavUnders.* (17), S. 71–78.

- Naglaa, Z. H. E.; Hesham, A. M.; Fadil, H. A.; Motal, A. (2010): Impact of metformin on immunity and male fertility in rabbits with alloxan-induced diabetes. In: *Am. J. Sci.* 6 (11), S. 417–426.
- Nardy, Elisabeth (1999): Untersuchungen zur neuroendokrinen Wirkung von Nonylphenol bei Fischen. Dissertation. Ludwig-Maximilians -Universität, München. Tierärztliche Fakultät.
- Natt, M. P.; Herrick, C. A. (1952): A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. In: *Poultry Science* 31, S. 735–738.
- Niemuth, Nicholas J.; Klaper, Rebecca D. (2015): Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. In: *Chemosphere* 135, S. 38–45. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.060.
- Niemuth, Nicholas J.; Klaper, Rebecca D. (2018): Low-dose metformin exposure causes changes in expression of endocrine disruption-associated genes. In: *Aquat. Toxicol.* 195, S. 33–40. DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.12.003.
- Niemuth, Nicolas J.; Jordan, Renee; Crago, Jordan; Blanksma, Chad; Johnson, Rodney; Klaper, Rebecca D. (2015): Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. In: *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (2), S. 291–296. DOI: 10.1002/etc.2793.
- OECD (2004): Series on Testing and Assessment No. 47. Details review on fish screening assay for the detection of endocrine active substances. OECD Publishing. Paris.
- OECD (2014): Fish Toxicity Testing Framework. OECD Series on Testing and Assessment, No. 177: OECD Publishing.
- Oliver Straub, Jürg; Caldwell, Daniel J.; Davidson, Todd; D'Aco, Vincent; Kappler, Kelly; Robinson, Paul F. et al. (2018): Environmental risk assessment of metformin and its transformation product guany lurea. I. environmental fate. In: *Chemosphere*. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.036.
- Orio, Francesco; Manguso, Francesco; Di Biase, Sebastiano; Falbo, Angela; Giallauria, Francesco; Labella, Donato et al. (2007): Metformin administration improves leukocyte count in women with polycystic ovary syndrome. A 6-month prospective study. In: *Eur. J. Endocrinol.* 157 (1), S. 69–73. DOI: 10.1530/EJE-07-0133.
- Pandey, Abhimanu; Kumar, Vijay L. (2016): Protective Effect of Metformin against Acute Inflammation and Oxidative Stress in Rat. In: *Drug. Dev. Res.* 77 (6), S. 278–284. DOI: 10.1002/ddr.21322.
- Panserat, S.; Skiba-Cassy, S.; Seiliez, I.; Lansard, M.; Plagnes-Juan, E.; Vachot, C. et al. (2009): Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities? In: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297 (3), S. 15. DOI: 10.1152/ajpregu.00120.2009.
- Pelissero, C.; Lenczowski, M.J.P.; Chinzi, D.; Davail-Cuisset, B.; Sumpter, J. P.; Fostier, A. (1996): Effects of flavonoids on aromatase activity, an in vitro study. In: *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 57 (3-4), S. 215–223. DOI: 10.1016/0960-0760(95)00261-8.
- Piferrer, Francesc; Blazquez, Mercedes (2006): Aromatase distribution and regulation in fish. In: *Fish Physiol Biochem* 31 (2-3), S. 215–226. DOI: 10.1007/s10695-006-0027-0.
- Polakof, S.; Moon, T. W.; Aguirre, P.; Skiba-Cassy, S.; Panserat, S. (2011a): Glucose homeostasis in rainbow trout fed a high-carbohydrate diet: metformin and insulin interact in a tissue-dependent

- manner. In: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300 (1), S. 74. DOI: 10.1152/ajpregu.00619.2010.
- Polakof, S.; Skiba-Cassy, S.; Panserat, S. (2009): Glucose homeostasis is impaired by a paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout. In: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297 (6), S. 76. DOI: 10.1152/ajpregu.00369.2009.
- Polakof, Sergio; Panserat, Stephane; Craig, Paul M.; Martyres, David J.; Plagnes-Juan, Elisabeth; Savari, Sharareh et al. (2011b): The metabolic consequences of hepatic AMP-kinase phosphorylation in rainbow trout. In: *PloS one* 6 (5), S. e20228. DOI: 10.1371/journal.pone.0020228.
- Quillet, E.; Aubard, G.; Quéau, I. (2002): Mutation in a sex-determining gene in rainbow trout. Detection and genetic analysis. In: *The Journal of heredity* 93 (2), S. 91–99. DOI: 10.1093/jhered/93.2.91.
- Reis-Henriques, M. A.; Cruz, M. M.; Pereira, J. O. (1997): The modulating effect of vitellogenin on the synthesis of 17 β -Estradiol by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: *Fish Physiol Biochem* 16 (3), S. 181–186. DOI: 10.1023/A:1007784626784.
- Reitman, Marc L.; Schadt, Eric E. (2007): Pharmacogenetics of metformin response: a step in the path toward personalized medicine. In: *J. Clin. Invest.* 117 (5), S. 1226–1229. DOI: 10.1172/JCI32133.
- Resende, Albina D.; Lobo-da-Cunha, Alexandre; Malhao, Fernanda; Franquinho, Filipa; Monteiro, Rogerio A. F.; Rocha, Eduardo (2010): Histological and stereological characterization of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) trunk kidney. In: *Microsc. Microanal.* 16 (6), S. 677–687. DOI: 10.1017/S1431927610093918.
- Rice, Suman; Pellatt, Laura; Ramanathan, Kumaran; Whitehead, Saffron Anne; Mason, Helen Diane (2009): Metformin inhibits aromatase via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway. In: *Endocrinology* 150 (10), S. 4794–4801. DOI: 10.1210/en.2009-0540.
- Scherle, W. (1970): A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. In: *Mikroskopie* 26 (1), S. 57–60.
- Scheurer, M.; Michel, A.; Brauch, H. J.; Ruck, W.; Sacher, F. (2012): Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanylylurea in the environment and during drinking water treatment. In: *Water research* 46 (15), S. 4790–4802.
- Schwabe, Ulrich; Paffrath, Dieter; Ludwig, Wolf-Dieter; Klauber, Jürgen (Hrsg.) (2019): Arzneiverordnungs-Report 2019. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
- Schwaiger, J.; Mallow, U.; Ferling, H.; Knoerr, S.; Braunbeck, Th; Kalbfus, W.; Negele, R.D (2002): How estrogenic is nonylphenol? In: *Aquat. Toxicol.* 59 (3-4), S. 177–189. DOI: 10.1016/S0166-445X(01)00248-X.
- Schwaiger, J.; Spieser, O.H; Bauer, C.; Ferling, H.; Mallow, U.; Kalbfus, W.; Negele, R. D. (2000): Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol. Haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). In: *Aquat. Toxicol.* 51 (1), S. 69–78. DOI: 10.1016/S0166-445X(00)00098-9.
- Schwaiger, Julia; Negele, R. D. (1998): Plasma vitellogenin – a blood parameter to evaluate exposure of fish to xenoestrogens. In: *Acta Veterinaria Brno* 67 (4), 257–264.

- Schwaiger, Julia; Wanke, Rüdiger; Adam, Stefan; Pawert, Michael; Honnen, Wolfgang; Triebkorn, Rita (1997): The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. In: *J. Aquat. Ecosyst.* 6 (1), S. 75–86. DOI: 10.1023/A:1008212000208.
- Shilling, A. D.; Carlson, D. B.; Williams, D. E. (1999): Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition. In: *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 10 (1), S. 89–95. DOI: 10.1016/S0960-0760(99)00090-4.
- Skonberg, Denise I.; Yogev, Leon; Hardy, Ronald W.; Dong, Faye M. (1997): Metabolic response to dietary phosphorus intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: *Aquaculture* 157 (1-2), S. 11–24. DOI: 10.1016/S0044-8486(97)00141-5.
- Souza, E. Q.; Bittencourt, T.Q.M.; Ferreira, R.C.B.; Oliveira, E.G.S.; Silva, N.P.C.; Silva, S.C.B.L. et al. (2019): Exposição crônica ao cloridrato de metformina e à glibenclamida causa alterações comportamentais, glicêmicas e de mortalidade em *Hemigrammus caudovittatus* e *Danio rerio*. Chronic exposure to metformin chloridrate and glibenclamide causes behavioral, blood glucose and mortality changes of *Hemigrammus caudovittatus* and *Danio rerio*. In: *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 71 (5), S. 1582–1590. DOI: 10.1590/1678-4162-10907.
- Sumpter, J. P.; Jobling, S. (1995): Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. In: *Environ. Health Perspect.* 103 Suppl 7, S. 173–178.
- Sumpter, John P.; Scott, Alexander P.; Katsiadaki, Ioanna (2016): Comments on Niemuth, N.J. and Klaper, R.D. 2015. Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* 135, 38-45. In: *Chemosphere* 165, S. 566–569. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.049.
- Takashima, Fumio; Patino, Reynaldo; Nomura, Minoru (1980): Histological Studies on the Sex Differentiation in Rainbow Trout. In: *J. Appl. Toxicol.* 46 (11), S. 1317–1322. DOI: 10.2331/suisan.46.1317.
- Takemura, Yuri; Osuga, Yutaka; Yoshino, Osamu; Hasegawa, Akiko; Hirata, Tetsuya; Hirota, Yasushi et al. (2007): Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92 (8), S. 3213–3218. DOI: 10.1210/jc.2006-2486.
- Talaulikar, Vikram Sinai; Tang, Thomas; Yasmin, Ephiah (2016): Role of Metformin in Women's Health: Review of Its Current Place in Clinical Practice and Emerging Indications for Future. In: *Obstet. Gynecol. Surv.* 71 (5), S. 307–317. DOI: 10.1097/OGX.0000000000000312.
- Tang, Thomas; Lord, Jonathan M.; Norman, Robert J.; Yasmin, Ephiah; Balen, Adam H. (2012): Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. In: *Cochrane Database Syst. Rev.* (5), S. CD003053. DOI: 10.1002/14651858.CD003053.pub5.
- Tartarin, P.; Moison, D.; Guibert, E.; Dupont, J.; Habert, R.; Rouiller-Fabre, V. et al. (2012): Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 27 (11), S. 3304–3314. DOI: 10.1093/humrep/des264.
- Thorpe, Kare I.; Hutchinson, Thomas H.; Hetheridge, Malcolm J.; Sumpter, John P.; Tyler, Charles R. (2000): Development of an in vivo screening assay for estrogenic chemicals using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: *Environ Toxicol Chem* 19 (11), S. 2812–2820. DOI: 10.1002/etc.5620191128.

- Tisler, Selina; Zwiener, Christian (2019): Aerobic and anaerobic formation and biodegradation of guanyl urea and other transformation products of metformin. In: *Water research* 149, S. 130–135. DOI: 10.1016/j.watres.2018.11.001.
- Tosca, Lucie; Chabrolle, Christine; Uzbekova, Svetlana; Dupont, Joëlle (2007): Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis. Possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). In: *Biol. Reprod.* 76 (3), S. 368–378. DOI: 10.1095/biolreprod.106.055749.
- Tosca, Lucie; Solnais, Patricia; Ferré, Pascal; Foulle, Fabienne; Dupont, Joëlle (2006): Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells. In: *Biol. Reprod.* 75 (3), S. 342–351. DOI: 10.1095/biolreprod.106.050831.
- Trautwein, C.; Berset, J. D.; Wolschke, H.; Kümmerer, K. (2014): Occurrence of the antidiabetic drug Metformin and its ultimate transformation product Guanylurea in several compartments of the aquatic cycle. In: *Environ. Int.* 70, S. 203–212.
- Trautwein, Christoph; Kümmerer; Klaus (2011): Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. In: *Chemosphere* 85 (5), S. 765–773. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.057.
- Trichet, V.; Buisine, N.; Mouchel, N.; Morán, P.; Pendás, A. M.; Le Pennec, J. P.; Wolff, J. (2000): Genomic analysis of the vitellogenin locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals a complex history of gene amplification and retroposon activity. In: *Mol. Gen. Genet.* 263 (5), S. 828–837. DOI: 10.1007/s004380000247.
- Tyler, Charles R.; van Aerle, Ronny; Nilsen, Mona V.; Blackwell, Robert; Maddix, Susan; Nilsen, Bente M. et al. (2002): Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay to quantify vitellogenin for studies on environmental estrogens in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: *Environ Toxicol Chem* 21 (1), S. 47–54. DOI: 10.1002/etc.5620210107.
- Uribe, Mari Carmen; Grier, Harry J.; Mejia-Roa, Victor (2014): Comparative testicular structure and spermatogenesis in bony fishes. In: *Spermatogenesis* 4 (3), e983400. DOI: 10.4161/21565562.2014.983400.
- Ussery, Erin (2018): The ecotoxicological effects of metformin and its metabolite, guanylurea, on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Doktorarbeit. University of Ontario, Ontario. Applied Bioscience.
- Ussery, Erin; Bridges, Kristin N.; Pandelides, Zacharias; Kirkwood, Andrea E.; Bonetta, Dario; Venables, Barney J. et al. (2018): Effects of environmentally relevant metformin exposure on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). In: *Aquat. Toxicol.* DOI: 10.1016/j.aquatox.2018.10.003.
- Ussery, Erin; Bridges, Kristin N.; Pandelides, Zacharias; Kirkwood, Andrea E.; Guchardi, John; Holdway, Douglas (2019): Developmental and Full-Life Cycle Exposures to Guanylurea and Guanylurea-Metformin Mixtures Results in Adverse Effects on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). In: *Environ Toxicol Chem* 38 (5), S. 1023–1028. DOI: 10.1002/etc.4403.
- van Meeuwen, J. A.; Nijmeijer, S.; Mutarapat, T.; Ruchirawat, S.; Jong, P. C. de; Piersma, A. H.; van den Berg, M. (2008): Aromatase inhibition by synthetic lactones and flavonoids in human placental microsomes and breast fibroblasts--a comparative study. In: *Toxicology and applied pharmacology* 228 (3), S. 269–276. DOI: 10.1016/j.taap.2007.12.007.
- Weatherley, A. H. (1976): Factors Affecting Maximization of Fish Growth. In: *J. Fish. Res. Bd. Can.* 33 (4), S. 1046–1058. DOI: 10.1139/f76-133.

Weibel, E. (1979): Stereological Methods: Practical Methods for Biological Morphometry: Academic Press.

West, G. (1990): Methods of Assessing Ovarian development in Fishes. A Review. In: *Mar. Freshwater Res.* 41 (2), S. 199. DOI: 10.1071/MF9900199.

Xu, Chao; Liu, Wen-Bin; Zhang, Ding-Dong; Cao, Xiu-Fei; Shi, Hua-Juan; Li, Xiang-Fei (2018): Interactions between dietary carbohydrate and metformin. Implications on energy sensing, insulin signaling pathway, glycolipid metabolism and glucose tolerance in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. In: *Aquaculture* 483, S. 183–195. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.10.022.

Xu, Tao; Brandmaier, Stefan; Messias, Ana C.; Herder, Christian; Draisma, Harmen H. M.; Demirkan, Ayse et al. (2015): Effects of metformin on metabolite profiles and LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes. In: *Diabetes care* 38 (10), S. 1858–1867. DOI: 10.2337/dc15-0658.

Yano, Ayaka; Guyomard, Rene; Nicol, Barbara; Jouanno, Elodie; Quillet, Edwige; Klopp, Christophe et al. (2012): An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: *Curr. Biol.* 22 (15), S. 1423–1428. DOI: 10.1016/j.cub.2012.05.045.

Zang, Qingda; Rotroff, Daniel M.; Judson, Richard S. (2013): Binary classification of a large collection of environmental chemicals from estrogen receptor assays by quantitative structure-activity relationship and machine learning methods. In: *J. Chem. Inf. Model.* 53 (12), S. 3244–3261. DOI: 10.1021/ci400527b.

Zhou, Wenhao; Rahimnejad, Samad; Tocher, Douglas R.; Lu, Kangle; Zhang, Chunxiao; Sun, Yunzhang (2019): Metformin attenuates lipid accumulation in hepatocytes of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) via activation of AMP-activated protein kinase. In: *Aquaculture* 499, S. 90–100. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.09.028.

Zhou, Yan; Xu, Jia-Ning; Zeng, Cheng; Li, Xin; Zhou, Ying-Fang; Qi, Yu; Xue, Qing (2015): Metformin Suppresses Prostaglandin E2-Induced Cytochrome P450 Aromatase Gene Expression and Activity via Stimulation of AMP-Activated Protein Kinase in Human Endometriotic Stromal Cells. In: *Reprod. Sci.* 22 (9), S. 1162–1170. DOI: 10.1177/1933719115590664.

