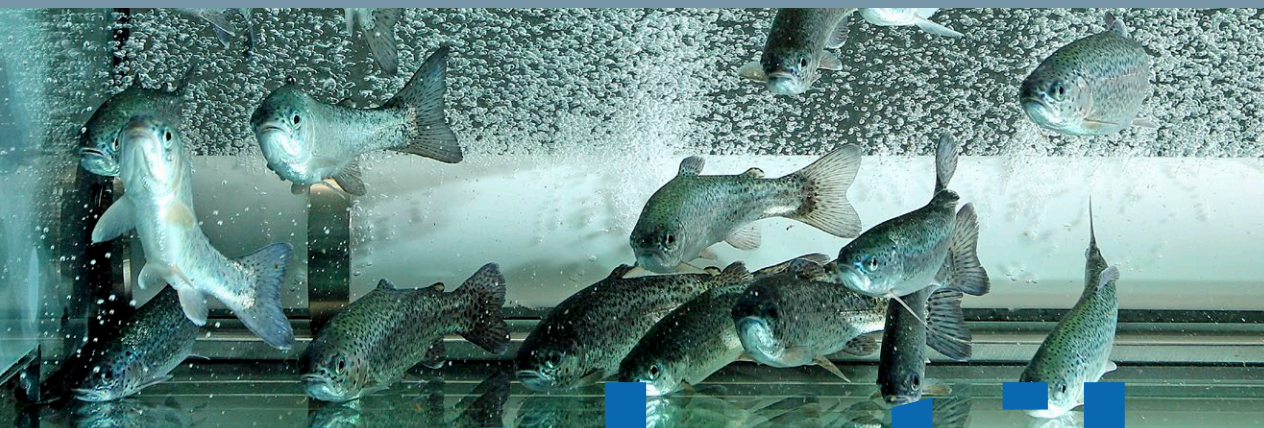




Untersuchungen zu Auswirkungen von Mikroplastik auf Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) Beispiel Polyvinylchlorid (PVC)



analytik



Untersuchungen zu Auswirkungen von Mikroplastik auf Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)

Beispiel Polyvinylchlorid (PVC)

Impressum

Untersuchungen zu Auswirkungen von Mikroplastik auf Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*)

Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU)

Bürgermeister-Ulrich-Straße 160

86179 Augsburg

Tel.: 0821 9071-0

E-Mail: poststelle@lfu.bayern.de

Internet: www.lfu.bayern.de/

Konzept/Text:

LfU, Dr. Julia Schwaiger, Dr. Tobias Geiger, Hermann Ferling, Karin Scholz-Göppel

Redaktion:

LfU, Dr. Julia Schwaiger

Bildnachweis:

LfU, Abb. 1 - 15

Druck:

Vollständige Adresse der Druckerei

Gedruckt auf 100 % Recyclingpapier

Stand:

Dezember 2021

Diese Publikation wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbfern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Publikation nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Publikation zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die publizistische Verwertung der Veröffentlichung – auch von Teilen – wird jedoch ausdrücklich begrüßt. Bitte nehmen Sie Kontakt mit dem Herausgeber auf, der Sie – wenn möglich – mit digitalen Daten der Inhalte und bei der Beschaffung der Wiedergaberechte unterstützt.

Diese Publikation wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung. Unter Tel. 089 12 22 20 oder per E-Mail unter direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Untersuchungen zur Wirkung von PVC in Regenbogenforellen	9
2.1	Versuchsdesign	9
2.2	Herstellung und Eigenschaften der PVC-Testpartikel	11
2.2.1	Größenverteilung	11
2.2.2	Partikelform	11
2.2.3	Chemische Zusammensetzung	12
2.3	Untersuchung der Versuchsfische	14
2.3.1	Pathologische Untersuchungen	15
2.3.2	Hämatologische Untersuchungen	15
2.3.3	Klinisch-chemische Blutuntersuchungen	15
2.3.4	Biomarkeranalysen	16
2.3.5	DINP-Rückstandsanalytik in Fischgewebe	16
2.3.6	Statistische Datenauswertung	16
3	Ergebnisse	16
3.1	Körpergewicht	16
3.2	Pathologische Untersuchungen	17
3.2.1	Pathologisch-anatomische Untersuchung	17
3.2.2	Pathologisch-histologische Untersuchung	18
3.2.3	Glykogen	18
3.3	Hämatologie	19
3.4	Klinische-Chemie	19
3.5	Biomarker	19
3.6	Rückstandsanalytik	23
4	Diskussion	23
5	Zusammenfassung	27
7	Anhang	34