A Anhang 1 Teilprojekt A: Übersicht Datenblätter

Tabelle 27: Übersicht Datenblätter

Stoff	Maximale Gewässer-konzentration	Toxizität	Beurteilung
Amisulprid Psychopharmakum	0,56 µg/L	AA-QS 140 µg/L (NOEC Alge, SF 100)	keine Gefährdung
Torsemid Diuretikum	0,28 µg/L	AA-QS 1670 µg/L (NOEC Alge, SF 100)	keine Gefährdung
Valsartansäure Transformations- produkt verschiedener Sartane (Blutdrucksenker)	2,2 µg/L	MAC-QS 600 µg/L AA-QS 640 µg/L (NOEC Alge, SF 50)	keine Gefährdung sehr persistent Ableitung vorläufig, da chronischer Fischtest fehlt; keine Angabe eines EQS
Gabapentin Antiepileptikum	3,1 µg/L	AA-QS 1.000 µg/L	keine Gefährdung Ableitung vorläufig, da chronischer Fischtest fehlt; keine Angabe eines EQS
Lamotrigin Antiepileptikum	1 µg/L	MAC-QS 666 µg/L AA-QS 8 µg/L (NOEC Daphnia, SF 50)	Gefährdung aquatischer Organismen nicht auszuschließen Ableitung vorläufig, da chronischer Fischtest fehlt; keine Angabe eines EQS
Venlafaxin Psychopharmakum	0,3 µg/L	MAC-QS 340 µg/L AA-QS 0,88 µg/L (NOEC Fisch, SF 10)	mögliche Gefährdung aquatischer Organismen additive Wirkung
O-Desmethyl- venlafaxin Hauptmetabolit	0,3 µg/L	MAC-QS 780 µg/L AA-QS 0,88 µg/L (von Venlafaxin übernommen)	
4-Aminoantipyrin Metabolit des Schmerzmittels Metamizol	0,35 µg/L	MAC-QS 135 µg/L AA-QS 1,6 µg/L (EC ₁₀ Daphnia, SF 50)	Gefährdung aquatischer Organismen nicht auszuschließen Ableitung vorläufig, da chronischer Fischtest fehlt keine Angabe eines EQS

Fortsetzung Tabelle 27:Übersicht Datenblätter

Stoff	Maximale Gewässer-konzentration	Toxizität	Beurteilung
Clindamycin Antibiotikum	2 µg/L (IWW) Bayern 0,11 µg/L	MAC-QS 0,05 µg/L AA-QS 0,044 µg/L (EC ₁₀ Alge, SF50)	mögliche Gefährdung aquatischer Organismen
N-Desmethyl-clindamycin Metabolit		MAC-QS 0,11 µg/L AA-QS 0,1 µg/L (EC ₁₀ Alge, SF50)	N-Desmethylclindamycin ähnliche Toxizität wie Muttersubstanzen (additive Wirkung!)
Clindamycinsulfoxid Metabolit		MAC-QS 8,7 µg/L AA-QS 4,0 µg/L (EC ₁₀ Cyanobakterien, SF50)	
Metformin Antidiabetikum	3,4 µg/L	MAC-QS 640 µg/L AA-QS 5 µg/L (NOEC Fisch, SF10)	Gefährdung aquatischer Organismen nicht auszuschließen (v.a. durch Metformin)
Guanylurea Transformationsprodukt	29 µg/L	MAC-QS 970 µg/L AA-QS 100 µg/L (NOEC Fisch, SF10)	
Bisoprolol Blutdrucksenker	2,9 µg/L	MAC-QS 550 µg/L AA-QS 92 µg/L (EC ₁₀ Alge, SF 50)	Gefährdung aquatischer Organismen nicht auszuschließen (v.a. durch Metoprolol)
Oxipurinol Hauptmetabolit des Gichtmittels Allopurinol	22 µg/L	MAC-QS 600 µg/L AA-QS 14 µg/L (EC ₁₀ Daphnia, SF 50)	Gefährdung aquatischer Organismen nicht auszuschließen
Desethylterbutryn Transformationsprodukt der Biozide Terbutryn und Cybutryn	0,6 µg/L	MAC-QS 0,77 µg/L AA-QS 0,22 µg/L (EC ₁₀ Alge, SF 50)	mögliche Gefährdung aquatischer Organismen im Falle von Desethylterbutryn
Terbutrynsulfoxid Transformationsprodukt von Terbutryn	0,034 µg/L	AA-QS 30 µg/L (EC ₁₀ Alge, SF 50)	
Methoxymethyl-triphenyl-Phosphonium-chlorid Wittig-Reaktion: Doppelbindungen	0,6 µg/L	MAC-QS 10,6 µg/L AA-QS 2 µg/L (NOEC Lemna, SF 50)	Belastung nur an Gewässern mit entsprechender Industrie

Fortsetzung Tabelle 27:Übersicht Datenblätter

Stoff	Maximale Gewässer- konzentration	Toxizität	Beurteilung
1,4-Dioxan Lösungsmittel	6,7 µg/L	AA-QS 57500 µg/L (NOEC Cyanobakterien, SF 10)	keine Gefährdung

B Anhang 2 Teilprojekt B

B.1 Aufzuchtbedingungen (Teilversuche Nr. 1-3)

Tabelle 28: Chemisch-physikalische Wasserparameter, Wielenbacher Quellwasser (vor Kaskade)

Parameter	Messwerte
Wassertemperatur (°C)	10,02
Leitfähigkeit (µS/cm)	722
pH-Wert	7,01
Sauerstoff (mg/L)	3,65
Ammonium-Stickstoff (mg/L)	< 0,1
Ammoniak-Stickstoff (µg/L) ¹	< 0,00
Nitrat-Stickstoff (mg/L)	3,79
Kalium (mg/L)	3,15
Chlorid (mg/L)	13.6
Trübung (FNU)	0,032

Daten: Mittelwerte. Zur Anreicherung des Quellwassers mit Sauerstoff sowie zur Entgasung wird dieses vor Zuführung zu den Teichen über eine Kaskade geleitet. Hierdurch wird die Sauerstoff-Konzentration auf 8-9 mg/L erhöht.

¹berechnet.

Tabelle 29: Chemisch-physikalische Wasserparameter, Bruthaus

Parameter	Messwerte
Wassertemperatur (°C)	10,53
Leitfähigkeit (µS/cm)	722
pH-Wert	7,57
Sauerstoff (mg/L)	8,34
Ammonium-Stickstoff (µg/L)	< 15
Nitrat-Stickstoff (mg/L)	3,88
Trübung (FNU)	0,02

Daten: Mittelwerte. Zur Anreicherung des Quellwassers mit Sauerstoff sowie zur Entgasung wird dieses vor Zuführung zu den Teichen über eine Kaskade geleitet. Hierdurch wird die Sauerstoff-Konzentration auf 8-9 mg/L erhöht.

*berechnet.

B.2 Methodik für die genetische Geschlechtsbestimmung

Tabelle 30: PCR-Protokoll genetische Geschlechtsbestimmung

Protokoll	Temperatur	Zeitdauer
Aktivierung Taq-Polymerase	95°C	5 min
DNA-Denaturierung	94°C	50 s
Primer-Annealing	60°C	40s
DNA-Extension	72°C	30s
Finale Extension	72°C	6 min
Pause	8°C	∞

30 Zyklen

Tabelle 31: Primer für die genetische Geschlechtsbestimmung

Primerbezeichnung	5'-3'	NCBI-Datenbanknummer
OM_SDY_fw2	CCCAGCACTGTTTCTTGTCTCA	NM_001281416.1
OM_SDY_rw2	CTTAAACCACTCCACCCTCCAT	NM_001281416.1
OM_IL6_LC_F1	CAGCTTCTTCTTCAGCACGTAA	HF913655
OM IL6 PCR Reverse	GGAAGTCTTTGCCCTCTTTCC	HF913655

B.3 Übersicht verwendeter Testkits für die Blutuntersuchungen (Teilversuche Nr. 1 und 2)

Tabelle 32: Übersicht verwendeter Testkits für die klinische Chemie

Marker	Abkürzung	Produktnummer (Hitachi Chemical)
Gesamtprotein	TP	96218-100
Albumin	ALB	96219-100
Alkalische Phosphatase	ALP	96201-100
Aspartat-Aminotransferase	AST	96204-100
Alanin-Aminotransferase	ALT	96205-100
γ -Glutamyl-Transferase	γ -GT	96202-100
Laktat-Dehydrogenase	LDH	96203-100
Cholesterol	CHO	96210-100
HDL-Cholesterol	HDL	96212-100
LDL-Cholesterol	LDL	96213-100
Triglyceride	TG	96209-100
Glukose	GLU	96208-100
Harnsäure	UA	96217-100
Blut-Harnstoff-Stickstoff	BUN	96216-100
Kreatinin	CRE	96214-100
Calcium	CA	96221-100

Tabelle 33: Übersicht verwendeter Testkits für die serologische Untersuchung

Biomarker	Produktname	Hersteller
Vitellogenin	Rainbow trout Vitellogenin ELISA Kit Katalog-Nr.: V01004402	biosense® Laboratories
Aromatase	Fish Aromatase (ARO) ELISA-Kit Katalog-Nr.: CSB-EL006394FI	Cusabio GmbH
Estradiol	Fish Estradiol (E2) ELISA-Kit Katalog-Nr.: CSB-E13017Fh	Cusabio GmbH
Testosteron	Fish Testosterone (T) ELISA-Kit Katalog-Nr.: CSB-E17554Fh	Cusabio GmbH
11-Ketotestosteron	11-keto Testosteron ELISA-Kit Katalog-Nr.: 582751	Cayman Chemical

B.4 Übersicht Endpunkte und Probenmaterial (Teilversuche Nr. 1-3)

Tabelle 34: Übersicht Endpunkte und Probenmaterial (Teilversuche Nr. 1-3)

Teilversuch-Nr.	Gruppen Nr.	KGW v. E.	KGW n. E.	KGW-Zunahme	GL v. E.	GL n. E.	GL Zunahme	K v. E.	K n. E.	Lebergewicht	HSI	Gonadengewicht	GSI
Teilversuch Nr. 1	Gruppe 1	X	X	X	-	X*	-	X	X	-	-	X	X
Teilversuch Nr. 1	Gruppe 2	X	X	X	-	X*	-	X	X	X	X	X	X
Teilversuch Nr. 2	Gruppe 1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Teilversuch Nr. 2	Gruppe 2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Teilversuch Nr. 3	Gruppe 1	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-
Teilversuch Nr. 3	Gruppe 2	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-

X: durchgeführt, -: nicht durchgeführt; KGW: Körpermasse, GL: Gesamtlänge, K: Korpulenzfaktor, HSI: hepatosomatischer Index, GSI: gonadosomatischer Index.

*: Standardlänge.

Fortsetzung Tabelle 34: Übersicht Endpunkte und Probenmaterial (Teilversuche Nr. 1-3)

Teilversuch-Nr.	Gruppen Nr.	Klinische Chemie	Hämatologie	Biomarker	Quantitative (stereologische) Untersuchung - Niere	Quantitative (stereologische) Untersuchung - Hoden
Teilversuch Nr. 1	Gruppe 1	X	X	X	X	-
Teilversuch Nr. 1	Gruppe 2	-	-	-	-	-
Teilversuch Nr. 2	Gruppe 1	X	X	X	-	Pubertäre Männchen
Teilversuch Nr. 2	Gruppe 2	-	-	-	-	Pubertäre Männchen
Teilversuch Nr. 3	Gruppe 1	-	-	-	-	-
Teilversuch Nr. 3	Gruppe 2	-	-	-	-	-

X: durchgeführt, -: nicht durchgeführt.

Fortsetzung Tabelle 34:Übersicht Endpunkte und Probenmaterial (Teilversuche Nr. 1)

Teil-Versuch-Nr.	Gruppen Nr.	Semiquantitative histologische Untersuchung - Niere	Semiquantitative histologische Untersuchung - Milz, Leber	Semiquantitative histologische Untersuchung - Weitere Gewebe*	Semiquantitative histologische Untersuchung - Hoden	Semiquantitative histologische Untersuchung - Ovarien	Leber (Glykogen-nachweis)
Teilversuch Nr. 1	Gruppe 1	X	X	Kontrolle, 1.000 µg/L	X	-	Kontrolle, 1.000 µg/L **
Teilversuch Nr. 1	Gruppe 2	-	-	-	X	-	-
Teilversuch Nr. 2	Gruppe 1	Kontrolle, 1.000 µg/L	X	Kontrolle, 1.000 µg/L	Präpubertäre Männchen	Kontrolle, 1.000 µg/L	Kontrolle, 1.000 µg/L **
Teilversuch Nr. 2	Gruppe 2	-	-	-	Präpubertäre Männchen	Kontrolle, 1.000 µg/L	-
Teilversuch Nr. 3	Gruppe 1	-	-	-	X	-	-
Teilversuch Nr. 3	Gruppe 2	-	-	-	X	-	-

X: durchgeführt, -: nicht durchgeführt.

*: Herz, Gehirn, Magen, Pylorus, Darm, Pankreas, Kieme, Haut und Muskulatur.

** : von jeweils 3 Männchen und 3 Weibchen.

B.5 Tabellarische Ergebnisse Teilversuch Nr. 1 (Guanylurea)

Tabelle 35: Wasserparameter in den Versuchsaquarien (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Versuchsaquarium (Guanylurea-P)	Gelöster Sauerstoff (in mg/L)	Wassertemperatur (in °C)
Replik A		
Kontrolle, Replik A	9,59 ± 0,24	12,37 ± 0,20
0,1 µg/L, Replik A	9,45 ± 0,21	12,52 ± 0,16
1 µg/L, Replik A	9,61 ± 0,18	12,43 ± 0,19
10 µg/L, Replik A	9,57 ± 0,24	12,47 ± 0,17
50 µg/L, Replik A	9,41 ± 0,33	12,43 ± 0,20
100 µg/L, Replik A	9,60 ± 0,27	12,41 ± 0,20
390 µg/L, Replik A	9,55 ± 0,27	12,53 ± 0,19
1.000 µg/L, Replik A	9,47 ± 0,30	12,49 ± 0,17
Replik B		
Kontrolle, Replik B	9,50 ± 0,16	12,49 ± 0,20
0,1 µg/L, Replik B	9,67 ± 0,15	12,52 ± 0,19
1 µg/L, Replik B	9,51 ± 0,19	12,43 ± 0,20
10 µg/L, Replik B	9,47 ± 0,28	12,53 ± 0,19
50 µg/L, Replik B	9,57 ± 0,15	12,41 ± 0,20
100 µg/L, Replik B	9,36 ± 0,26	12,48 ± 0,20
390 µg/L, Replik B	9,39 ± 0,20	12,52 ± 0,20
1.000 µg/L, Replik B	9,49 ± 0,26	12,36 ± 0,19
Mittelwert (beide Replikate)	9,56 ± 0,28	12,46 ± 0,20

Daten: Mittelwert pro Versuchsaquarium über die gesamte Versuchslaufzeit ± SD. Die Messung von Wassertemperatur und Sauerstoffkonzentration erfolgte kontinuierlich.

Tabelle 36: Atemfrequenzen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositions-konzentration (Guanylurea-P)	Atemfrequenz
Kontrolle	65 ± 4,97
0,1 µg/L	63 ± 4,64
1 µg/L	62 ± 5,38
10 µg/L	63 ± 6,65
50 µg/L	63 ± 4,82
100 µg/L	64 ± 4,78
390 µg/L	65 ± 5,67
1.000 µg/L	64 ± 7,15
Mittelwert	64 ± 5,60

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD.

Tabelle 37: Körpergewichte und Gewichtszunahmen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositions-konzentration (Guanylurea-P)	Körper-gewicht (M) (v. E.) (in g)	Körper-gewicht (W) (v. E.) (in g)	Körper-gewicht (M) (n. E.) (in g)	Körper-gewicht (W) (n. E.) (in g)	Gewichts-zunahme pro Fisch (M) (in g)	Gewichts-zunahme pro Fisch (W) (in g)
Kontrolle	378 ± 38	395 ± 31	416 ± 47	422 ± 30	38 ± 22	28 ± 14
0,1 µg/L	386 ± 50	370 ± 34	413 ± 51	389 ± 40	27 ± 15	19 ± 16
1 µg/L	382 ± 35	382 ± 43	416 ± 44	411 ± 61	34 ± 28	29 ± 31
10 µg/L	387 ± 36	367 ± 29	430 ± 41	402 ± 25	43 ± 20	36 ± 20
50 µg/L	392 ± 56	381 ± 28	418 ± 64	409 ± 36	26 ± 23	28 ± 25
100 µg/L	400 ± 45	382 ± 39	436 ± 63	411 ± 37	36 ± 35	29 ± 23
390 µg/L	375 ± 42	381 ± 39	410 ± 40	406 ± 41	35 ± 26	25 ± 17
1.000 µg/L	375 ± 41	391 ± 34	407 ± 47	413 ± 31	32 ± 20	22 ± 15
Mittelwert	384 ± 43	381 ± 35	418 ± 50	408 ± 39	34 ± 24	27 ± 21

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD. v. E.: vor Exposition; n. E.: nach Exposition; M: Männchen; W: Weibchen.

Gesamtanzahl Männchen: $n = 160$, Weibchen: $n = 160$.

Tabelle 38: Standardlängen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositionskonzentration (Guanylurea-P)	Gesamtlänge (M) (n. E.) (in cm)	Gesamtlänge (W) (n. E.) (in cm)
Kontrolle	33,2 ± 1,12	33,8 ± 0,97
0,1 µg/L	33,5 ± 1,35	33,1 ± 1,05
1 µg/L	33,5 ± 1,17	33,6 ± 1,56
10 µg/L	33,7 ± 1,04	33,2 ± 0,66
50 µg/L	33,8 ± 1,52	33,6 ± 1,06
100 µg/L	34,1 ± 1,45	33,5 ± 0,99
390 µg/L	33,0 ± 1,00	33,2 ± 0,99
1.000 µg/L	33,0 ± 1,29	33,3 ± 1,06
Mittelwert	33,5 ± 1,28	33,4 ± 1,07

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD, Bereich: Minimum-Maximum. n. E.: nach Exposition; M: Männchen; W: Weibchen. Gesamtanzahl Männchen: $n = 160$, Weibchen: $n = 160$.

Tabelle 39: Hodengewichte der pubertären, männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositionskonzentration (Guanylurea-P)	Linker Hoden (in mg)	Rechter Hoden (in mg)	Gesamthodengewicht pro Fisch (in mg)
Kontrolle	5.659 ± 1.643	5.136 ± 2.066	10.795 ± 3.491
0,1 µg/L	5.270 ± 1.701	5.517 ± 2.217	10.788 ± 3.800
1 µg/L	4.687 ± 1.673	5.360 ± 2.243	10.047 ± 3.824
10 µg/L	5.874 ± 2.154	6.039 ± 2.228	11.913 ± 4.237
50 µg/L	6.319 ± 2.491	6.472 ± 2.402	12.792 ± 4.803
100 µg/L	6.379 ± 1.736	6.100 ± 2.002	12.478 ± 3.492
390 µg/L	5.902 ± 1.565	5.324 ± 1.820	11.227 ± 2.936
1.000 µg/L	5.796 ± 1.978	5.477 ± 1.809	11.273 ± 3.585
Mittelwert	5.747 ± 1.914	5.679 ± 2.095	11.426 ± 3.805

Dargestellt sind die mittleren Gonadengewicht ± SD. Pubertäre Männchen: $n = 143$.