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Ökotoxikologische Versuchsanlage. In den 560-Liter-Testaquarien werden die Versuchs- und Kontrollfische im Durchfluss in Quellwasser gehalten.	10
Abb. 2:	Größenverteilung und Anzahl der Partikel pro Gramm Hart-PVC-Pulver	12
Abb. 3:	Größenverteilung und Anzahl der Partikel pro Gramm Weich-PVC-Pulver	13
Abb. 4:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PVC-Partikeln. Hart-PVC (links) und Weich-PVC (rechts)	13
Abb. 5:	Spektrogramm eines Hart-PVC-Partikels. Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O), Chlor (Cl)	14
Abb. 6:	Spektrogramm eines Weich-PVC-Partikels. Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O), Chlor (Cl), Calcium (Ca)	14
Abb. 7:	Histologische Präparate der Leber, Glykogengehalt der Hepatozyten. A: Grad 1 (kein Glykogen); B: Grad 2; C: Grad 3; D: Grad 4. Färbung mit Karminlösung nach Best. Maßstabsbalken: 100 µm	15
Abb. 8:	Körpergewicht bei männlichen Fischen, Gewichtszunahme. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); **: $p < 0,01$; statistisch signifikanter Unterschied zwischen Weich-PVC-exponierten und Kontrollfischen	17
Abb. 9:	Körpergewicht bei weiblichen Fischen, Gewichtszunahme. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); ***: $p < 0,001$; statistisch signifikanter Unterschied zwischen Weich-PVC-exponierten und Kontrollfischen; #: $p < 0,05$; statistisch signifikanter Unterschied zwischen Hart- und Weich-PVC-exponierten Fischen	17
Abb. 10:	Konzentration von 11-Keto-Testosteron im Blutplasma von männlichen und weiblichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen PVC-exponierten und Kontrolltieren.	20
Abb. 11:	Konzentration der Aromatase im Blutplasma von männlichen und weiblichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); ** $p < 0,01$ statistisch signifikanter Unterschied zwischen männlichen, Hart-PVC-exponierten und Kontrolltieren.	20
Abb. 12:	Konzentration von 17β -Estradiol im Blutplasma von männlichen und weiblichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen PVC-exponierten und Kontrolltieren.	21
Abb. 13:	Konzentration von Vitellogenin im Blutplasma von männlichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); * $p < 0,05$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen Weich-PVC-exponierten und Kontrolltieren.	21
Abb. 14:	Konzentration von Hsp70 im Blutplasma von männlichen und weiblichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen Hart-PVC-exponierten und Kontrolltieren: ## $p < 0,01$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen Hart- und Weich-PVC-exponierten Tieren.	22
Abb. 15:	Konzentration von Cytochrom P450 1A1 im Blutplasma von männlichen und weiblichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); *** $p < 0,001$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen Weich-PVC-exponierten und Kontrolltieren.	22

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Schweregrad der semiquantitativ ermittelten Veränderungen der kolumnaren Enterozyten im Enddarm-epithel männlicher und weiblicher Versuchs- und Kontrollfische (n = 64 Fische).	18
Tab. 2:	Semiquantitativ ermittelter Glykogengehalt in den Hepatozyten der Leber männlicher und weiblicher Versuchs- und Kontrollfische (n = 64 Fische)	18
Tab. 3:	Hämatologische Untersuchungsergebnisse bei PVC-exponierten und Kontrollfischen	34
Tab. 4:	Analysenergebnisse klinisch-chemischer Parameter bei PVC-exponierten und Kontrollfischen	35
Tab. 5:	Analysenergebnisse verschiedener Biomarker bei PVC-exponierten und Kontrollfischen	36

Vorwort

Die Verschmutzung der Weltmeere durch Kunststoffmüll ist seit langem bekannt. In den letzten Jahren erfährt auch das Thema „Mikroplastik“ in Binnengewässern zunehmende Aufmerksamkeit in Wissenschaft, Politik und in der Öffentlichkeit. Die bisherigen wissenschaftlichen Ergebnisse reichen nicht aus, um die vielen Fragestellungen rund um das Thema „Mikroplastik“ fundiert zu beantworten. Es fehlen insbesondere belastbare Daten, die eine Einschätzung der Gefährlichkeit von Mikroplastik für aquatische Lebewesen ermöglichen.

Das Bayerische Landesamt für Umwelt (LfU) führte von 2014 bis 2020 im Auftrag des Bayerischen Staatsministeriums für Umwelt und Verbraucherschutz (StMUV) das Fachvorhaben „Eintragspfade, Vorkommen und Verteilung von Mikroplastikpartikeln in bayerischen Gewässern sowie mögliche Auswirkungen auf aquatische Organismen“ durch.

In einer ersten Projektphase erfolgten in Kooperation mit der Universität Bayreuth exemplarische Untersuchungen zum Vorkommen von Mikroplastik in verschiedenen Gewässerkompartimenten bayerischer Flüsse und Seen. An allen Probestellen wurde Mikroplastik nachgewiesen.

Um eine Risikobewertung der in den Gewässern festgestellten Mikroplastikkonzentrationen durchzuführen, erfolgten in einer zweiten Projektphase ökotoxikologische Untersuchungen zur Erfassung potentieller, durch Mikroplastik hervorgerufener Schadwirkungen an Gewässerorganismen. Zwar belegen zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen, dass Kunststoffmüll in den Weltmeeren erhebliche Auswirkungen auf dort lebende Tiere haben kann. Zur Frage, in wieweit auch Mikroplastik in den Gewässern ein Risiko für aquatische Lebewesen darstellt, liegen bisher jedoch widersprüchliche Untersuchungsergebnisse vor.

Nachdem im April 2021 bereits in einem umfassenden Bericht die Untersuchungsergebnisse zu Vorkommen und Auswirkungen von Mikroplastik in einheimischen Süßwassermuscheln (*Unio sp.*) veröffentlicht wurden, folgt mit dem nun vorliegenden Abschlussbericht eine Zusammenfassung der an Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) ermittelten Studienergebnisse. Wie bereits in den Untersuchungen an Muscheln wurde auch in der aktuellen Studie an Fischen exemplarisch Polyvinylchlorid (PVC) als Testpolymer ausgewählt.

1 Einleitung

Kunststoffe sind aufgrund ihrer Materialeigenschaften und der dadurch bedingten, vielseitigen Einsetzbarkeit zu einem unverzichtbaren Bestandteil unseres täglichen Lebens geworden. Die Materialeigenschaften wie z. B. gute Formbarkeit, Bruchfestigkeit, Elastizität sowie eine vergleichsweise hohe chemische und thermische Beständigkeit werden durch die Zugabe von Additiven bei der Herstellung noch weiter an bestimmte Verwendungszwecke angepasst (Maier und Schiller 2016). Allerdings sind diese Eigenschaften auch dafür verantwortlich, dass Kunststoffe eine hohe Umweltpersistenz aufweisen.

Weltweit wurden allein im Jahr 2019 circa 368 Millionen Tonnen Plastik hergestellt. Davon wurden 50,7 Millionen Tonnen in Europa eingesetzt, wovon ein Viertel allein in Deutschland verbraucht wurde. Die Haupteinsatzgebiete dieser Kunststoffe sind Verpackungen (39,6 %) und die Bauindustrie (20,4 %). Mit Anteilen von je unter 10 % finden sie außerdem Verwendung in der Automobilindustrie, in Elektro- und Elektronikprodukten, im Agrarbereich und in Haushalts- und Freizeitprodukten. 16,7 % werden für andere Zwecke verwendet wie z. B. im Medizinbereich (PlasticsEurope 2020). Zu den Kunststoffen mit den europaweit höchsten Bedarfsmengen zählen Polyethylen (PE mit 29,8 % davon

17,4 % PE-LD/PE-LLD und 12,4 % PE-HD/PE-MD), Polypropylen (PP; 19,4 %) und Polyvinylchlorid (PVC; 10,0 %). Der Anteil von Polyurethan (PUR), Polyethylenterephthalat (PET) und Polystyrol (PS) am Gesamtbedarf liegt jeweils zwischen 6 % und 10 % (PlasticsEurope 2020). Entsprechend ihrer Herstellungs- und Verbrauchsmengen finden sich die Kunststoffsorten in der Regel auch in der Umwelt wieder (Wagner et al. 2014; Dris et al. 2018).