Tabelle 40: Hodengewichte der Gesamtanzahl männlicher Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositionskonzentration (Guanylurea-P)	Linker Hoden (in mg)	Rechter Hoden (in mg)	Gesamthodengewicht pro Fisch (in mg)
Kontrolle	5.109 ± 2.299	4.639 ± 2.481	9.901 ± 4.688
0,1 µg/L	4.750 ± 2.270	4.973 ± 2.683	9.723 ± 4.863
1 µg/L	3.768 ± 2.401	4.305 ± 2.943	8.056 ± 5.313
10 µg/L	5.583 ± 2.467	5.742 ± 2.544	11.325 ± 4.892
50 µg/L	5.390 ± 3.222	5.521 ± 3.203	10.911 ± 6.367
100 µg/L	5.747 ± 2.544	5.497 ± 2.650	11.245 ± 5.033
390 µg/L	5.030 ± 2.570	4.538 ± 2.544	9.568 ± 4.865
1.000 µg/L	5.796 ± 1.978	5.477 ± 1.809	11.273 ± 3.585
Mittelwert	5.147 ± 2.515	5.087 ± 2.626	10.233 ± 5.011

Dargestellt sind die mittleren Gonadengewicht ± SD. Gesamtanzahl Männchen: $n = 160$.

Tabelle 41: Ovariengewichte (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositionskonzentration (Guanylurea-P)	linkes Ovar (in mg)	rechtes Ovar (in mg)	Gesamtovariengewicht pro Fisch (in mg)
Kontrolle	1.881 ± 589	1.796 ± 370	3.677 ± 839
0,1 µg/L	1.396 ± 561	1.185 ± 420^a	2.581 ± 921
1 µg/L	1.588 ± 647	1.522 ± 708	3.035 ± 1.337
10 µg/L	1.570 ± 816	1.304 ± 675	2.874 ± 1.389
50 µg/L	1.662 ± 708	1.525 ± 676	3.187 ± 1.319
100 µg/L	2.039 ± 1.042	1.871 ± 879	3.909 ± 1.845
390 µg/L	1.724 ± 716	1.672 ± 951	3.397 ± 1.578
1.000 µg/L	1.905 ± 696	1.570 ± 478	3.397 ± 1.142
Mittelwert	1.721 ± 746	1.556 ± 695	3.257 ± 1.364

Dargestellt sind die mittleren Ovariengewicht ± SD. Weibchen: $n = 159$; Signifikanzen: ^a: $p = 0,008$.

Tabelle 42: Lebergewichte (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositions-konzentration (Guanylurea-P)	Lebergewicht Männchen (in g)	Lebergewicht Weibchen (in g)	Lebergewicht (Gesamt) (in g)
Kontrolle	2,82 ± 0,57	4,06 ± 0,66	3,44 ± 0,87
0,1 µg/L	2,89 ± 0,70	3,14 ± 0,96	3,02 ± 0,83
1 µg/L	2,62 ± 0,55	3,73 ± 0,82	3,18 ± 0,89
10 µg/L	2,91 ± 0,58	3,45 ± 0,47	3,18 ± 0,59
50 µg/L	2,62 ± 0,53	3,71 ± 0,76	3,16 ± 0,85
100 µg/L	2,87 ± 0,61	3,52 ± 0,74	3,19 ± 0,74
390 µg/L	2,88 ± 0,52	3,80 ± 1,01	3,34 ± 0,91
1.000 µg/L	2,87 ± 0,47	3,66 ± 0,81	3,27 ± 0,76
Mittelwert	2,81 ± 0,56	3,63 ± 0,80	3,22 ± 0,80

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl Männchen: n = 160, Weibchen: n = 160.

Tabelle 43: Biologische Indices (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositions-konzentration (Guanylurea-P)	K (M) (n = 160)	K (W) (n = 160)	HSI (M) (n = 160)	HSI (W) (n = 160)	GSI Gesamt-anzahl (M) (n = 160)	GSI (pubertäre M) (n = 143)	GSI (W) (n = 160)
Kontrolle	1,13 ± 0,07	1,10 ± 0,06	0,72 ± 0,14	0,96 ± 0,14	2,31 ± 1,03	2,56 ± 0,74	0,87 ± 0,20
0,1 µg/L	1,10 ± 0,06	1,08 ± 0,05	0,67 ± 0,16	0,85 ± 0,22	2,30 ± 1,10	2,55 ± 0,83	0,66 ± 0,21
1 µg/L	1,10 ± 0,07	1,08 ± 0,05	0,67 ± 0,10	0,93 ± 0,15	1,86 ± 1,20	2,32 ± 0,86	0,74 ± 0,22
10 µg/L	1,13 ± 0,06	1,10 ± 0,05	0,68 ± 0,11	0,87 ± 0,12	2,61 ± 1,07	2,75 ± 0,90	0,71 ± 0,32
50 µg/L	1,07 ± 0,05^a	1,08 ± 0,08	0,69 ± 0,10	0,91 ± 0,15	2,51 ± 1,34	2,94 ± 0,91	0,78 ± 0,32
100 µg/L	1,10 ± 0,06	1,09 ± 0,07	0,71 ± 0,13	0,89 ± 0,20	2,54 ± 1,14	2,82 ± 0,79	0,96 ± 0,44
390 µg/L	1,14 ± 0,07	1,11 ± 0,06	0,72 ± 0,12	0,92 ± 0,17	2,34 ± 1,24	2,74 ± 0,81	0,82 ± 0,32
1.000 µg/L	1,13 ± 0,04	1,12 ± 0,06	0,71 ± 0,10	0,91 ± 0,18	2,77 ± 0,86	2,77 ± 0,86	0,83 ± 0,27
Mittelwert	1,11 ± 0,06	1,09 ± 0,06	0,70 ± 0,12	0,91 ± 0,17	2,41 ± 1,13	2,69 ± 0,84	0,80 ± 0,31

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; K: Konditionsfaktor; HSI: hepatosomatischer Index; GSI: gonadosomatischer Index; M: Männchen; W: Weibchen Signifikanzen: ^a: p = 0,003).

Tabelle 44: Klinische Chemie (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositions- konzentration (Guanylurea-P)	Gesamtprotein (in g/dL)	Albumin (in g/dL)	Albumin- Glutamin- Verhältnis (berechnet)	Alkalische Phosphatase (ALP) (in U/L)	Aspartat- Aminotrans- ferase (AST) (in U/L)	Alanin- Aminotrans- ferase (ALT) (in U/L)	γ-Glutamyl- Transferase (GGT) (in U/L)	Laktat- Dehydrogenase (LDH) (in U/L)
Kontrolle	3,54 ± 0,38	1,36 ± 0,10	0,64 ± 0,07	72 ± 15	28 ± 15	7,0 ± 3,77	5,3 ± 0,00	459 ± 194
0,1 µg/L	3,47 ± 0,36	1,33 ± 0,12	0,61 ± 0,11	69 ± 21	27 ± 10	5,8 ± 2,12	5,3 ± 0,00	457 ± 189
1 µg/L	3,47 ± 0,43	1,36 ± 0,10	0,67 ± 0,11	71 ± 22	29 ± 11	8,1 ± 4,61	5,3 ± 0,00	410 ± 194
10 µg/L	3,67 ± 0,40	1,42 ± 0,15	0,65 ± 0,10	80 ± 33	33 ± 13	8,3 ± 5,11	5,3 ± 0,00	480 ± 194
50 µg/L	3,39 ± 0,37	1,32 ± 0,13	0,66 ± 0,06	64 ± 16	33 ± 13	6,7 ± 2,43	5,7 ± 1,49	410 ± 186
100 µg/L	3,60 ± 0,40	1,35 ± 0,13	0,61 ± 0,05	63 ± 21^a	29 ± 12	8,8 ± 5,34	5,3 ± 0,00	479 ± 158
390 µg/L	3,50 ± 0,46	1,35 ± 0,16	0,64 ± 0,10	71 ± 43	32 ± 14	8,2 ± 5,13	5,5 ± 0,60	419 ± 176
1.000 µg/L	3,60 ± 0,37	1,35 ± 0,14	0,61 ± 0,06	77 ± 26	28 ± 13	6,6 ± 3,17	5,5 ± 0,60	395 ± 127
Mittelwert	3,51 ± 0,40	1,34 ± 0,13	0,63 ± 0,09	70 ± 26	30 ± 13	7,4 ± 4,16	5,37 ± 0,60	436 ± 177

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl pro Testkonzentration 10 Männchen und 10 Weibchen. Signifikanzen: ^a: p = 0,025.

Fortsetzung Tabelle 44: Klinische Chemie (Teilversuch Nr. 1, Guanyldurea)

Expositions- konzentration (Guanyldurea-P)	Cholesterol (in mg/dL)	HDL- Cholesterol (in mg/dL)	LDL- Cholesterol (in mg/dL)	Triglyceride (in mg/dL)	Glukose (in mg/dL)	Harnsäure (in mg/dL)	Blut- Harnstoff- Stickstoff (BUN) (in mg/dL)	Kreatinin (in mg/dL)	Calcium (in mg/dL)
Kontrolle	169 ± 19	77 ± 8,52	4,6 ± 2,61	247 ± 35	87 ± 12	0,33 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,22 ± 0,10	11,6 ± 1,87
0,1 µg/L	162 ± 18	77 ± 9,28	5,3 ± 3,72	200 ± 36^c	93 ± 12	0,35 ± 0,06	1,08 ± 0,18	0,22 ± 0,09	10,9 ± 1,70
1 µg/L	165 ± 24	78 ± 9,35	6,2 ± 5,12	218 ± 51^d	96 ± 21	0,36 ± 0,09	1,06 ± 0,19	0,23 ± 0,12	11,3 ± 1,72
10 µg/L	180 ± 24	84 ± 13	3,7 ± 2,09	255 ± 59	98 ± 19	0,37 ± 0,11	1,09 ± 0,21	0,21 ± 0,09	11,4 ± 1,56
50 µg/L	155 ± 20^a	72 ± 9,81^b	5,1 ± 3,45	211 ± 35^e	89 ± 15	0,38 ± 0,19	1,24 ± 0,85	0,23 ± 0,23	11,3 ± 1,83
100 µg/L	164 ± 24	76 ± 12	5,1 ± 4,26	252 ± 58	88 ± 17	0,33 ± 0,00	1,07 ± 0,31	0,19 ± 0,05	11,6 ± 1,98
390 µg/L	167 ± 26	78 ± 12	4,5 ± 2,83	227 ± 57	92 ± 20	0,33 ± 0,00	1,42 ± 0,83^f	0,19 ± 0,06	11,4 ± 1,79
1.000 µg/L	177 ± 19	82 ± 10	4,2 ± 3,41	255 ± 57	90 ± 13	0,33 ± 0,00	1,19 ± 0,36^g	0,18 ± 0,04	11,6 ± 1,64
Mittelwert	166 ± 23	77 ± 11	4,8 ± 3,55	232 ± 53	91 ± 16	0,35 ± 0,09	1,13 ± 0,47	0,21 ± 0,11	11,3 ± 1,74

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl pro Testkonzentration 10 Männchen und 10 Weibchen; HDL: High Density Lipoproteine; LDL: Low Density Lipoproteine; Signifikanzen: ^a: p = 0,019; ^b: p = 0,035; ^c: p = 0,000; ^d: p = 0,028; ^e: p = 0,002; ^f: p = 0,009; ^g: p = 0,019.

Tabelle 45: Hämatologie (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositions- konzentration (Guanylurea-P)	Hämatokrit (in %) M	Hämatokrit (in %) W	Hämatokrit (in %) (Gesamt)	Erythrozyten (in 10 ⁶ /μL) M	Erythrozyten (in 10 ⁶ /μL) W	Erythrozyten (in 10 ⁶ /μL) (Gesamt)	Hämoglobin (in g/dL) M	Hämoglobin (in g/dL) W	Hämoglobin (in g/dL) (Gesamt)
Kontrolle	58 ± 4,97	54 ± 6,17	56 ± 5,97	1,44 ± 0,41	1,33 ± 0,29	1,39 ± 0,35	10 ± 0,75	9 ± 0,97	9 ± 1,01
0,1 μg/L	59 ± 4,42	53 ± 5,74	56 ± 5,73	1,39 ± 0,38	1,33 ± 0,25	1,36 ± 0,31	10 ± 0,56	8 ± 0,85	9 ± 0,91
1 μg/L	66 ± 6,30	56 ± 8,98	61 ± 9,04	1,46 ± 0,24	1,26 ± 0,27	1,36 ± 0,27	10 ± 0,57	8 ± 0,90	9 ± 1,17
10 μg/L	64 ± 6,18	59 ± 6,05	62 ± 6,46	1,42 ± 0,28	1,45 ± 0,19	1,44 ± 0,24	10 ± 0,57	9 ± 0,75	10 ± 0,88
50 μg/L	69 ± 4,30	55 ± 5,83	62 ± 8,45	1,68 ± 0,20	1,34 ± 0,13	1,51 ± 0,24	11 ± 0,57	9 ± 0,62	10 ± 1,26
100 μg/L	62 ± 7,61	52 ± 5,56	57 ± 8,34	1,58 ± 0,19	1,36 ± 0,18	1,47 ± 0,21	10 ± 1,05	8 ± 0,83	9 ± 1,33
390 μg/L	66 ± 5,81	62 ± 8,77	64 ± 7,51^a	1,59 ± 0,14	1,40 ± 0,19	1,50 ± 0,19	10 ± 0,46	9 ± 1,13	10 ± 0,92
1.000 μg/L	63 ± 6,68	53 ± 3,31	58 ± 7,04	1,64 ± 0,21	1,33 ± 0,12	1,48 ± 0,23	10 ± 0,78	9 ± 0,53	9 ± 1,02
Mittelwert	63 ± 6,53	56 ± 7,01	59 ± 7,76	1,53 ± 0,28	1,35 ± 0,21	1,44 ± 0,26	10 ± 0,76	9 ± 0,86	9 ± 1,08

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl pro Testkonzentration Männchen: 10, Weibchen: 10; Angabe der statischen Überprüfung nur für Gesamtgruppen; Signifikanzen:

^a: p = 0,008.

Fortsetzung Tabelle 45:Hämatologie (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositions- konzentration (Guanylurea- P)	MCH (in pg/Zelle) (M)	MCH (in pg/Zelle) (W)	MCH (in pg/Zelle) (Gesamt)	MCV (in μm^3) (M)	MCV (in μm^3) (W)	MCV (in μm^3) (Gesamt)	MCHC (in gHb/dL Ery.) (M)	MCHC (in gHb/dL Ery.) (W)	MCHC (in gHb/dL Ery.) (Gesamt)
Kontrolle	72 ± 23	66 ± 13	69 ± 19	437 ± 137	421 ± 106	429 ± 119	17 ± 0,68	16 ± 1,14	16 ± 0,96
0,1 µg/L	78 ± 42	65 ± 12	72 ± 31	474 ± 223	410 ± 72	442 ± 164	16 ± 1,06	16 ± 0,71	16 ± 0,90
1 µg/L	71 ± 12	70 ± 22	71 ± 17	458 ± 54	466 ± 132	462 ± 98^a	16 ± 1,60	15 ± 1,81	15 ± 1,68
10 µg/L	74 ± 17	62 ± 6,41	68 ± 14	465 ± 99	411 ± 48	438 ± 81	16 ± 1,07	15 ± 0,88	16 ± 1,02^b
50 µg/L	66 ± 7,72	66 ± 8,67	66 ± 7,99	414 ± 55	415 ± 63	415 ± 58	16 ± 0,80	16 ± 0,83	16 ± 0,79
100 µg/L	66 ± 7,62	63 ± 5,97	64 ± 6,87	393 ± 52	381 ± 40	387 ± 45	17 ± 1,55	16 ± 0,86	17 ± 1,24
390 µg/L	63 ± 5,20	67 ± 7,19	65 ± 6,36	415 ± 54	443 ± 54	429 ± 54	15 ± 1,07	15 ± 1,73	15 ± 1,40^c
1.000 µg/L	62 ± 5,03	65 ± 5,35	63 ± 5,26	385 ± 32	404 ± 33	394 ± 33	16 ± 0,75	16 ± 0,92	16 ± 0,82
Mittelwert	69 ± 19	65 ± 11	67 ± 15	430 ± 107	419 ± 76	425 ± 92	16 ± 1,17	16 ± 1,22	16 ± 1,20

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Ery.: Erythrozyten; Gesamtanzahl pro Testkonzentration Männchen: 10, Weibchen: 10; Angabe der statischen Überprüfung nur für Gesamtgruppen; Signifikanzen: ^a: p = 0,047; ^b: p = 0,021; ^c: p = 0,025.