Die Verschmutzung der Weltmeere mit Mikroplastik ist seit langem bekannt (Carpenter et al. 1972) und vergleichsweise gut dokumentiert (Bergmann et al. 2015). Eine gezielte Untersuchung von Binnengewässern erfolgt jedoch erst seit einigen Jahren (Faure et al. 2012; Imhof et al. 2013; Besseling et al. 2015; Heß et al. 2018; Schwaiger 2019).

Aufgrund der aktuellen Datenlage ist davon auszugehen, dass Mikroplastik in allen Gewässerkompartimenten von Flüssen und Seen vorkommt. Die höchsten Konzentrationen von Mikroplastik wurden in der Regel in Ufer- und Grundsediment detektiert. Die maximale gemessene Konzentration in Ufersediment eines bayerischen Sees lag bei 129.375 Mikroplastikpartikeln/m² (Schwaiger 2019). In oberflächennahen Wasserproben ausgewählter bayerischer Flüsse wurden bis zu 151 Partikeln/m³ (Heß et al. 2018), in bayerischen Seen maximal 42 Partikeln/m³ (Schwaiger 2019) und damit deutlich geringere Partikelzahlen detektiert. In der Wassersäule von Seen wurden mit bis zu 44 Partikeln/m³ ähnliche Werte gemessen. Sowohl in Flüssen als auch in Seen stellte sehr kleines Mikroplastik (300 µm – 20 µm) die dominierende Größenfraktion dar (Heß et al. 2018; Schwaiger 2019). Der bei weitem überwiegende Anteil der Partikel lag in Form von Fragmenten vor. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Mehrzahl der Kunststoffpartikel um sekundäres Mikroplastik handelt, das durch den Zerfall größerer Plastikteile, wie zum Beispiel des unsachgemäß entsorgten Mülls entsteht. Primäres Mikroplastik, wie zum Beispiel Kunststoffbeads aus Körperpflegeprodukten, liefert keinen nennenswerten Beitrag zum Vorkommen von Mikroplastik in bayerischen Gewässern. Bei den am häufigsten nachgewiesenen Polymeren handelte es sich um PE und PP, gefolgt von PVC, PET/Polyester und PS (Heß et al. 2018; Schwaiger 2019). Andere Untersuchungen ergaben für Mikroplastik in Binnengewässern eine ähnliche Polymerzusammensetzung (Koelmans et al. 2019).

Unbestritten ist, dass eine Verschmutzung der Gewässer mit Makroplastik erhebliche Auswirkungen auf dort lebende Tiere wie z. B. Wasservögel, Meeressäuger oder Fische haben kann (van Franeker et al. 2011; Avery-Gomm et al. 2012; Werner et al. 2016). Neben akuten, letalen Auswirkungen, wie z. B. schwerwiegenden Verletzungen durch Verfangen in Plastikmüll oder mechanische Verlegung des Verdauungstraktes wurden auch subletale Veränderungen beobachtet. Diese umfassen unter anderem Einschränkungen der Beweglichkeit sowie der Futteraufnahme und -verdauung und können letztendlich zu einer Reduzierung der Fitness, der Reproduktion und der Mobilität führen.

Gegenwärtig findet in der Öffentlichkeit und den Medien eine Diskussion darüber statt, in wieweit auch Mikroplastik ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier darstellt. Zahlreiche wissenschaftliche Studien belegen, dass sowohl marine als auch Süßwasserorganismen Mikroplastik aufnehmen. Entsprechende Ergebnisse liegen insbesondere für Zooplankton (Cole et al. 2015; Ogonowski et al. 2016), benthische Invertebraten (Moos et al. 2012; Besseling et al. 2013) sowie Fische und Fischlarven (Lumesberger-Loisl und Gumpinger 2015; Mazurais et al. 2015; Rummel et al. 2016; Roch und Brinker 2017) vor. Ebenso wurde eine Anreicherung von Mikroplastik innerhalb der Nahrungskette beschrieben (Farrell und Nelson 2013; Setälä et al. 2014). Eigene Experimente ergaben, dass eine vierwöchige Exposition einheimischer Flussmuscheln (*Unio sp.*) in PVC-Partikeln zweier Größenklassen (kleiner 100 µm; durchschnittlich 17 µm) zu einer Aufnahme insbesondere der kleinen Partikel führte. Nach weiteren vier Wochen in PVC-freiem Quellwasser waren in den Muscheln nahezu keine PVC-Partikel mehr nachweisbar (Fischer et al. 2021).