Fortsetzung Tabelle 45:Hämatologie (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Expositions- konzentration (Guanylurea -P)	Leuko- zyten (in 10 ³ /μL) (M)	Leuko- zyten (in 10 ³ /μL) (W)	Leukozyten (in 10 ³ /μL) (Gesamt)	Lympho- zyten (in %) (M)	Lympho- zyten (in %) (W)	Lympho- zyten (in %) (Gesamt)	Stab- kernige Granulo- zyten (in %) (M)	Stab- kernige Granulo- zyten (in %) (W)	Stab- kernige Granulo- zyten (in %) (Gesamt)	Segment- kernige Granulo- zyten (in %) (M)	Segment- kernige Granulo- zyten (in %) (W)	Segment- kernige Granulo- zyten (in %) (Gesamt)
Kontrolle	30,55 ± 9,62	30,85 ± 5,21	30,70 ± 7,53	96 ± 2,71	93 ± 3,92	94 ± 3,79	0,8 ± 0,79	2,1 ± 1,29	1,4 ± 1,23	2,8 ± 2,10	5,2 ± 3,77	4,0 ± 3,21
0,1 μg/L	29,63 ± 9,88	29,70 ± 5,17	29,66 ± 7,67	97 ± 4,17	95 ± 4,72	96 ± 4,44	0,4 ± 0,52	0,8 ± 0,79	0,6 ± 0,68^b	3,1 ± 3,81	4,5 ± 4,79	3,8 ± 4,27
1 μg/L	30,50 ± 9,49	24,63 ± 8,37	27,56 ± 9,22	96 ± 2,88	88 ± 8,74	92 ± 7,49	1,2 ± 1,14	1,7 ± 1,16	1,45 ± 1,15	2,6 ± 2,76	7,2 ± 5,29	4,9 ± 4,73
10 μg/L	23,00 ± 6,67	22,20 ± 4,87	22,60 ± 5,70^a	95 ± 3,13	94 ± 2,73	94 ± 2,87	1,7 ± 1,16	1,0 ± 0,94	1,35 ± 1,09	3,7 ± 2,26	4,9 ± 2,47	4,3 ± 2,39
50 μg/L	30,20 ± 6,39	29,18 ± 5,03	29,69 ± 5,62	90 ± 7,11	95 ± 4,17	92 ± 6,09	2,0 ± 2,05	1,2 ± 1,14	1,6 ± 1,67	7,4 ± 5,72	4,3 ± 3,77	5,9 ± 4,98
100 μg/L	35,30 ± 6,39	27,90 ± 7,41	31,60 ± 7,73	96 ± 1,51	93 ± 3,58	94 ± 3,04	1,3 ± 0,82	2,6 ± 0,97	1,95 ± 1,10	3,0 ± 1,41	4,3 ± 3,09	3,7 ± 2,43
390 μg/L	27,00 ± 8,62	31,35 ± 8,65	29,18 ± 8,70	95 ± 3,98	94 ± 3,70	95 ± 3,80	0,5 ± 0,71	1,3 ± 1,77	0,9 ± 1,37	3,8 ± 3,85	4,6 ± 2,37	4,2 ± 3,14
1.000 μg/L	27,05 ± 4,68	32,95 ± 6,37	30,00 ± 6,22	98 ± 1,83	93 ± 3,98	96 ± 3,83	0,4 ± 0,70	1,9 ± 1,66	1,15 ± 1,46	1,6 ± 1,26	4,7 ± 2,98	3,2 ± 2,74
Mittelwert	29,15 ± 8,28	28,59 ± 7,11	28,87 ± 7,68	95 ± 4,22	93 ± 4,94	94 ± 4,71	1,0 ± 1,18	1,6 ± 1,33	1,3 ± 1,28	3,5 ± 3,47	5,0 ± 3,64	4,2 ± 3,61

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl pro Testkonzentration Männchen: 10, Weibchen: 10; Angabe der statischen Überprüfung nur für Gesamtgruppen; Signifikanzen:

^a: p = 0,004; ^b: p = 0,022.

Tabelle 46: Vitellogenin bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch 1, Guanylurea)

Expositions- konzentration (Guanylurea-P)	Pubertäre Männchen Vitellogenin n. E. (in ng/mL)	Pubertäre Männchen – Vitellogenin- Induktionsfaktor	Gesamtanzahl Männchen Vitellogenin n. E. (in ng/mL)	Gesamtanzahl Männchen Vitellogenin- Induktionsfaktor
Kontrolle	14,53 ± 8,38	-	15,15 ± 8,21	-
0,1 µg/L	23,75 ± 33	1,6	23,75 ± 31	1,6
1 µg/L	19,16 ± 7,66	1,3	18,96 ± 14	1,3
10 µg/L	10,55 ± 8,76	0,7	10,80 ± 8,60	0,7
50 µg/L	32,79 ± 14^a	2,3	31,48 ± 14^b	2,2
100 µg/L	25,90 ± 12	1,8	25,23 ± 12	1,7
390 µg/L	17,73 ± 11	1,2	16,95 ± 10	1,2
1.000 µg/L	11,89 ± 7,22	0,8	11,89 ± 7,22	0,8
Mittelwert	19,54 ± 13	-	19,28 ± 13,16	-

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Pubertäre Männchen: $n = 143$, Gesamtanzahl Männchen: $n = 160$; Signifikanzen:

^a: $p = 0,001$; ^b: $p = 0,002$.

Tabelle 47: Biomarker bei männlichen, pubertären Regenbogenforellen (Teilversuch 1, Guanylurea)

Expositions- konzentration (Guanylurea-P)	Aromatase (in ng/mL)	Estradiol (in ng/mL)	Testosteron (in ng/mL)	Hormon- quotient (Estradiol/ Testosteron)	11-Keto- testosteron (in ng/mL)
Kontrolle	15,66 ± 2,73	20,84 ± 2,49	11,69 ± 5,13	2,20 ± 1,12	6,49 ± 2,85
0,1 µg/L	18,78 ± 3,80	25,37 ± 3,14^a	9,00 ± 5,55	4,02 ± 2,62	5,00 ± 3,08
1 µg/L	17,57 ± 3,75	23,44 ± 5,21	12,34 ± 4,92	2,23 ± 1,07	6,85 ± 2,72
10 µg/L	18,76 ± 2,84	26,20 ± 3,53^b	14,80 ± 7,02	2,23 ± 1,07	8,22 ± 3,90
50 µg/L	17,26 ± 2,69	23,12 ± 1,84	19,39 ± 6,91	1,39 ± 0,62	10,77 ± 3,84
100 µg/L	18,09 ± 2,63	27,98 ± 3,63^c	15,51 ± 7,75	2,15 ± 0,80	8,62 ± 4,31
390 µg/L	15,82 ± 11,32	21,81 ± 3,00	18,15 ± 10,73	1,58 ± 0,76	10,08 ± 5,96
1.000 µg/L	15,96 ± 2,56	30,49 ± 3,69^d	14,88 ± 8,02	2,48 ± 0,95	8,27 ± 4,46
Mittelwert	17,24 ± 4,04	24,91 ± 3,32	14,47 ± 7,00	2,29 ± 1,13	8,04 ± 3,89

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl pro Testkonzentration: 10; Pubertäre Männchen: $n = 143$;

Signifikanzen: ^a: $p = 0,040$, ^b: $p = 0,004$, ^c: $p = 0,000$; ^d: $p = 0,000$.

Tabelle 48: Biomarker bei der Gesamtanzahl männlicher Regenbogenforellen (Teilversuch 1, Guanylurea)

Expositions-konzentration (Guanylurea-P)	Aromatase (in ng/mL)	Estradiol (in ng/mL)	Testosteron (in ng/mL)	Hormon-quotient (Estradiol/Testosteron)	11-Keto-testosteron (in ng/mL)
Kontrolle	15,87 ± 2,68	21,02 ± 2,44	10,71 ± 5,69	3,26 ± 3,46	5,95 ± 3,16
0,1 µg/L	18,73 ± 3,66	25,60 ± 3,14 ^a	8,71 ± 5,52	4,70 ± 4,19	4,84 ± 3,07
1 µg/L	17,15 ± 3,47	22,58 ± 4,97	10,54 ± 5,68	3,01 ± 1,97	5,85 ± 3,16
10 µg/L	18,83 ± 2,79	26,34 ± 3,50 ^b	14,14 ± 7,42	3,02 ± 3,61	7,85 ± 4,12
50 µg/L	16,80 ± 2,95	22,82 ± 1,84	17,33 ± 8,14	1,91 ± 1,56	9,63 ± 4,52
100 µg/L	17,86 ± 2,60	27,47 ± 3,85 ^c	14,32 ± 8,19	2,71 ± 2,11	7,95 ± 4,55
390 µg/L	16,05 ± 10,71	21,83 ± 3,07	16,08 ± 11	2,25 ± 2,01	8,93 ± 6,15
1.000 µg/L	15,96 ± 2,56	30,49 ± 3,69 ^d	14,88 ± 8,02	2,48 ± 0,95	8,27 ± 4,46
Mittelwert	17,16 ± 3,93	24,77 ± 3,31	13,34 ± 7,47	2,92 ± 2,48	7,41 ± 4,15

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl pro Testkonzentration: 10; Gesamtanzahl Männchen: $n = 160$; Signifikanzen: ^a: $p = 0,016$, ^b: $p = 0,002$, ^c: $p = 0,000$, ^d: $p = 0,000$.

Tabelle 49: Biomarker bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch 1, Guanylurea)

Expositions-konzentration (Guanylurea-P)	Aromatase (in ng/mL)	Estradiol (in ng/mL)	Testosteron (in ng/mL)	Hormon-quotient (Estradiol/Testosteron)	11-Keto-testosteron (in ng/mL)
Kontrolle	41,24 ± 19	56,28 ± 23	15,48 ± 7,29	3,86 ± 0,90	7,55 ± 3,55
0,1 µg/L	26,67 ± 11	39,53 ± 15	9,23 ± 5,70	5,30 ± 2,19	4,50 ± 2,78
1 µg/L	36,70 ± 16	57,14 ± 28	15,29 ± 9,58	4,27 ± 1,43	7,45 ± 4,67
10 µg/L	27,06 ± 10	39,99 ± 15	7,52 ± 3,27	5,74 ± 1,58^a	3,67 ± 1,59^d
50 µg/L	33,06 ± 13	59,19 ± 28	12,70 ± 9,19	6,03 ± 2,69^b	6,19 ± 4,48
100 µg/L	27,78 ± 10	62,60 ± 31	15,53 ± 11	4,56 ± 1,26	7,57 ± 5,37
390 µg/L	37,01 ± 21	67,56 ± 33	13,39 ± 7,61	6,15 ± 3,53^c	6,53 ± 3,71
1.000 µg/L	32,11 ± 19	51,35 ± 28	12,55 ± 7,27	4,51 ± 1,30	6,11 ± 3,54
Mittelwert	32,70 ± 16	54,20 ± 27	12,71 ± 8,25	5,05 ± 2,15	6,20 ± 4,02

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl pro Testkonzentration: 10; Signifikanzen: ^a: $p = 0,004$, ^b: $p = 0,030$, ^c: $p = 0,000$, ^d: $p = 0,006$.

Tabelle 50: Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch 1, Guanylurea)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	390 µg/L	1.000 µg/L
Kopfnieren								
Anzahl (n)	20	20	20	20	20	20	20	20
Akute diffuse Stauungshyperämie	0,3 ± 0,64	0,3 ± 0,30	0,2 ± 0,41	0,2 ± 0,33	0,3 ± 0,47	0,2 ± 0,33	0,2 ± 0,38	0,7 ± 0,61
Melano-makrophagen	1,5 ± 0,51	1,5 ± 0,64	1,2 ± 0,50	1,4 ± 0,66	1,3 ± 0,47	1,2 ± 0,50	1,3 ± 0,52	1,4 ± 0,49
Gesamtscore/Kopfnieren	0,9 ± 0,85	0,9 ± 0,87	0,7 ± 0,71	0,8 ± 0,85	0,8 ± 0,71	0,7 ± 0,71	0,8 ± 0,80	1,1 ± 0,49
Rumpfnieren								
Anzahl (n)	20	20	20	20	20	20	20	20
Akute diffuse Stauungshyperämie	0,3 ± 0,66	0,1 ± 0,22	0,1 ± 0,32	0,1 ± 0,22	0,2 ± 0,37	0,2 ± 0,52	0,1 ± 0,31	0,2 ± 0,49
Melano-makrophagen	2,7 ± 0,82	2,4 ± 0,67	2,5 ± 0,51	2,3 ± 0,66	2,1 ± 0,72	2,1 ± 0,60	2,3 ± 0,66	2,3 ± 0,81
Hyalintropfige Degeneration der Tubulusepithelzellen	0,0 ± 0,11	0,0 ± 0,00	0,4 ± 0,81	0,0 ± 0,00	0,2 ± 0,49	0,2 ± 0,67	0,1 ± 0,45	0,2 ± 0,17
Neue Nephrone	1,1 ± 0,72	1,0 ± 0,55	1,0 ± 0,50	0,9 ± 0,44	0,8 ± 0,47	0,8 ± 0,47	1,0 ± 0,61	0,8 ± 0,40
Einzelzell-apoptosen Tubulusepithel	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,11	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,11	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,21
Gesamtscore/Rumpfnieren	0,8 ± 1,14	0,7 ± 1,02	0,8 ± 1,03	0,7 ± 0,99	0,7 ± 0,86	0,6 ± 0,84	0,7 ± 0,99	0,7 ± 0,94
Milz								
Anzahl (n)	20	20	20	20	20	20	20	20
Stauung/Erythrozytenspeicherung	2,1 ± 1,27	2,3 ± 0,92	2,1 ± 1,00	1,8 ± 1,07	1,8 ± 1,06	1,8 ± 0,91	1,8 ± 0,91	1,7 ± 0,92
Melano-makrophagen	1,6 ± 0,66	2,0 ± 0,51	1,7 ± 0,47	1,8 ± 0,55	2,0 ± 0,22	2,0 ± 0,51	2,1 ± 0,45	2,0 ± 0,63
Gesamtscore/Milz	1,8 ± 0,34	2,1 ± 0,25	1,9 ± 0,25	1,8 ± 0,00	1,9 ± 0,11	1,9 ± 0,14	1,9 ± 0,25	1,9 ± 0,21

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD.

Fortsetzung Tabelle 50: Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch 1, Guanylurea)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	390 µg/L	1.000 µg/L
Leber								
Anzahl (n)	20	20	20	20	20	20	20	20
Akute diffuse Stauungshyperämie	0,3 ± 0,48	0,4 ± 0,49	0,1 ± 0,22	0,3 ± 0,44	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,31	0,2 ± 0,37	0,1 ± 0,64
Melano-makrophagen	0,6 ± 0,22	0,6 ± 0,22	0,7 ± 0,24	0,6 ± 0,21	0,6 ± 0,21	0,6 ± 0,22	0,7 ± 0,25	0,8 ± 0,24
Einzelzellapoptosen	0,1 ± 0,18	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,11	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,11
Herdförmige Infiltration mono-nukleärer Zellen (Parenchym)	0,2 ± 0,54	0,1 ± 0,22	0,1 ± 0,22	0,1 ± 0,26	0,1 ± 0,24	0,2 ± 0,37	0,0 ± 0,11	0,3 ± 0,49
Infiltration mono-nukleärer Zellen (perivaskulär)	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,22	0,1 ± 0,24	0,1 ± 0,31	0,1 ± 0,24	0,2 ± 0,41	0,1 ± 0,31	0,0 ± 0,11
Infiltration mono-nukleärer Zellen (peribiliär)	0,1 ± 0,22	0,1 ± 0,45	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,20	0,1 ± 0,33
Gesamtscore/Leber	0,2 ± 0,20	0,2 ± 0,22	0,2 ± 0,23	0,2 ± 0,21	0,2 ± 0,21	0,2 ± 0,21	0,2 ± 0,25	0,2 ± 0,27
Leber/Speicherung von Glykogen und Fett								
Intrazyto-plasmatische Vakuolisierung der Hepatozyten (Gesamt)	2,3 ± 0,87	1,8 ± 0,85	2,6 ± 0,60	2,2 ± 0,89	2,2 ± 0,89	2,1 ± 1,04	2,1 ± 0,95	1,8 ± 0,95
Anzahl (n)	10	10	10	10	10	10	10	10
Intrazyto-plasmatische Vakuolisierung der Hepatozyten M	2,3 ± 0,82	1,8 ± 1,03	2,7 ± 0,67	2,3 ± 0,95	1,8 ± 0,92	2,4 ± 1,17	1,8 ± 0,86	2,0 ± 0,94
Intrazyto-plasmatische Vakuolisierung der Hepatozyten W	2,3 ± 0,95	1,7 ± 0,67	2,4 ± 0,52	2,1 ± 0,88	2,6 ± 0,70	1,7 ± 0,79	2,4 ± 0,97	1,8 ± 1,01
Herz								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Infiltration mono-nukleärer Zellen im Epikard	0,2 ± 0,28	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,1 ± 0,28
Gesamtscore/Herz	0,2 ± 0,28	-	-	-	-	-	-	0,1 ± 0,28

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD. M: Männchen, W: Weibchen. n.d.: nicht durchgeführt.

Fortsetzung Tabelle 50: Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch 1, Guanylurea)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	390µg/L	1.000 µg/L
Pankreas								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Einzelzellapoptosen von exokrinen Pankreaszellen	0,1 ± 0,34	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,1 ± 0,21
Gesamtscore/ Pankreas	0,1 ± 0,34	-	-	-	-	-	-	0,1 ± 0,21
Magen								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	19
Einzelzellnekrose/ Apoptosen in der Lamina epithelialis mucosae	0,8 ± 0,44	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,3 ± 0,31
Einzelzellnekrose/ Apoptosen in der Magendrüsenzellen (fundic gland)	0,5 ± 0,5	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,1 ± 0,18
Gesamtscore/ Magen	0,7 ± 0,21	-	-	-	-	-	-	0,2 ± 0,09
Pylorusanhänge								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	19
Einzelzellnekrose/ Apoptosen in der Lamina epithelialis mucosae	1,6 ± 0,53	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,4 ± 0,51
Verkalkungsherde in Tela submucosa bzw. Tunica muscularis	0,1 ± 0,45	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,00
Gesamtscore/ Pylorusanhänge	0,9 ± 1,08	-	-	-	-	-	-	0,7 ± 1,00
Darm								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Einzelzellapoptosen in der Lamina epithelialis mucosae	0,9 ± 0,35	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,1 ± 0,39
Entzündl. Infiltration (EGCs) in der Lamina propria	0,1 ± 0,22	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,11
Gesamtscore/ Darm	0,5 ± 0,60	-	-	-	-	-	-	0,6 ± 0,78

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD. n.d.: nicht durchgeführt.

Fortsetzung Tabelle 50: Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch 1, Guanylurea)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	390 µg/L	1.000 µg/L
Gehirn								
Anzahl (n)	18	0	0	0	0	0	0	14
Hämorrhagien	0,1 ± 0,24	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,3 ± 0,42
Infiltration mononukleärer Zellen in den Meningen	0,0 ± 0,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,1 ± 0,27
Gesamtscore/Gehirn	0,1 ± 0,07	-	-	-	-	-	-	0,2 ± 0,14
Haut								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Intraepitheliale Infiltration mit Lymphozyten	0,0 ± 0,11	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,5 ± 0,11
Gesamtscore/Haut	0,0 ± 0,11	-	-	-	-	-	-	0,5 ± 0,11
Muskulatur								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Ohne besonderen Befund	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	-
Gesamtscore/Muskulatur	-	-	-	-	-	-	-	-
Schwimmbläse								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Ohne besonderen Befund	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	-
Gesamtscore/Schwimmbläse	-	-	-	-	-	-	-	-

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD. n.d.: nicht durchgeführt.