Für eine Risikobewertung von Mikroplastik ist jedoch entscheidend, ob dessen Aufnahme tatsächlich direkte, negative Auswirkungen auf Gewässerorganismen zur Folge hat oder ob oral aufgenommene Partikel nach erfolgter Darmassage wieder ausgeschieden werden (Thompson et al. 2004). Neben mechanischen Schäden im Zuge der Aufnahme bzw. Ausscheidung von Mikroplastikpartikeln ist auch eine Translokation in Zellen und Gewebe nicht auszuschließen. In einer experimentellen Studie an Muscheln wurde gezeigt, dass Mikroplastikpartikel in die Zirkulation und damit in Organe gelangen und dort pathologische Veränderungen hervorrufen können (Browne et al. 2008; Moos et al. 2012). Daneben werden indirekte Wirkungen von Mikroplastik beschrieben, die darauf beruhen, dass die Kunststoffpartikel als Vektoren für chemische Additive und Adsorptive sowie Mikroorganismen fungieren können (Teuten et al. 2009; Lithner 2011; Rochman et al. 2013; Umweltbundesamt 2016). So werden Kunststoffe bei der Herstellung häufig mit Zusatzstoffen versetzt, um ihnen besondere Eigenschaften zu verleihen (Teuten et al. 2009). Einige dieser Additive können toxische oder hormonähnliche Wirkungen entfalten (Sonnenschein und Soto 1998; Talsness et al. 2009; Lithner 2011). Darüber hinaus kann eine Aufnahme von an der Oberfläche von Mikroplastik gebundenen, organischen Substanzen zu einer erhöhten Schadstoffbelastung sowie toxischen Effekten bei aquatischen Lebewesen führen (Teuten et al. 2009; Besseling et al. 2013; Rochman et al. 2013).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl sowohl experimenteller als auch Feldstudien zur Aufnahme von Mikroplastik und möglichen Auswirkungen auf Gewässerorganismen unterschiedlicher Trophieebenen veröffentlicht. Am häufigsten wurden dabei Fische untersucht (de Sá et al. 2018). Den Autoren zufolge kommt jedoch den meisten Studien keine Umweltrelevanz zu. Dies wird u. a. damit begründet, dass in vielen Laborexperimenten Polymere untersucht werden, die in der Umwelt nur von untergeordneter Bedeutung sind.

Vorliegender Bericht widmet sich der Untersuchung möglicher Auswirkungen von Polyvinylchlorid (PVC) auf den Gesundheitszustand von Regenbogenforellen. PVC wurde ausgewählt, da es neben Polyethylen (PE) und Polypropylen (PP) einen der am häufigsten produzierten und eingesetzten Kunststoffe darstellt (Allsopp und Vianello 2000; Nicholson 2006; Koltzenburg et al. 2014; Espinosa et al. 2017; PlasticsEurope 2020). Zudem stellt PVC ein häufig in Gewässern nachgewiesenes Polymer dar (Heß et al. 2018; Schwaiger 2019). PVC ist farblos, kaum stabil gegenüber Hitze und Licht und somit eines der instabilsten Polymere aus der umfangreichen Anzahl der kommerziell erhältlichen Polymerkunststoffe. Diese Instabilität ist darin begründet, dass PVC dazu tendiert bei Erwärmung HCl abzuspalten und Polyene zu bilden. Um PVC vielseitig einsetzen zu können, ist deshalb der Zusatz von Stabilisatoren (Nicholson 2006; Koltzenburg et al. 2014) und Additiven notwendig. In vorliegender Studie wurde zum einen Hart-PVC, zum anderen Weich-PVC, dem als Additiv der Weichmacher Diisononylphthalat (DINP) zugesetzt war, als Testpolymere eingesetzt.