Fortsetzung Tabelle 50: Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch 1, Guanylurea)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	390 µg/L	1.000 µg/L
Kieme								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Akute Hyperämie	0,8 ± 0,91	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,3 ± 0,80
Ödematisierung der Lamellen („epithel lifting“)	0,1 ± 0,22	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,1 ± 0,15
Nekrose von Kiemenepithel	0,0 ± 0,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,00
Hyperplasie des Primärlamellen-epithels	0,4 ± 0,48	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,2 ± 0,25
Hyperplasie des Sekundärlamellen-epithels	0,2 ± 0,41	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,4 ± 0,38
Infiltration der Sekundärlamellen mit mononukleären Entzündungszellen	0,2 ± 0,26	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,4 ± 0,33
Verschmelzung von Sekundärlamellen	0,2 ± 0,41	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,2 ± 0,41
Keulenförmige Auftreibung der Sekundärlamellen	1,1 ± 0,97	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,0 ± 0,92
Teleangiektasie	0,1 ± 0,22	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,00
Chloridzell-schwellung	0,6 ± 0,39	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,6 ± 0,48
Proliferation von Mukuszellen	0,0 ± 0,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,00
Gesamtscore/ Kieme	0,3 ± 0,35	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,3 ± 0,31

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD. n.d.: nicht durchgeführt.

Tabelle 51: Semiquantitative Auswertung der Leber (Karmin nach Best) (Teilversuch 1, Guanylurea)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	390 µg/L	1.000 µg/L
Leber								
Anzahl (n)	6	0	0	0	0	0	0	6
Glykogen-speicherung (Gesamt)	3,2 ± 1,33	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	2,7 ± 0,52
Anzahl (n)	3	0	0	0	0	0	0	3
Glykogen-speicherung (M)	3,3 ± 1,15	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	2,7 ± 0,58
Glykogen-speicherung (W)	3,0 ± 1,73	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	2,7 ± 0,58

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; M: Männchen, W: Weibchen.

Tabelle 52: Semiquantitative Auswertung der Reifegrade der Hoden (Teilversuch 1, Guanylurea)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	390 µg/L	1.000 µg/L
Reifegrad Hoden (Gesamt)								
Anzahl (n)	20	20	20	20	20	20	20	20
Reifegrad nach Billard (1992)	4,4 ± 0,99	4,5 ± 1,24	4,1 ± 1,39	4,5 ± 1,00	4,5 ± 0,96	4,4 ± 1,27	4,0 ± 1,41	4,8 ± 0,41
Reifegrad Hoden (pubertär)								
Anzahl (n)	18	18	16	19	17	18	17	20
Reifegrad nach Billard (1992)	4,6 ± 0,62	4,9 ± 0,32	4,6 ± 0,50	4,6 ± 0,60	4,7 ± 0,47	4,8 ± 0,55	4,5 ± 0,62	4,8 ± 0,41
Reifegrad Hoden (präpubertär)								
Anzahl (n)	2	2	4	1	2*	2	3	0
Reifegrad nach Billard (1992)	2,5 ± 2,12	1,0 ± 0,00	1,8 ± 1,50	-	2,5 ± 2,12	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	-

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD, *: bei einem Fisch ausschließlich der Samenleiter angeschnitten.

Tabelle 53: Validität der Berechnung der Schätzvolumina (V_v) der Nierenzellkompartimente, Protokoll A (Teilversuch Nr. 1, Guanylurea)

Parameter	Exkretorische Niere ($n_{\text{Gesamt}} = 40$)	<i>Corpuscula renalia</i> ($n_{\text{Gesamt}} = 40$)	Tubuli ($n_{\text{Gesamt}} = 40$)	Neue Nephronen ($n_{\text{Gesamt}} = 36$)	Sammelrohre ($n_{\text{Gesamt}} = 40$)	Hämatopoetisches Gewebe ($n_{\text{Gesamt}} = 40$)	Vaskuläres System ($n_{\text{Gesamt}} = 40$)	Sonstiges ($n_{\text{Gesamt}} = 39$)
Konfidenzintervall $\pm$ 10 % + Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %	100 % ($n = 40$)	75 % ($n = 30$)	100 % ($n = 40$)	11 % ($n = 4$)	90 % ($n = 36$)	100 % ($n = 40$)	100 % ($n = 40$)	69 % ($n = 27$)
Konfidenzintervall $\pm$ 20 % + Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %	100 % ($n = 40$)	100 % ($n = 40$)	100 % ($n = 40$)	64 % ($n = 23$)	100 % ($n = 40$)	100 % ($n = 40$)	100 % ($n = 40$)	92 % ($n = 36$)

n_{Gesamt} = Gesamtanzahl der Versuchsfische bei denen der entsprechende Nierenzelltyp nachgewiesen wurde.

Tabelle 54: Übersicht Schätzvolumina (V_v) der verschiedenen Nierenkompartimente, Protokoll A (Teilversuch 1, Guanylurea)

Expositions-konzentration (Guanylurea-P)	Exkretorische Niere (M)	Exkretorische Niere (W)	Exkretorische Niere (Gesamt)	Hämatopoetisches Gewebe ¹ (M)	Hämatopoetisches Gewebe ¹ (W)	Hämatopoetisches Gewebe ¹ (Gesamt)	Melano-makrophagen (M)	Melano-makrophagen (W)	Melano-makrophagen
Kontrolle	0,225 $\pm$ 0,03	0,225 $\pm$ 0,04	0,225 $\pm$ 0,03	0,542 $\pm$ 0,04	0,531 $\pm$ 0,07	0,537 $\pm$ 0,06	0,037 $\pm$ 0,01	0,045 $\pm$ 0,01	0,042 $\pm$ 0,01
1.000 $\mu\text{g/L}$	0,233 $\pm$ 0,04	0,199 $\pm$ 0,04	0,216 $\pm$ 0,04	0,0525 $\pm$ 0,05	0,0573 $\pm$ 0,06	0,549 $\pm$ 0,06	0,039 $\pm$ 0,01	0,043 $\pm$ 0,01	0,041 $\pm$ 0,01

Daten: Mittelwert beider Replikate $\pm$ SD; M: Männchen, W: Weibchen; Pro Testkonzentration: 10 Männchen und 10 Weibchen.

¹inkl. Melanomakrophagen.

Fortsetzung Tabelle 54: Übersicht Schätzvolumina (VV) der verschiedenen Nierenkompartimente, Protokoll A (Teilversuch 1, Guanyldurea)

Expositions- konzentration (Guanyldurea-P)	Vaskuläres System (M)	Vaskuläres System (W)	Vaskuläres System (Gesamt)	Sonstiges (M)	Sonstiges (W)	Sonstiges (Gesamt)
Kontrolle	0,220 ± 0,04	0,232 ± 0,04	0,226 ± 0,042	0,014 ± 0,01	0,013 ± 0,01	0,013 ± 0,012
1.000 µg/L	0,227 ± 0,04	0,216 ± 0,07	0,222 ± 0,052	0,015 ± 0,01	0,013 ± 0,01	0,014 ± 0,011

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; M: Männchen, W: Weibchen; Pro Testkonzentration: 10 Männchen und 10 Weibchen.

Tabelle 55: Schätzvolumina (V_V) der exkretorischen Niere, Protokoll A (Teilversuch 1, Guanyldurea)

Expositions- konzentration (Guanyldurea-P)	<i>Corpuscula renalia</i> (M)	<i>Corpuscula renalia</i> (W)	<i>Corpuscula renalia</i> (Gesamt)	Tubuli (M)	Tubuli (W)	Tubuli (Gesamt)	Sammelrohre und Ureter (M)	Sammelrohre und Ureter (W)	Sammelrohre und Ureter (Gesamt)
Kontrolle	0,007 ± 0,004	0,010 ± 0,004	0,008 ± 0,004	0,201 ± 0,03	0,189 ± 0,03	0,195 ± 0,03	0,015 ± 0,01	0,023 ± 0,01	0,019 ± 0,01
1.000 µg/L	0,007 ± 0,003	0,006 ± 0,003	0,006 ± 0,003	0,211 ± 0,04	0,178 ± 0,04	0,194 ± 0,04	0,015 ± 0,01	0,013 ± 0,01	0,014 ± 0,01

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; M: Männchen, W: Weibchen; Pro Testkonzentration: 10 Männchen und 10 Weibchen.

Tabelle 56: Absolutes und Relatives Nierenvolumen (Teilversuch 1, Guanylurea)

Expositions-konzentration (Guanylurea-P)	Nierenvolumen (M) (in mm ³)	Nierenvolumen (W) (in mm ³)	Nierenvolumen (Gesamt) (in mm ³)	Relatives Nierenvolumen (M) (Nierenvolumen in mm ³ / KM in g)	Relatives Nierenvolumen (W) (Nierenvolumen in mm ³ / KM in g)	Relatives Nierenvolumen (Gesamt) (Nierenvolumen in mm ³ / KM in g)
Kontrolle	3.194 ± 285	2.879 ± 272	3.037 ± 315	7,28 ± 0,48	6,82 ± 0,46	7,05 ± 0,51
0,1 µg/L	2.819 ± 281	2.998 ± 386	2.909 ± 341	7,24 ± 0,90	7,26 ± 0,46	7,25 ± 0,75
1 µg/L	3.038 ± 363	3.064 ± 786	3.051 ± 596	6,94 ± 0,92	7,24 ± 1,25	7,09 ± 1,08
10 µg/L	3.187 ± 402	2.643 ± 315	2.915 ± 449	7,31 ± 0,70	6,50 ± 0,88	6,90 ± 0,88
50 µg/L	3.528 ± 641	3.005 ± 568	3.266 ± 648	7,73 ± 0,96	7,24 ± 1,01	7,48 ± 0,99
100 µg/L	3.519 ± 493	3.186 ± 356	3.352 ± 452	7,53 ± 0,54	7,49 ± 0,67	7,51 ± 0,60
390 µg/L	3.125 ± 410	3.033 ± 205	3.079 ± 319	7,44 ± 0,67	7,57 ± 0,51	7,50 ± 0,58
1.000 µg/L	29.47 ± 294	2.950 ± 485	2.949 ± 390	7,23 ± 0,69	6,92 ± 1,07	7,08 ± 0,89
Mittelwert	3.194 ± 285	2.879 ± 272	3.070 ± 470	7,23 ± 0,82	7,13 ± 0,88	7,23 ± 0,76

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Pro Testkonzentration: 10 Männchen und 10 Weibchen. M: Männchen, W: Weibchen.

Tabelle 57: Übersicht Absolutvolumina (V) der verschiedenen Nierenkompartimente, Protokoll A (Teilversuch 1, Guanylurea)

Expositions-konzentration (Guanylurea-P)	Exkretorische Niere (M) (in mm ³)	Exkretorische Niere (W) (in mm ³)	Exkretorische Niere (Gesamt) (in mm ³)	Hämatopoetisches Gewebe ¹ (M) (in mm ³)	Hämatopoetisches Gewebe ¹ (W) (in mm ³)	Hämatopoetisches Gewebe ¹ (Gesamt) (in mm ³)	Melano-makrophagen (M) (in mm ³)	Melano-makrophagen (W) (in mm ³)	Melano-makrophagen (Gesamt) (in mm ³)
Kontrolle	719 ± 106	650 ± 138	684 ± 125	1.739 ± 263	1.526 ± 240	1.633 ± 269	118 ± 22	128 ± 27	123 ± 25
1.000 µg/L	688 ± 139	590 ± 163	639 ± 156	1.550 ± 236	1.695 ± 379	1.622 ± 316	116 ± 18	124 ± 32	120 ± 26

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; M: Männchen, W: Weibchen; Pro Testkonzentration: 10 Männchen und 10 Weibchen.¹inkl. Melanomakrophagen.

Fortsetzung Tabelle 57: Übersicht Absolutvolumina (V) der verschiedenen Nierenkompartimente, Protokoll A (Teilversuch 1, Guanylurea)

Expositions-konzentration (Guanylurea-P)	Vaskuläres System (M) (in mm ³)	Vaskuläres System (W) (in mm ³)	Vaskuläres System (Gesamt) (in mm ³)	Sonstiges (M) (in mm ³)	Sonstiges (W) (in mm ³)	Sonstiges (Gesamt) (in mm ³)
Kontrolle	694 ± 103	667 ± 143	681 ± 122	45 ± 38	37 ± 41	41 ± 38
1.000 µg/L	667 ± 109	626 ± 178	647 ± 145	43 ± 40	39 ± 27	41 ± 33

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; M: Männchen, W: Weibchen; Pro Testkonzentration: 10 Männchen und 10 Weibchen.

Tabelle 58: Absolutvolumina (V) der exkretorischen Niere, Protokoll A (Teilversuch 1, Guanylurea)

Expositions-konzentration (Guanylurea-P)	<i>Corpuscula renalia</i> (M) (in mm ³)	<i>Corpuscula renalia</i> (W) (in mm ³)	<i>Corpuscula renalia</i> (Gesamt) (in mm ³)	Tubuli (M) (in mm ³)	Tubuli (W) (in mm ³)	Tubuli (Gesamt) (in mm ³)	Sammelrohre und Ureter (M) (in mm ³)	Sammelrohre und Ureter (W) (in mm ³)	Sammelrohre und Ureter (Gesamt) (in mm ³)
Kontrolle	21 ± 12	27 ± 12	24 ± 12	641 ± 101	546 ± 117	593 ± 117	47 ± 35	69 ± 42	58 ± 39
1.000 µg/L	19 ± 9,23	19 ± 11	19 ± 9,70	621 ± 132	525 ± 145	573 ± 143	45 ± 17	40 ± 34	42 ± 26

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; M: Männchen, W: Weibchen; Pro Testkonzentration: 10 Männchen und 10 Weibchen.

Tabelle 59: Neue Nephronen bei subadulten Regenbogenforellen, Protokoll B (Teilversuch Nr. 1, Guanyldurea)

Expositions- konzentration (Guanyldurea- P)	Schätzvolumen Neue Nephronen (M)	Schätzvolumen Neue Nephronen (W)	Schätzvolumen Neue Nephronen (Gesamt)	Absolutvolumen Neue Nephronen (in mm ³) (M)	Absolutvolumen Neue Nephronen (in mm ³) (W)	Absolutvolumen Neue Nephronen (in mm ³) (Gesamt)	Ergebnisse entsprechen Konfidenzinter- vall ± 10 % + Irrtumswahr- scheinlichkeit 5 % (Gesamt)	Ergebnisse entsprechen Konfidenzinter- vall ± 20 % + Irrtumswahr- scheinlichkeit 5 % (Gesamt)
Kontrolle	0,0011 ± 0,001	0,0007 ± 0,001	0,0009 ± 0,001	3,53 ± 4,47	2,05 ± 2,56	2,79 ± 3,63	70 % (n = 14)	95 % (n = 19)
0,1 µg/L	0,0017 ± 0,001	0,0029 ± 0,002	0,023 ± 0,002	4,61 ± 2,53	8,63 ± 6,14	6,62 ± 5,01	95 % (n = 19)	100 % (n = 20)
1 µg/L	0,0016 ± 0,002	0,0019 ± 0,001	0,0017 ± 0,002	4,95 ± 7,30	5,81 ± 3,12	5,38 ± 5,48	95 % (n = 19)	100 % (n = 20)
10 µg/L	0,0012 ± 0,001	0,0020 ± 0,002	0,0016 ± 0,001	3,83 ± 3,25	5,57 ± 4,87	4,70 ± 4,13	100 % (n = 20)	100 % (n = 20)
50 µg/L	0,0005 ± 0,000	0,0021 ± 0,003	0,0013 ± 0,002	1,92 ± 1,49	7,39 ± 11,28	4,66 ± 8,32	90 % (n = 18)	100 % (n = 20)
100 µg/L	0,0007 ± 0,001	0,0017 ± 0,002	0,0012 ± 0,002	2,53 ± 3,43	5,09 ± 7,07	3,81 ± 5,57	80 % (n = 16)	100 % (n = 20)
390 µg/L	0,0010 ± 0,001	0,0010 ± 0,001	0,0010 ± 0,001	3,16 ± 3,43	3,05 ± 2,16	3,10 ± 2,79	80 % (n = 16)	100 % (n = 20)
1.000 µg/L	0,0004 ± 0,000	0,0005 ± 0,001	0,0004 ± 0,000	1,24 ± 1,15	1,29 ± 1,36	1,26 ± 1,22	45 % (n = 9)	90 % (n = 18)
Gesamt:	0,0010 ± 0,001	0,0016 ± 0,002	0,0013 ± 0,002	3,22 ± 3,85	4,84 ± 5,93	4,04 ± 5,07	83 % (n = 132)	98 % (n = 157)

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; M: Männchen, W: Weibchen; Pro Testkonzentration: 10 Männchen und 10 Weibchen.

B.6 Tabellarische Ergebnisse Teilversuch Nr. 2 (Metformin)

Tabelle 60: Wasserparameter in den Versuchsaquarien (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Versuchsaquarium (Metformin-HCL)	Gelöster Sauerstoff (in mg/L)	Wassertemperatur (in °C)
Replikat A		
Kontrolle, Replikat A	9,51 ± 0,21	12,50 ± 0,12
0,1 µg/L, Replikat A	9,59 ± 0,11	12,56 ± 0,11
1 µg/L, Replikat A	9,55 ± 0,13	12,68 ± 0,11
10 µg/L, Replikat A	9,32 ± ,25	12,57 ± 0,11
50 µg/L, Replikat A	9,61 ± 0,16	12,64 ± 0,10
100 µg/L, Replikat A	9,56 ± 0,13	12,55 ± 0,13
390 µg/L, Replikat A	9,50 ± 0,11	12,61 ± 0,12
1.000 µg/L, Replikat A	9,51 ± 0,17	12,59 ± 0,13
Replikat B		
Kontrolle, Replikat B	9,36 ± 0,16	12,62 ± 0,12
0,1 µg/L, Replikat B	9,44 ± 0,09	12,68 ± 0,13
1 µg/L, Replikat B	9,59 ± 0,13	12,58 ± 0,12
10 µg/L, Replikat B	9,48 ± 0,14	12,64 ± 0,13
50 µg/L, Replikat B	9,26 ± 0,33	12,68 ± 0,15
100 µg/L, Replikat B	9,47 ± 0,12	12,57 ± 0,19
390 µg/L, Replikat B	9,68 ± 0,07	12,64 ± 0,18
1.000 µg/L, Replikat B	9,44 ± 0,09	12,68 ± 0,18
Mittelwert (beide Replikate)	9,54 ± 0,26	12,63 ± 0,23

Daten: Mittelwert pro Versuchsaquarium über die gesamte Versuchslaufzeit ± SD. Die Messung von Wassertemperatur und Sauerstoffkonzentration erfolgte jeweils kontinuierlich.

Tabelle 61: Atemfrequenzen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Atemfrequenz
Kontrolle	63 ± 6,19
0,1 µg/L	62 ± 6,49
1 µg/L	60 ± 5,93
10 µg/L	60 ± 4,94
50 µg/L	61 ± 7,53
100 µg/L	59 ± 6,12
500 µg/L	61 ± 5,47
1.000 µg/L	63 ± 6,73
Mittelwert	61 ± 6,30

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD.

Tabelle 62: Körpergewichte und Gewichtszunahmen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Körper-gewicht (M) (v. E.) (in g)	Körper-gewicht (W) (v. E.) (in g)	Körper-gewicht (M) (n. E.) (in g)	Körper-gewicht (W) (n. E.) (in g)	Gewichts-zunahme pro Fisch (M) (in g)	Gewichts-zunahme pro Fisch (W) (in g)
Kontrolle	297 ± 18	287 ± 17	338 ± 24	331 ± 23	41 ± 17	44 ± 14
0,1 µg/L	296 ± 15	290 ± 20	337 ± 23	336 ± 25	41 ± 14	46 ± 15
1 µg/L	305 ± 20	294 ± 19	346 ± 28	336 ± 23	41 ± 19	42 ± 17
10 µg/L	300 ± 21	295 ± 16	341 ± 30	336 ± 24	42 ± 21	41 ± 17
50 µg/L	307 ± 22	293 ± 15	345 ± 33	341 ± 27	37 ± 16	49 ± 21
100 µg/L	305 ± 17	292 ± 18	345 ± 24	342 ± 36	40 ± 16	49 ± 28
500 µg/L	305 ± 19	294 ± 16	343 ± 20	342 ± 20	38 ± 12	47 ± 16
1.000 µg/L	294 ± 21	301 ± 12	337 ± 28	336 ± 19	43 ± 19	35 ± 18
Mittelwert	301 ± 19	293 ± 17	342 ± 26	337 ± 25	40 ± 17	44 ± 19
Mittelwert M und W	297 ± 19		339 ± 26		42 ± 18	

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD. v. E.: vor Exposition; n. E.: nach Exposition; M: Männchen; W: Weibchen.

Gesamtanzahl Männchen: $n = 160$, Weibchen: $n = 160$.

Tabelle 63: Gesamtlängen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Gesamt-länge (M) (v. E) (in cm)	Gesamt-länge (W) (v. E) (in cm)	Gesamt-länge (M) (n. E.) (in cm)	Gesamt-länge (W) (n. E.) (in cm)	Gesamt-längen -zunahme pro Fisch (M) (in cm)	Gesamt-längen -zunahme pro Fisch (W) (in cm)
Kontrolle	29,6 ± 0,65	29,5 ± 0,90	30,5 ± 0,72	30,8 ± 1,01	0,9 ± 0,41	1,3 ± 0,48
0,1 µg/L	29,5 ± 0,64	29,4 ± 0,62	30,4 ± 0,68	30,9 ± 0,70	0,9 ± 0,33	1,5 ± 0,44
1 µg/L	29,7 ± 0,63	29,4 ± 0,75	30,7 ± 0,61	30,7 ± 0,70	1,0 ± 0,32	1,3 ± 0,36
10 µg/L	29,5 ± 0,78	29,4 ± 0,65	30,8 ± 0,75	30,8 ± 0,72	1,2 ± 0,49	1,3 ± 0,51
50 µg/L	29,6 ± 0,49	29,1 ± 0,51	30,6 ± 0,60	30,7 ± 0,60	1,0 ± 0,31	1,5 ± 0,49
100 µg/L	29,7 ± 0,58	29,3 ± 0,73	30,7 ± 0,68	30,8 ± 0,92	1,0 ± 0,30	1,5 ± 0,48
500 µg/L	29,6 ± 0,71	29,3 ± 0,68	30,4 ± 0,72	30,7 ± 0,59	0,8 ± 0,31	1,4 ± 0,54
1.000 µg/L	29,2 ± 0,89	29,5 ± 0,76	30,4 ± 0,82	30,8 ± 0,60	1,1 ± 0,53	1,3 ± 0,51
Mittelwert	29,6 ± 0,68	29,4 ± 0,70	30,6 ± 0,70	30,8 ± 0,73	1,0 ± 0,40	1,4 ± 0,48
Mittelwert M und W	29,5 ± 0,69		30,7 ± 0,72		1,2 ± 0,48	

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD. v. E.: vor Exposition; n. E.: nach Exposition; M: Männchen; W: Weibchen.

Tabelle 64: Hodengewichte pubertärer Männchen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Gewicht linker Hoden (in mg)	Gewicht rechter Hoden (in mg)	Hodengewicht pro Fisch (in mg)
Kontrolle	12.453 ± 2.997	10.469 ± 2.108	23.102 ± 4.907
0,1 µg/L	11.799 ± 2.505	10.800 ± 1.735	22.599 ± 3.857
1 µg/L	12.834 ± 3.864	10.927 ± 3.043	23.761 ± 6.414
10 µg/L	11.698 ± 3.799	10.474 ± 3.644	22.171 ± 7.185
50 µg/L	13.374 ± 5.395	11.310 ± 3.621	25.050 ± 8.714
100 µg/L	12.239 ± 3.709	10.584 ± 3.010	22.822 ± 6.458
500 µg/L	13.157 ± 2.816	11.560 ± 3.065	24.717 ± 5.321
1.000 µg/L	12.627 ± 3.103	11.422 ± 2.487	24.049 ± 5.102
Mittelwert	12.568 ± 3.594	10.926 ± 2.855	23.566 ± 6.084

Dargestellt sind die mittleren Gonadengewicht ± SD. Pubertäre Männchen: n = 131.

Tabelle 65: Hodengewichte der Gesamtanzahl der Männchen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Gewicht linker Hoden (in mg)	Gewicht rechter Hoden (in mg)	Hodengewicht pro Fisch (in mg)
Kontrolle	9.367 ± 6.057	8.016 ± 5.017	17.383 ± 11.023
0,1 µg/L	10.632 ± 4.303	9.733 ± 3.671	20.366 ± 7.783
1 µg/L	9006 ± 6.797	7.673 ± 5.688	16.679 ± 12.302
10 µg/L	8.786 ± 6.116	7.781 ± 5.583	16.658 ± 11.578
50 µg/L	12.374 ± 6.614	10.186 ± 4.867	22.560 ± 11.256
100 µg/L	10.414 ± 5.607	9.011 ± 4.731	19.425 ± 10.197
500 µg/L	11.849 ± 4.828	10.411 ± 4.574	22.260 ± 9.084
1.000 µg/L	10.119 ± 5.838	9.159 ± 5.143	19.278 ± 10.789
Mittelwert	10.319 ± 5.822	9.007 ± 4.937	19.326 ± 10.582

Dargestellt sind die mittleren Gonadengewicht ± SD. Gesamtanzahl Männchen: $n = 160$.

Tabelle 66: Ovariengewichte (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Gewicht linkes Ovar (in mg)	Gewicht rechtes Ovar (in mg)	Ovariengewicht pro Fisch (in mg)
Kontrolle	716 ± 803	604 ± 691	1.320 ± 1.488
0,1 µg/L	371 ± 370	378 ± 372	748 ± 860
1 µg/L	483 ± 568	442 ± 521	924 ± 1.087
10 µg/L	887 ± 1.006	736 ± 818	1.623 ± 1.813
50 µg/L	652 ± 707	575 ± 680	1.228 ± 1.369
100 µg/L	651 ± 687	620 ± 583	1.271 ± 1.278
500 µg/L	370 ± 298	345 ± 249	714 ± 543
1.000 µg/L	518 ± 506	546 ± 559	1.065 ± 1.046
Mittelwert	582 ± 663	531 ± 586	1.112 ± 1.239

Dargestellt sind die mittleren Ovariengewicht ± SD ($n = 159$).

Tabelle 67: Lebergewichte (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Lebergewicht Männchen (in g)	Lebergewicht Weibchen (in g)	Lebergewicht (Gesamt) (in g)
Kontrolle	3,02 ± 0,37	3,01 ± 0,68	3,01 ± 0,54
0,1 µg/L	3,02 ± 0,48	2,89 ± 0,41	2,95 ± 0,45
1 µg/L	3,01 ± 0,46	2,90 ± 0,40	2,96 ± 0,43
10 µg/L	2,98 ± 0,41	3,09 ± 0,77	3,03 ± 0,62
50 µg/L	3,05 ± 0,57	3,06 ± 0,49	3,06 ± 0,53
100 µg/L	2,95 ± 0,41	3,21 ± 0,89	3,08 ± 0,69
500 µg/L	3,15 ± 0,51	2,96 ± 0,30	3,06 ± 0,43
1.000 µg/L	3,06 ± 0,43	3,09 ± 0,49	3,07 ± 0,46
Mittelwert	3,03 ± 0,45	3,02 ± 0,58	3,03 ± 0,52

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl Männchen: $n = 158$, Weibchen: $n = 159$.

Tabelle 68: Biologische Indices (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	K (M) ($n = 160$)	K (W) ($n = 160$)	HSI (M) ($n = 158$)	HSI (W) ($n = 159$)	GSI (Gesamt-anzahl M) ($n = 160$)	GSI (pubertäre M) ($n = 131$)	GSI (W) ($n = 159$)
Kontrolle	1,19 ± 0,06	1,13 ± 0,06	0,88 ± 0,13	0,91 ± 0,16	5,16 ± 3,16	6,86 ± 1,34	0,44 ± 0,39
0,1 µg/L	1,20 ± 0,08	1,14 ± 0,06	0,89 ± 0,14	0,88 ± 0,12	6,00 ± 2,19	6,65 ± 1,00	0,26 ± 0,26
1 µg/L	1,20 ± 0,09	1,16 ± 0,05	0,86 ± 0,12	0,88 ± 0,12	4,71 ± 3,33	6,71 ± 1,60	0,35 ± 0,41
10 µg/L	1,18 ± 0,09	1,15 ± 0,06	0,83 ± 0,07	1,03 ± 0,25	4,81 ± 3,15	6,41 ± 1,75	0,80 ± 0,62
50 µg/L	1,20 ± 0,08	1,18 ± 0,07	0,90 ± 0,13	0,96 ± 0,20	6,45 ± 2,90	7,17 ± 2,07	0,44 ± 0,50
100 µg/L	1,19 ± 0,06	1,16 ± 0,08	0,88 ± 0,14	0,87 ± 0,14	5,63 ± 2,83	6,62 ± 1,73	0,31 ± 0,41
500 µg/L	1,22 ± 0,08	1,18 ± 0,05	0,93 ± 0,12	0,88 ± 0,11	6,44 ± 2,43	7,15 ± 1,23	0,20 ± 0,14
1.000 µg/L	1,20 ± 0,06	1,15 ± 0,07	0,88 ± 0,07	0,94 ± 0,11	5,67 ± 2,97	7,07 ± 1,09	0,36 ± 0,33
Mittelwert	1,20 ± 0,07	1,16 ± 0,06	0,88 ± 0,12	0,92 ± 0,16	5,61 ± 2,97	6,84 ± 1,54	0,33 ± 0,37
Mittelwert M und W	1,18 ± 0,07		0,90 ± 0,14		-	-	-

Dargestellt sind die gemittelten Werte der biologischen Indices jeder Expositions-konzentration und der Kontrolle.

K: Konditionsfaktor; HSI: hepatosomatischer Index; GSI: Gonadosomatischer Index; M: Männchen; W: Weibchen.

Tabelle 69: Klinische Chemie (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Gesamtprotein (in g/dL)	Albumin (in g/dL)	Albumin-Glutamin-Verhältnis (berechnet)	Alkalische Phosphatase (ALP) (in U/L)	Aspartat-Aminotransferase (AST) (in U/L)	Alanin-Aminotransferase (ALT) (in U/L)	γ-Glutamyl-Transferase (GGT) (in U/L)	Laktat-Dehydrogenase (LDH) (in U/L)
Kontrolle	3,00 ± 0,32	1,18 ± 0,13	0,66 ± 0,09	115 ± 41	28 ± 10	11 ± 5,99	5,3 ± 0,00	603 ± 191
0,1 µg/L	3,16 ± 0,35	1,25 ± 0,10	0,66 ± 0,08	140 ± 59	27 ± 17	12 ± 8,03	5,3 ± 0,00	570 ± 192
1 µg/L	3,08 ± 0,41	1,23 ± 0,17	0,66 ± 0,08	132 ± 42	29 ± 15	13 ± 9,78	5,3 ± 0,00	520 ± 221
10 µg/L	3,13 ± 0,37	1,23 ± 0,12	0,67 ± 0,08	124 ± 43	23 ± 6,61	8 ± 2,96	5,6 ± 1,27	531 ± 182
50 µg/L	3,23 ± 0,42	1,30 ± 0,16	0,68 ± 0,09	127 ± 43	25 ± 8,60	9 ± 3,45	5,5 ± 0,82	550 ± 270
100 µg/L	3,25 ± 0,41	1,29 ± 0,11	0,67 ± 0,10	121 ± 53	26 ± 11	13 ± 6,81	5,3 ± 0,00	549 ± 187
500 µg/L	2,97 ± 0,36	1,21 ± 0,14	0,71 ± 0,08	106 ± 37	24 ± 7,49	10 ± 3,20	5,6 ± 0,82	517 ± 188
1.000 µg/L	3,31 ± 0,55	1,30 ± 0,18	0,66 ± 0,07	127 ± 40	28 ± 8,34	12 ± 5,15	5,5 ± 0,60	536 ± 169
Mittelwert	3,14 ± 0,41	1,25 ± 0,14	0,67 ± 0,08	124 ± 45	26 ± 11	11 ± 6,21	5,4 ± 0,64	547 ± 200

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl pro Testkonzentration 10 Männchen und 10 Weibchen.

Fortsetzung Tabelle 69: Klinische Chemie (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions- konzentration (Metformin-HCL)	Cholesterol (in mg/dL)	HDL- Cholesterol (in mg/dL)	LDL- Cholesterol (in mg/dL)	Triglyceride (in mg/dL)	Glukose (in mg/dL)	Harnsäure (in mg/dL)	Blut- Harnstoff- Stickstoff (BUN) (in mg/dL)	Kreatinin (in mg/dL)	Calcium (in mg/dL)
Kontrolle	157 ± 25	68 ± 11	6,3 ± 5,12	256 ± 82	90 ± 25	0,33 ± 0,00	1,03 ± 0,13	0,21 ± 0,07	9,5 ± 0,82
0,1 µg/L	165 ± 20	72 ± 13	5,0 ± 3,69	257 ± 61	92 ± 19	0,33 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,20 ± 0,06	9,6 ± 0,45
1 µg/L	169 ± 23	73 ± 11	5,5 ± 4,66	263 ± 92	85 ± 18	0,37 ± 0,09	1,05 ± 0,22	0,20 ± 0,12	9,5 ± 0,54
10 µg/L	170 ± 18	72 ± 11	3,9 ± 2,13	278 ± 69	81 ± 12	0,33 ± 0,00	1,13 ± 0,56	0,17 ± 0,07	9,3 ± 0,55
50 µg/L	175 ± 27	75 ± 14	5,2 ± 5,73	304 ± 87	88 ± 19	0,33 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,19 ± 0,09	9,8 ± 0,79
100 µg/L	174 ± 21	76 ± 12	2,8 ± 0,59^a	301 ± 92	85 ± 22	0,35 ± 0,08	1,07 ± 0,23	0,17 ± 0,09	9,9 ± 0,87
500 µg/L	160 ± 24	68 ± 12	5,5 ± 3,53	267 ± 82	79 ± 8,95	0,33 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,17 ± 0,10	9,4 ± 0,61
1.000 µg/L	176 ± 27	76 ± 16	3,1 ± 1,48^b	305 ± 88	84 ± 15	0,33 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,19 ± 0,08	9,7 ± 0,89
Mittelwert	168 ± 24	73 ± 13	4,7 ± 3,87	279 ± 83	86 ± 18	0,34 ± 0,04	1,03 ± 0,23	0,19 ± 0,09	9,6 ± 0,72

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl pro Testkonzentration 10 Männchen und 10 Weibchen; HDL: High Density Lipoproteine; LDL: Low Density Lipoproteine; Signifikanzen: ^a: p = 0,004, ^b: p = 0,006.