2 Untersuchungen zur Wirkung von PVC in Regenbogenforellen

2.1 Versuchsdesign

Fische sind in ihrer natürlichen Umgebung einer Vielzahl biologischer, physikalischer und chemischer Faktoren ausgesetzt, die Einfluss auf ihren Gesundheitszustand haben können. Um diese Faktoren auszuschließen und etwaige Effekte auf die PVC-Exposition zurückführen zu können, erfolgte die Exposition unter standardisierten Laborbedingungen in der ökotoxikologischen Versuchsanlage des Bayerischen Landesamts für Umwelt in Wielenbach (Abb. 1). Diese Anlage ist so konstruiert, dass eine Kontamination der Versuchstiere mit PVC über die Wasserphase nahezu ausgeschlossen werden

kann. Sämtliche Regelungseinrichtungen, Pumpen und Aufbereitungsanlagen und die meisten Rohrleitungen sind aus PVC-freien Materialien hergestellt.



Abb. 1: Ökotoxikologische Versuchsanlage. In den 560-Liter-Testaquarien werden die Versuchs- und Kontrollfische im Durchfluss in Quellwasser gehalten.

Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde von der zuständigen Behörde erteilt (GZ: 55.2-1-54-2532-149-2014). Als Versuchsfische wurden 2,5 Jahre alte Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von $980,4 \pm 133,5$ g und einer durchschnittlichen Körperlänge von $43,6 \pm 2,4$ cm eingesetzt. Der Versuchszeitraum betrug 56 Tage. Die Haltung der Fische erfolgte im Durchfluss (Durchflussrate 100 L/h) in 560 Liter fassenden Aquarien, die mit Quellwasser gespeist wurden. Das Quellwasser wurde vor Eintritt in die Versuchsanlage über eine Lochblech-Kaskade geleitet, um Kohlendioxid auszutreiben und gleichzeitig Sauerstoff anzureichern. Während des gesamten Versuchs erfolgte eine kontinuierliche Überprüfung der chemisch-physikalischen Wasserparameter Temperatur, Sauerstoff, Leitfähigkeit sowie pH-Wert (IQ Sensor Net System 2020, WTW). Das Zulaufwasser (Quellwasser) wies im Mittel eine Leitfähigkeit von $190 \mu\text{S}/\text{cm}$, einen pH-Wert von 7,1 sowie eine Wassertemperatur von $11,86 \text{ }^\circ\text{C}$ auf. In den Testaquarien wurde eine durchschnittliche Wassertemperatur von $12,41 \pm 0,26 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie eine Sauerstoffkonzentration von $9,49 \pm 0,24 \text{ mg O}_2/\text{L}$ gemessen. Eine über den Aquarien angebrachte Lichtanlage simulierte einen 12-Stunden-Tag mit einer je 30-minütigen Dämmerungsphase morgens und abends.

Die PVC-Exposition erfolgte oral über das Futter. Je 20 Fische (10 männlich, 10 weiblich) wurden nach Geschlechtern getrennt in den Testaquarien gehalten und entweder mit Hart- oder Weich-PVC-versetzter Nahrung gefüttert. Die Fütterung erfolgte jeden zweiten Tag wobei die Futtermenge 1 % des Körpergewichts entsprach. Der Anteil von PVC im Futter betrug 10 %. Auf diese Weise erhielten

die Fische der Hart-PVC-Gruppe während der gesamten Versuchsphase jeden zweiten Tag etwa 68 Millionen PVC-Partikel pro Fisch. In der Weich-PVC-Gruppe betrug die jeden zweiten Tag oral applizierte Menge ca. rund 192 Millionen PVC-Partikel pro Fisch. Das verwendete Weich-PVC enthielt als Additiv mit einem Anteil von 30 % DINP (Diisononylphthalat), einen in PVC häufig verarbeiteten Weichmacher (Saykali 2010; Bundesinstitut für Risikobewertung und Umweltbundesamt 2013). Weitere 40 Fische (20 männlich, 20 weiblich) wurden ohne Zufuhr von PVC unter ansonsten identischen Bedingungen als Kontrollen gehalten. Der gewählte PVC-Gehalt des Futters lag deutlich über den in der Wasserphase von Fließgewässern und Seen nachgewiesenen Konzentrationen, da es in vorliegender Pilotstudie zunächst darum ging, generell schädliche Wirkungen von PVC und die zugrundeliegenden Wirkmechanismen zu ermitteln.