Tabelle 70: Hämatologie (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions- konzentration (Metformin- HCL)	Hämatokrit (in %) (M)	Hämatokrit (in %) (W)	Hämatokrit (in %) (Gesamt)	Erythrozyten (in 10 ⁶ /μL) (M)	Erythrozyten (in 10 ⁶ /μL) (W)	Erythrozyten (in 10 ⁶ /μL) (Gesamt)	Hämoglobin (in g/dL) (M)	Hämoglobin (in g/dL) (W)	Hämoglobin (in g/dL) (Gesamt)
Kontrolle	57 ± 4,70	56 ± 5,45	57 ± 4,98	1,78 ± 0,24	1,58 ± 0,24	1,68 ± 0,26	10 ± 0,86	9 ± 0,75	10 ± 0,90
0,1 μg/L	56 ± 4,76	55 ± 3,63	55 ± 4,21	1,77 ± 0,25	1,52 ± 0,14	1,64 ± 0,24	10 ± 0,94	9 ± 0,50	9 ± 0,77
1 μg/L	54 ± 9,33	55 ± 5,59	55 ± 7,50	1,73 ± 0,29	1,62 ± 0,22	1,68 ± 0,26	10 ± 1,35	9 ± 0,91	9 ± 1,18
10 μg/L	54 ± 4,70	49 ± 2,84	51 ± 4,72	1,68 ± 0,17	1,59 ± 0,10	1,60 ± 0,16	10 ± 0,89	9 ± 0,57	9 ± 0,87
50 μg/L	59 ± 4,40	52 ± 4,86	55 ± 5,49	1,74 ± 0,24	1,50 ± 0,20	1,62 ± 0,25	10 ± 1,14	9 ± 0,68	10 ± 1,12
100 μg/L	56 ± 4,44	56 ± 6,23	56 ± 5,27	1,80 ± 0,16	1,54 ± 0,17	1,67 ± 0,21	10 ± 0,75	9 ± 1,06	10 ± 0,97
500 μg/L	58 ± 7,76	51 ± 7,39	54 ± 8,25	1,78 ± 0,18	1,50 ± 0,31	1,64 ± 0,29	10 ± 0,77	9 ± 1,24	9 ± 1,29
1.000 μg/L	62 ± 6,01	53 ± 7,17	58 ± 7,86	1,88 ± 0,11	1,57 ± 0,22	1,73 ± 0,23	10 ± 0,59	9 ± 0,98	10 ± 0,99
Mittelwert	57 ± 6,21	53 ± 5,90	55 ± 6,32	1,77 ± 0,21	1,54 ± 0,21	1,66 ± 0,24	10 ± 0,94	9 ± 0,86	9 ± 1,02

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl Männchen (M): n = 160, Weibchen (W): n = 160.

Fortsetzung Tabelle 70:Hämatologie (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions- konzentration (Metformin- HCL)	MCH (in pg/Zelle) (M)	MCH (in pg/Zelle) (W)	MCH (in pg/Zelle) (Gesamt)	MCV (in μm^3) (M)	MCV (in μm^3) (W)	MCV (in μm^3) (Gesamt)	MCHC (in gHb/dL Ery.) (M)	MCHC (in gHb/dL Ery.) (W)	MCHC (in gHb/dL Ery.) (Gesamt)
Kontrolle	57 $\pm$ 5,61	59 $\pm$ 5,41	58 $\pm$ 5,45	324 $\pm$ 34	360 $\pm$ 40	342 $\pm$ 40	18 $\pm$ 0,99	16 $\pm$ 0,80	17 $\pm$ 1,08
0,1 $\mu\text{g/L}$	55 $\pm$ 8,00	61 $\pm$ 6,33	58 $\pm$ 7,64	321 $\pm$ 35	362 $\pm$ 39	341 $\pm$ 42	17 $\pm$ 0,85	17 $\pm$ 1,02	17 $\pm$ 0,92
1 $\mu\text{g/L}$	57 $\pm$ 4,71	56 $\pm$ 6,23	56 $\pm$ 5,38	315 $\pm$ 39	344 $\pm$ 39	329 $\pm$ 41	18 $\pm$ 1,33	16 $\pm$ 0,71	17 $\pm$ 1,34
10 $\mu\text{g/L}$	58 $\pm$ 4,34	58 $\pm$ 2,95	58 $\pm$ 3,61	325 $\pm$ 35	322 $\pm$ 18	324 $\pm$ 27	18 $\pm$ 1,25	18 $\pm$ 0,65	18 $\pm$ 0,97
50 $\mu\text{g/L}$	59 $\pm$ 5,38	60 $\pm$ 5,89	60 $\pm$ 5,53	340 $\pm$ 30	354 $\pm$ 38	347 $\pm$ 34	17 $\pm$ 0,92	17 $\pm$ 1,15	17 $\pm$ 1,02
100 $\mu\text{g/L}$	56 $\pm$ 4,14	61 $\pm$ 6,09	58 $\pm$ 5,54	314 $\pm$ 25	364 $\pm$ 32	339 $\pm$ 38	18 $\pm$ 0,75	17 $\pm$ 0,91	17 $\pm$ 1,04
500 $\mu\text{g/L}$	57 $\pm$ 4,63	59 $\pm$ 8,00	58 $\pm$ 6,41	325 $\pm$ 28	349 $\pm$ 56	337 $\pm$ 45	18 $\pm$ 1,40	17 $\pm$ 0,71	17 $\pm$ 1,14
1.000 $\mu\text{g/L}$	55 $\pm$ 4,69	59 $\pm$ 3,67	57 $\pm$ 4,49	329 $\pm$ 27	339 $\pm$ 22	334 $\pm$ 25	17 $\pm$ 1,19	17 $\pm$ 1,16	17 $\pm$ 1,18
Mittelwert	57 $\pm$ 5,23	59 $\pm$ 5,68	58 $\pm$ 5,56	324 $\pm$ 32	349 $\pm$ 38	337 $\pm$ 37	18 $\pm$ 1,13	17 $\pm$ 1,00	17 $\pm$ 1,11

Daten: Mittelwert beider Replikate $\pm$ SD; Gesamtanzahl Männchen (M): $n = 160$, Weibchen (W): $n = 160$.

Fortsetzung Tabelle 70:Hämatologie (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions- konzentration (Metformin- HCL)	Leuko- zyten (in 10 ³ /μL) (M)	Leuko- zyten (in 10 ³ /μL) (W)	Leuko- zyten (in 10 ³ /μL) (Gesamt)	Lympho- zyten (in %) (M)	Lympho- zyten (in %) (W)	Lympho- zyten (in %) (Gesamt)	Stab- kernige Granulo- zyten (in %) (M)	Stab- kernige Granulo- zyten (in %) (W)	Stab- kernige Granulo- zyten (in %) (Gesamt)	Segment- kernige Granulo- zyten (in %) (M)	Segment- kernige Granulo- zyten (in %) (W)	Segment- kernige Granulo- zyten (in %) (Gesamt)
Kontrolle	23,30 ± 7,56	27,65 ± 6,74	25,48 ± 7,32	97 ± 1,45	95 ± 4,47	96 ± 3,34	1,0 ± 0,94	1,6 ± 1,43	1,3 ± 1,22	2,1 ± 0,88	3,1 ± 3,70	2,6 ± 2,66
0,1 μg/L	28,73 ± 3,58	27,60 ± 13	28,16 ± 9,56	94 ± 5,30	94 ± 4,18	94 ± 4,65	2,3 ± 1,42	2,7 ± 2,00	2,5 ± 1,70^a	4,2 ± 4,59	3,4 ± 3,47	3,8 ± 3,98
1 μg/L	27,53 ± 6,58	25,25 ± 8,41	26,39 ± 7,44	96 ± 2,95	95 ± 4,45	95 ± 3,71	1,6 ± 1,51	2,4 ± 1,65	2,0 ± 1,59	2,9 ± 2,73	3,1 ± 3,03	3,0 ± 2,81
10 μg/L	31,60 ± 9,66	25,55 ± 5,97	28,58 ± 8,41	96 ± 4,62	95 ± 4,06	96 ± 4,26	0,8 ± 1,32	1,4 ± 1,35	1,1 ± 1,33	2,9 ± 4,70	3,2 ± 3,05	3,1 ± 3,86
50 μg/L	28,83 ± 7,39	27,80 ± 8,51	28,31 ± 7,77	98 ± 1,85	95 ± 2,37	96 ± 2,74	0,5 ± 0,71	0,9 ± 0,99	0,7 ± 0,86	1,4 ± 1,35	4,5 ± 2,07	3,0 ± 2,33
100 μg/L	26,80 ± 4,67	27,83 ± 7,77	27,31 ± 6,26	96 ± 2,10	95 ± 4,82	95 ± 3,65	2,0 ± 1,25	2,1 ± 2,47	2,1 ± 1,90	2,2 ± 1,32	3,0 ± 3,09	2,6 ± 2,35
500 μg/L	29,25 ± 6,87	27,80 ± 6,73	28,53 ± 6,66	96 ± 2,17	94 ± 3,43	95 ± 2,94	1,6 ± 0,84	2,9 ± 2,08	2,3 ± 1,68	2,8 ± 1,75	3,3 ± 2,41	3,1 ± 2,06
1.000 μg/L	24,95 ± 6,36	27,20 ± 7,01	26,08 ± 6,61	96 ± 2,86	95 ± 3,16	95 ± 2,99	1,6 ± 1,90	1,0 ± 1,25	1,3 ± 1,59	2,6 ± 1,84	4,3 ± 2,31	3,5 ± 2,21
Mittelwert	27,62 ± 6,95	27,08 ± 8,04	27,35 ± 7,49	96 ± 3,28	95 ± 3,80	95 ± 3,60	1,4 ± 1,36	1,9 ± 1,79	1,7 ± 1,60	2,6 ± 2,75	3,5 ± 2,86	3,1 ± 2,83

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Gesamtanzahl Männchen (M): n = 160, Weibchen (W): n = 160; Signifikanzen: ^a: p = 0,015.

Tabelle 71: Vitellogenin bei männlichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions- konzentration (Metformin-HCL)	Pubertäre Männchen Vitellogenin n. E. (in ng/mL)	Pubertäre Männchen Vitellogenin- Induktionsfaktor	Gesamtanzahl Männchen Vitellogenin n. E. (in ng/mL)	Gesamtanzahl Männchen Vitellogenin- Induktionsfaktor
Kontrolle	16,88 ± 15	-	24,00 ± 20	-
0,1 µg/L	18,05 ± 12	1,07	17,19 ± 12	0,72
1 µg/L	35,53 ± 26	2,10	33,63 ± 24	1,40
10 µg/L	24,06 ± 28	1,42	22,13 ± 23	0,92
50 µg/L	32,79 ± 19	1,94	32,49 ± 18	1,35
100 µg/L	47,60 ± 23^a	2,82	48,00 ± 21^d	2,00
500 µg/L	50,33 ± 26^b	2,98	51,17 ± 25^e	2,13
1.000 µg/L	47,80 ± 26^c	2,83	47,01 ± 25^f	1,96

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; v. E.: vor Exposition; n. E.: nach Exposition; Pubertäre Männchen: $n = 131$, Gesamtanzahl Männchen: $n = 160$; Signifikanzen: ^a: $p = 0,006$, ^b: $p = 0,002$, ^c: $p = 0,004$, ^d: $p = 0,001$, ^e: $p = 0,000$ ^f: $p = 0,005$.

Tabelle 72: Biomarker bei männlichen, pubertären Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions- konzentration (Metformin-HCL)	Aromatase (in ng/mL)	Estradiol (in ng/mL)	Testosteron (in ng/mL)	Hormon- quotient (Estradiol/ Testosteron)	11-Keto- testosteron (in ng/mL)
Kontrolle	4,77 ± 0,70	9,00 ± 0,63	19,70 ± 10	3,46 ± 11	14,18 ± 11
0,1 µg/L	6,70 ± 0,35^a	8,87 ± 0,82	20,35 ± 12	0,85 ± 1,16	12,32 ± 6,31
1 µg/L	5,99 ± 0,88^b	8,17 ± 1,07	36,63 ± 31	0,48 ± 0,43	20,99 ± 19
10 µg/L	7,35 ± 0,53^c	7,39 ± 1,09^e	17,11 ± 10	0,54 ± 0,25	11,86 ± 8,08
50 µg/L	5,85 ± 1,36^d	6,94 ± 0,91^f	25,51 ± 17	0,80 ± 1,35	14,42 ± 6,34
100 µg/L	5,69 ± 0,76	9,28 ± 1,47	20,10 ± 17	1,39 ± 2,58	10,63 ± 7,06
500 µg/L	5,22 ± 0,97	6,56 ± 1,18^g	33,72 ± 18	0,30 ± 0,29ⁱ	15,00 ± 5,55
1.000 µg/L	5,52 ± 0,44	6,96 ± 0,86^h	24,27 ± 17	0,42 ± 0,26	12,29 ± 5,23

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; v. E.: vor Exposition; n. E.: nach Exposition; Pubertäre Männchen: $n = 131$, Signifikanzen: ^a: $p = 0,000$, ^b: $p = 0,020$, ^c: $p = 0,000$, ^d: $p = 0,036$, ^e: $p = 0,022$, ^f: $p = 0,000$, ^g: $p = 0,000$, ^h: $p = 0,000$, ⁱ: $p = 0,026$, ^j: $p = 0,000$.

Tabelle 73: Biomarker bei der Gesamtanzahl männlicher Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Aromatase (in ng/mL)	Estradiol (in ng/mL)	Testosteron (in ng/mL)	Hormon-quotient (Estradiol/Testosteron)	11-Keto-testosteron (in ng/mL)
Kontrolle	4,60 ± 0,74	8,95 ± 0,81	15,64 ± 12	4,28 ± 10	11,37 ± 11
0,1 µg/L	6,64 ± 0,40^a	8,93 ± 0,83	18,33 ± 13	8,89 ± 27	11,09 ± 7,06
1 µg/L	6,03 ± 0,82^b	8,21 ± 0,98	25,82 ± 31	27,94 ± 86	14,77 ± 19
10 µg/L	7,15 ± 0,79^c	7,27 ± 1,05^e	13,74 ± 12	2,40 ± 3,70	9,67 ± 8,49
50 µg/L	6,02 ± 1,42^d	6,98 ± 0,88^f	23,04 ± 18	2,01 ± 4,59	13,04 ± 7,35
100 µg/L	5,59 ± 0,77	9,21 ± 1,40	17,24 ± 17	2,70 ± 4,22	9,13 ± 7,45
500 µg/L	5,21 ± 0,93	6,58 ± 1,13^g	30,41 ± 20	1,42 ± 3,48ⁱ	13,60 ± 6,81
1.000 µg/L	5,51 ± 0,45	6,94 ± 0,80^h	19,50 ± 18	22,55 ± 71	9,95 ± 6,68

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; v. E.: vor Exposition; n. E.: nach Exposition; Pubertäre Männchen: $n = 131$, Gesamtanzahl Männchen: $n = 160$; Signifikanzen: ^a: $p = 0,000$, ^b: $p = 0,001$, ^c: $p = 0,000$, ^d: $p = 0,001$, ^e: $p = 0,000$, ^f: $p = 0,000$, ^g: $p = 0,000$, ^h: $p = 0,000$, ⁱ: $p = 0,031$.

Tabelle 74: Biomarker bei weiblichen Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Aromatase (in ng/mL)	Estradiol (in ng/mL)	Testosteron (in ng/mL)	Hormon-quotient (Estradiol/Testosteron)	11-Keto-testosteron (in ng/mL)
Kontrolle	29,19 ± 38	53,76 ± 77	9,73 ± 19	840,28 ± 1610	0,17 ± 0,17
0,1 µg/L	16,68 ± 29	22,71 ± 40	3,79 ± 12	2282,35 ± 2099	0,10 ± 0,10
1 µg/L	19,67 ± 37^e	39,10 ± 70	6,68 ± 17	63,70 ± 79	0,11 ± 0,14
10 µg/L	36,26 ± 44	56,20 ± 78^a	19,15 ± 39	40,27 ± 78^c	0,23 ± 0,32
50 µg/L	23,63 ± 33	36,57 ± 58	11,79 ± 24	130,44 ± 298	0,15 ± 0,20
100 µg/L	31,21 ± 42	44,49 ± 64	8,84 ± 18	162,23 ± 417	0,12 ± 0,15
500 µg/L	11,60 ± 14	16,31 ± 23	1,902 ± 7,90	868,92 ± 1642	0,07 ± 0,08
1.000 µg/L	27,80 ± 37	40,34 ± 59^b	8,60 ± 15	36,72 ± 93^d	0,13 ± 0,13

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD; Weibchen: $n = 160$; Signifikanzen: ^a: $p = 0,029$, ^b: $p = 0,001$, ^c: $p = 0,010$, ^d: $p = 0,020$, ^e: $p = 0,000$.

Tabelle 75: Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	500 µg/L	1.000 µg/L
Kopfnieren								
Anzahl (n)	20	20	20	20	20	20	20	20
Akute diffuse Stauungshyperämie	0,2 ± 0,37	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,4 ± 0,50
Melano-makrophagen	1,1 ± 0,36	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,0 ± 0,15
Gesamtscore/Kopfnieren	0,7 ± 0,64	-	-	-	-	-	-	0,7 ± 0,45
Rumpfnieren								
Anzahl (n)	20	20	20	20	20	20	20	20
Akute diffuse Stauungshyperämie	0,1 ± 0,22	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,4 ± 0,75
Melano-makrophagen	2,2 ± 0,81	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	2,3 ± 0,92
Herdförmige Proliferation des hämatopoetischen Gewebes	0,0 ± 0,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,1 ± 0,32
Hyalintropfige Degeneration der Tubulusepithelzellen	0,3 ± 0,62	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,5 ± 0,98
Einzellzellapoptosen Tubulusepithel	0,0 ± 0,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,11
Neue Nephrone	1,2 ± 0,86	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,0 ± 0,79
Gesamtscore/Rumpfnieren	0,6 ± 0,87	-	-	-	-	-	-	0,7 ± 0,85
Milz								
Anzahl (n)	20	20	20	20	20	20	20	20
Stauung/Erythrozytenspeicherung	1,3 ± 0,58	2,3 ± 0,79	1,9 ± 0,75	2,0 ± 0,83	1,9 ± 0,64	2,1 ± 0,73	2,4 ± 0,93	1,4 ± 0,59
Melano-makrophagen	1,8 ± 0,42	2,5 ± 0,51	2,6 ± 0,50	2,3 ± 0,47	2,7 ± 0,49	2,4 ± 0,70	2,4 ± 0,60	1,6 ± 0,51
Gesamtscore/Milz	1,6 ± 0,33	2,4 ± 0,14	2,3 ± 0,49	2,2 ± 0,21	2,3 ± 0,57	2,3 ± 0,21	2,4 ± 0,00	1,5 ± 0,12

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD.

Fortsetzung Tabelle 75: Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	500 µg/L	1.000 µg/L
Leber								
Anzahl (n)	20	20	20	20	20	18	20	20
Akute diffuse Stauungshyperämie	0,3 ± 0,65	0,2 ± 0,29	0,2 ± 0,37	0,1 ± 0,24	0,1 ± 0,31	0,4 ± 0,70	0,3 ± 0,52	0,4 ± 0,50
Melano-makrophagen	0,5 ± 0,00	0,6 ± 0,28	0,5 ± 0,16	0,9 ± 0,52	0,8 ± 0,54	1,0 ± 0,66	0,9 ± 0,54	0,5 ± 0,00
Einzelzellapoptosen	0,0 ± 0,11	0,1 ± 0,22	0,2 ± 0,49	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,24	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
Herdförmige Infiltration mononukleärer Zellen (Parenchym)	0,3 ± 0,48	0,1 ± 0,45	0,1 ± 0,32	0,2 ± 0,62	0,3 ± 0,47	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,22	0,1 ± 0,32
Infiltration mononukleärer Zellen (perivaskulär)	0,1 ± 0,29	0,1 ± 0,22	0,1 ± 0,31	0,2 ± 0,37	0,2 ± 0,37	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
Infiltration mononukleärer Zellen (peribiliär)	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,22	0,2 ± 0,37	0,0 ± 0,00	0,1 ± 0,45	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
Gesamtscore/Leber	0,2 ± 0,20	0,2 ± 0,20	0,2 ± 0,15	0,2 ± 0,34	0,3 ± 0,29	0,3 ± 0,40	0,2 ± 0,35	0,2 ± 0,23
Leber/Speicherung von Glykogen und Fett								
Intrazytoplasmatische Vakuolisierung (Gesamt)	2,1 ± 0,94	1,7 ± 0,92	2,0 ± 1,19	1,9 ± 0,98	2,4 ± 1,09	2,2 ± 1,08	2,1 ± 1,05	2,3 ± 1,23
Anzahl (n)	10	10	10	10	10	10	10	10
Intrazytoplasmatische Vakuolisierung M	2,4 ± 0,90	1,7 ± 0,95	2,4 ± 1,25	1,9 ± 1,10	2,8 ± 1,14	2,4 ± 1,15	2,1 ± 1,26	2,9 ± 1,30
Anzahl (n)	10	10	10	10	10	8	10	10
Intrazytoplasmatische Vakuolisierung W	1,7 ± 0,82	1,7 ± 0,95	1,6 ± 1,05	2,0 ± 0,90	1,9 ± 0,88	1,9 ± 0,99	2,2 ± 0,87	1,6 ± 1,09
Herz								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Infiltration mononukleärer Zellen im Epikard	0,4 ± 0,50	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,3 ± 0,38
Gesamtscore/Herz	0,4	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,3

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD.

Fortsetzung Tabelle 75: Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	500 µg/L	1.000 µg/L
Pankreas								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	19
Einzelzellapoptosen von exokrinen Pankreaszellen	0,0 ± 0,11	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,00
Infiltration mononukleärer Zellen	0,0 ± 0,11	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,00
Gesamtscore/ Pankreas	0,0 ± 0,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,00
Magen								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Einzelzellnekrose/ Apoptosen in der Lamina epithelialis mucosae	0,6 ± 0,22	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,5 ± 0,00
Einzelzellnekrose/ Apoptosen in der Magendrüsenzellen (fundic gland)	0,5 ± 0,15	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,5 ± 0,00
Gesamtscore/ Magen	0,6 ± 0,14	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,5 ± 0,00
Pylorusanhänge								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	19
Einzelzellnekrose/ Apoptosen in der Lamina epithelialis mucosae	0,8 ± 0,59	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,8 ± 0,25
Verkalkungsherde in Tela submucosa bzw. Tunica muscularis	0,0 ± 0,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,00
Gesamtscore/ Pylorusanhänge	0,4 ± 0,58	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,4 ± 0,57
Darm								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Einzelzellnekrose/ Apoptosen in der Lamina epithelialis mucosae	0,8 ± 0,46	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,6 ± 0,15
Entzündl. Infiltration (EGCs) in der Lamina propria	0,6 ± 0,31	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,5 ± 0,00
Gesamtscore/ Darm	0,7 ± 0,14	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,6 ± 0,07

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD.

Fortsetzung Tabelle 75: Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	500 µg/L	1.000 µg/L
Gehirn								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Hämorrhagie	0,0 ± 0,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,11
Infiltration mono-nukleärer Zellen in den Meningen	0,2 ± 0,40	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,2 ± 0,41
Gesamtscore/ Gehirn	0,1 ± 0,14	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,1 ± 0,14
Haut								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Intraepitheliale Infiltration mit Lymphozyten	0,0 ± 0,11	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,8 ± 0,26
Infiltration mit mononukleären Zellen	0,2 ± 0,36	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,1 ± 0,28
Gesamtscore/Haut	0,1 ± 0,14	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,5 ± 0,49
Muskulatur								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Ohne besonderen Befund	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	-
Gesamtscore/ Muskulatur	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	-
Schwimmblase								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Ohne besonderen Befund	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	-
Gesamtscore/ Schwimmblase	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	-

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD.

Fortsetzung Tabelle 75: Semiquantitative Beurteilung histologischer Befunde (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	390 µg/L	1.000 µg/L
Kieme								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Akute Hyperämie	0,4 ± 0,39	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,4 ± 0,70
Ödematisierung der Lamellen („epithel lifting“)	0,0 ± 0,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,00
Nekrose von Kiemenepithel	0,0 ± 0,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,00
Hyperplasie des Primärlamellen-epithels	0,4 ± 0,38	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,6 ± 0,35
Hyperplasie des Sekundärlamellen-epithels	0,6 ± 0,36	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,7 ± 0,30
Infiltration der Sekundärlamellen mit mononukleären Entzündungszellen	0,4 ± 0,24	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,5 ± 0,26
Verschmelzung von Sekundärlamellen	0,5 ± 0,60	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,7 ± 0,86
Keulenförmige Auftreibung der Sekundärlamellen	1,9 ± 0,81	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,3 ± 0,98
Teleangiektasie	0,1 ± 0,24	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,2 ± 0,29
Chloridzell-schwellung	0,4 ± 0,24	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,3 ± 0,30
Proliferation von Mukuszellen	0,0 ± 0,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0 ± 0,00
Gesamtscore/ Kieme	0,4 ± 0,51	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,4 ± 0,40

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD. n. d.: nicht durchgeführt.

Tabelle 76: Semiquantitative Auswertung der Leber (Karmin nach Best) (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	500 µg/L	1.000 µg/L
Leber								
Anzahl (n)	6	0	0	0	0	0	0	6
Glykogen-speicherung ((Gesamt))	3,2 ± 0,75	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	2,8 ± 0,41
Anzahl (n)	3	0	0	0	0	0	0	3
Glykogen-speicherung (M)	3,3 ± 0,58	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	3,0 ± 0,00
Glykogen-speicherung (W)	3,0 ± 1,00	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	2,7 ± 0,58

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD.

Tabelle 77: Reifegrade der Gonaden (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Befunde	Kontrolle	0,1 µg/L	1 µg/L	10 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	500 µg/L	1.000 µg/L
Ovarien								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Reifegrad nach Billard (1992)	4,2 ± 0,53	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	4,2 ± 0,47
Hoden (Gesamt)								
Anzahl (n)	20	0	0	0	0	0	0	20
Reifegrad nach Billard (1992)	5,0 ± 2,26	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	5,3 ± 2,35
Hoden (pubertär)								
Anzahl (n)	15	18	14	15	18	17	18	16
Reifegrad nach Billard (1992)	6,1 ± 0,98	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	6,4 ± 0,86
Hoden (präpubertär)								
Anzahl (n)	5	2	6	5	2	3	2	4
Reifegrad nach Billard (1992)	1,6 ± 1,34	2,5 ± 2,12	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD.

Tabelle 78: Validität der Berechnung der Schätzzolumina (V_V) der Hodenzelltypen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Parameter	Spermatogonien ($n_{\text{Gesamt}} = 121$)	Spermatozyten ($n_{\text{Gesamt}} = 131$)	Spermatiden ($n_{\text{Gesamt}} = 131$)	Spermien ($n_{\text{Gesamt}} = 131$)	Sonstiges ($n_{\text{Gesamt}} = 131$)
Konfidenzintervall $\pm 10\%$ + Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %	7 % ($n = 8$)	100 % ($n = 131$)	99 % ($n = 130$)	94 % ($n = 123$)	82 % ($n = 107$)
Konfidenzintervall $\pm 20\%$ + Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %	64 % ($n = 78$)	100 % ($n = 131$)	100 % ($n = 131$)	99 % ($n = 130$)	98 % ($n = 128$)

n_{Gesamt} = Gesamtanzahl der Versuchsfische bei denen der entsprechende Nierenzelltyp nachgewiesen wurde.

Tabelle 79: Schätzzolumina (V_V) verschiedener Hodenzelltypen bei subadulten, pubertären Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositionskonzentration (Metformin-HCL)	Spermatogonien	Spermatozyten	Spermatiden	Spermien	Sonstiges
Kontrolle	0,005 $\pm$ 0,00	0,521 $\pm$ 0,09	0,354 $\pm$ 0,05	0,086 $\pm$ 0,06	0,035 $\pm$ 0,02
0,1 $\mu\text{g/L}$	0,003 $\pm$ 0,01	0,547 $\pm$ 0,08	0,316 $\pm$ 0,04	0,108 $\pm$ 0,06	0,025 $\pm$ 0,01
1 $\mu\text{g/L}$	0,004 $\pm$ 0,00	0,507 $\pm$ 0,09	0,316 $\pm$ 0,05	0,147 $\pm$ 0,08	0,026 $\pm$ 0,01
10 $\mu\text{g/L}$	0,006 $\pm$ 0,01	0,591 $\pm$ 0,10	0,268 $\pm$ 0,04^a	0,105 $\pm$ 0,09	0,031 $\pm$ 0,01
50 $\mu\text{g/L}$	0,004 $\pm$ 0,00	0,538 $\pm$ 0,12	0,317 $\pm$ 0,08	0,111 $\pm$ 0,06	0,029 $\pm$ 0,01
100 $\mu\text{g/L}$	0,005 $\pm$ 0,01	0,519 $\pm$ 0,07	0,323 $\pm$ 0,04	0,128 $\pm$ 0,07	0,025 $\pm$ 0,01
500 $\mu\text{g/L}$	0,002 $\pm$ 0,00	0,505 $\pm$ 0,10	0,305 $\pm$ 0,05	0,161 $\pm$ 0,09	0,027 $\pm$ 0,01
1.000 $\mu\text{g/L}$	0,004 $\pm$ 0,00	0,525 $\pm$ 0,07	0,315 $\pm$ 0,06	0,119 $\pm$ 0,06	0,037 $\pm$ 0,02
Mittelwert	0,004 $\pm$ 0,00	0,531 $\pm$ 0,09	0,314 $\pm$ 0,06	0,121 $\pm$ 0,07	0,029 $\pm$ 0,01

Daten: Mittelwert beider Replikate $\pm$ SD. Pubertäre Männchen: $n = 131$; ^asignifikant zur Kontrolle: $p = 0,001$.

Tabelle 80: Absolutvolumina (V) verschiedener Hodenzelltypen bei subadulten, pubertären Regenbogenforellen (Teilversuch Nr. 2, Metformin)

Expositionskonzentration (Metformin-HCL)	Spermatogonien	Spermatozyten	Spermatiden	Spermien	Sonstiges
Kontrolle	97 ± 63	11.698 ± 2.481	8.015 ± 2.316	2.064 ± 1.727	814 ± 551
0,1 µg/L	69 ± 110	11.630 ± 2.497	6.719 ± 1.487	2.353 ± 1.411	532 ± 209
1 µg/L	68 ± 64	11.176 ± 2.898	7.048 ± 2.335	3.577 ± 2.386	548 ± 104
10 µg/L	94 ± 83	11.905 ± 3.049	5.736 ± 2.268	2.576 ± 2.672	604 ± 229
50 µg/L	82 ± 64	11.836 ± 3.436	7.547 ± 3.474	2.873 ± 2.177	673 ± 276
100 µg/L	79 ± 81	11.013 ± 2.996	6.913 ± 1.946	2.996 ± 1.917	530 ± 250
500 µg/L	52 ± 38	11.635 ± 3.047	7.178 ± 2.064	3.848 ± 2.304	605 ± 158
1.000 µg/L	85 ± 59	11.780 ± 2.905	7.120 ± 1.764	2.916 ± 1.922	790 ± 235
Mittelwert	78 ± 68	11.588 ± 2.871	7.041 ± 2.299	2.905 ± 2.103	635 ± 289

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD. Pubertäre Männchen: $n = 131$; Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Expositionsgruppen festgestellt.

B.7 Tabellarische Ergebnisse Teilversuch Nr. 3 (Metformin)

Tabelle 81: Wasserparameter in den Versuchsaquarien (Teilversuch Nr. 3, Metformin)

Versuchsaquarium (Metformin-HCL)	Gelöster Sauerstoff (in mg/L)	Wassertemperatur (in °C)
Replikat A		
Kontrolle, Replikat A	10,01 ± 0,12	11,43 ± 0,23
0,1 µg/L, Replikat A	10,01 ± 0,12	11,43 ± 0,24
1 µg/L, Replikat A	10,21 ± 0,37	11,40 ± 0,31
10 µg/L, Replikat A	10,27 ± 0,44	11,42 ± 0,35
50 µg/L, Replikat A	10,23 ± 0,15	11,30 ± 0,34
100 µg/L, Replikat A	10,20 ± 0,12	11,40 ± 0,23
390 µg/L, Replikat A	10,27 ± 0,33	11,40 ± 0,30
1.000 µg/L, Replikat A	10,19 ± 0,13	11,42 ± 0,23
Replikat B		
Kontrolle, Replikat B	10,16 ± 0,12	11,38 ± 0,23
0,1 µg/L, Replikat B	10,18 ± 0,30	11,40 ± 0,32
1 µg/L, Replikat B	10,12 ± 0,13	11,40 ± 0,25
10 µg/L, Replikat B	10,17 ± 0,42	11,42 ± 0,33
50 µg/L, Replikat B	10,20 ± 0,13	11,42 ± 0,24
100 µg/L, Replikat B	10,13 ± 0,12	11,41 ± 0,23
390 µg/L, Replikat B	10,10 ± 0,13	11,32 ± 0,34
1.000 µg/L, Replikat B	10,22 ± 0,13	11,32 ± 0,30
Mittelwert (beide Replikate)	10,17 ± 0,25	11,39 ± 0,32

Daten: Mittelwert pro Versuchsaquarium über die gesamte Versuchslaufzeit ± SD. Die Messung von Wassertemperatur und Sauerstoffkonzentration erfolgte kontinuierlich.

Tabelle 82: Verabreichte Gesamtfuttermengen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Replikat A	Replikat B
	Verabreichte Gesamtfuttermenge pro Aquarium (in g)	Verabreichte Gesamtfuttermenge pro Aquarium (in g)
Kontrolle	210,13	212,40
0,1 µg/L	211,31	213,71
1 µg/L	209,78	208,80
10 µg/L	211,99	209,95
50 µg/L	213,23	208,67
100 µg/L	212,04	208,33
500 µg/L	211,67	213,11
1.000 µg/L	211,58	210,09
Mittelwert (Gesamt)	211,05 ± 1,70	

Daten: Mittelwerte ± SD.

Tabelle 83: Körpergewichte und Gesamtlängen (Teilversuch Nr. 3, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Körpergewicht (M) (in g)	Körpergewicht (W) (in g)	Gesamtlänge (M) (in cm)	Gesamtlänge (W) (in cm)
Kontrolle	3,63 ± 1,03	3,59 ± 0,99	7,06 ± 0,67	7,05 ± 0,71
0,1 µg/L	3,61 ± 1,02	3,63 ± 0,89	7,09 ± 0,63	7,14 ± 0,58
1 µg/L	3,48 ± 0,96	3,59 ± 0,86	7,01 ± 0,65	7,07 ± 0,57
10 µg/L	3,62 ± 1,00	3,45 ± 0,80	7,11 ± 0,65	7,05 ± 0,54
50 µg/L	3,54 ± 0,89	3,54 ± 1,02	7,06 ± 0,62	7,08 ± 0,65
100 µg/L	3,50 ± 0,90	3,68 ± 0,93	7,02 ± 0,63	7,12 ± 0,60
500 µg/L	3,51 ± 0,88	3,62 ± 0,85	7,01 ± 0,58	7,09 ± 0,55
1.000 µg/L	3,52 ± 0,99	3,58 ± 0,92	6,96 ± 0,95	6,99 ± 0,65
Mittelwert	3,55 ± 0,97	3,59 ± 0,92	7,05 ± 0,68	7,08 ± 0,60
Mittelwert M und W	3,57 ± 0,94		7,06 ± 0,64	

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD. M: Männchen; W: Weibchen.

Tabelle 84: Korpulenzfaktoren (Teilversuch Nr. 3, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Korpulenzfaktor (M)	Korpulenzfaktor (W)	Korpulenzfaktor (Gesamt)
Kontrolle	1,00 ± 0,07	0,99 ± 0,06	1,00 ± 0,07
0,1 µg/L	0,99 ± 0,07	0,98 ± 0,07	0,98 ± 0,07
1 µg/L	0,98 ± 0,06	0,99 ± 0,06	0,99 ± 0,06
10 µg/L	0,98 ± 0,06	0,97 ± 0,07	0,98 ± 0,06
50 µg/L	0,99 ± 0,06	0,97 ± 0,05	0,98 ± 0,06
100 µg/L	0,99 ± 0,08	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,07
500 µg/L	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,06
1.000 µg/L	1,00 ± 0,08	1,00 ± 0,09	1,00 ± 0,09
Mittelwert	0,99 ± 0,07	0,99 ± 0,07	0,99 ± 0,07

Daten: Mittelwert beider Replikate ± SD. M: Männchen; W: Weibchen.

Tabelle 85: Gesamtanzahl Tiere auswertbar für Histologie (Teilversuch Nr. 3, Metformin)

Expositions-konzentration (Metformin-HCL)	Verluste pro Expositionskonzentration (Fischanzahl)	Verluste nach Prozessierung (Fischanzahl)	Gesamtanzahl auswertbare Tiere Histologie
Kontrolle	2	3	195
0,1 µg/L	1	4	195
1 µg/L	1	3	196
10 µg/L	0	7	193
50 µg/L	3	4	193
100 µg/L	3	7	190
500 µg/L	0	7	193
1.000 µg/L	2	3	195
Gesamtanzahl	12	38	1.550

$n_{\text{Gesamt}} = 1.550$.