Während der gesamten Versuchsphase wurden neben der Futteraufnahme auch das Verhalten, die Atemfrequenz sowie das Vorhandensein klinischer Symptome bei den Fischen beobachtet und protokolliert.

2.2 Herstellung und Eigenschaften der PVC-Testpartikel

Für den 56-tägigen Expositionsversuch wurde jeweils ca. 1 kg Hart- und Weich-PVC-Partikel hergestellt. Als Ausgangsmaterial diente kommerziell gefertigtes Hart-PVC-Pulver (≤ 1 mm, Fa. Roth), sowie eine ca. 40 cm x 80 cm x 1,5 mm, mit 30 % DINP versetzte Weich-PVC-Matte, welche von der Universität Bayreuth (Lehrstuhl für Tierökologie I) zur Verfügung gestellt wurde.

Sowohl aus Hart- als auch aus Weich-PVC wurden Partikel fünf verschiedener Größenklassen (< 32 μm , 33 μm –63 μm , 64 μm –125 μm , 126 μm –250 μm , 251 μm –500 μm) hergestellt, zu gleichen Gewichtsanteilen vermischt und homogen in kommerzielles Fischfutter (Perla Larva Proactive 4.0, Chargen-Nr. 2008121, Fa. Skretting) eingearbeitet.

Zur Charakterisierung des eingesetzten Hart- und Weich-PVC-Pulvers bezüglich ihrer Größenverteilung, Form, Oberfläche und chemischen Zusammensetzung kamen unterschiedliche Analysen zum Einsatz.

2.2.1 Größenverteilung

Die Bestimmung des Anteils der verschiedenen Partikelgrößen in der Testmischung erfolgte mittels SPOS (Single Particle Optical Sensing = Lichtblockade) durch die Fa. BS-Partikel GmbH. Die Analyse von Hart-PVC-Pulver (Abb. 2) ergab insgesamt 69 Millionen Partikel/Gramm im Messbereich von 1 μm bis 545 μm . Dabei wiesen 95 % der Partikel eine Größe von kleiner 50 μm auf. Am häufigsten waren Partikel mit einem Durchmesser von 4 μm vertreten (4,6 Millionen Partikel/Gramm). In Weich-PVC-Pulver (Abb. 3) waren insgesamt 198 Millionen Partikel/Gramm enthalten. Auch hier lag die Größe bei 95 % der Partikel unter 50 μm . Die meisten Partikel (20 Millionen/Gramm) hatten einen Durchmesser von 2 μm .

2.2.2 Partikelform

Eine dreidimensionale Darstellung der Partikelformen erfolgte anhand von Rasterelektronenmikroskopie (S4000 SEM, Fa. Hitachi; Phenom ProX (G3) mit integrierter EDX-Analyse, Fa. Phenom-World).

Das Hart PVC-Pulver bestand überwiegend aus rundlichen Partikeln, wobei deren Anteil mit steigender Partikelgröße abnahm. Auf der Oberfläche der Hart-PVC-Partikel waren kugelförmige Ausbrüche (Schalenbruch) erkennbar. Die Weich-PVC-Partikel wiesen im Vergleich zu den Hart-PVC-Partikeln eine kantigere Form auf (Abb. 4).

2.2.3 Chemische Zusammensetzung

Die chemische Zusammensetzung der PVC-Pulver wurde mit Hilfe von EDX (Energiedispersive Röntgenspektroskopie)-gekoppelter REM (Phenom ProX (G3), Phenom-World) untersucht. Es wurden die partikeltypischen Elemente Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O) sowie Chlor (Cl) nachgewiesen (Abb. 5). In den Weich-PVC-Partikeln wurde zusätzlich Calcium detektiert, welches durch den Einsatz Calciumhaltiger Stabilisatoren bei der Herstellung enthalten war (Abb. 6).

Zudem wurde eine Analyse der Weich-PVC-Partikel auf den Gehalt des enthaltenen Weichmachers DINP durchgeführt. Gemessen wurde mit einem isotoopenmarkierten internen Standard mittels GC-MS/MS-Gerät (Fa. ThermoFisher Scientific). Die Analysen bestätigten einen DINP-Gehalt von 30 % in den Partikeln.

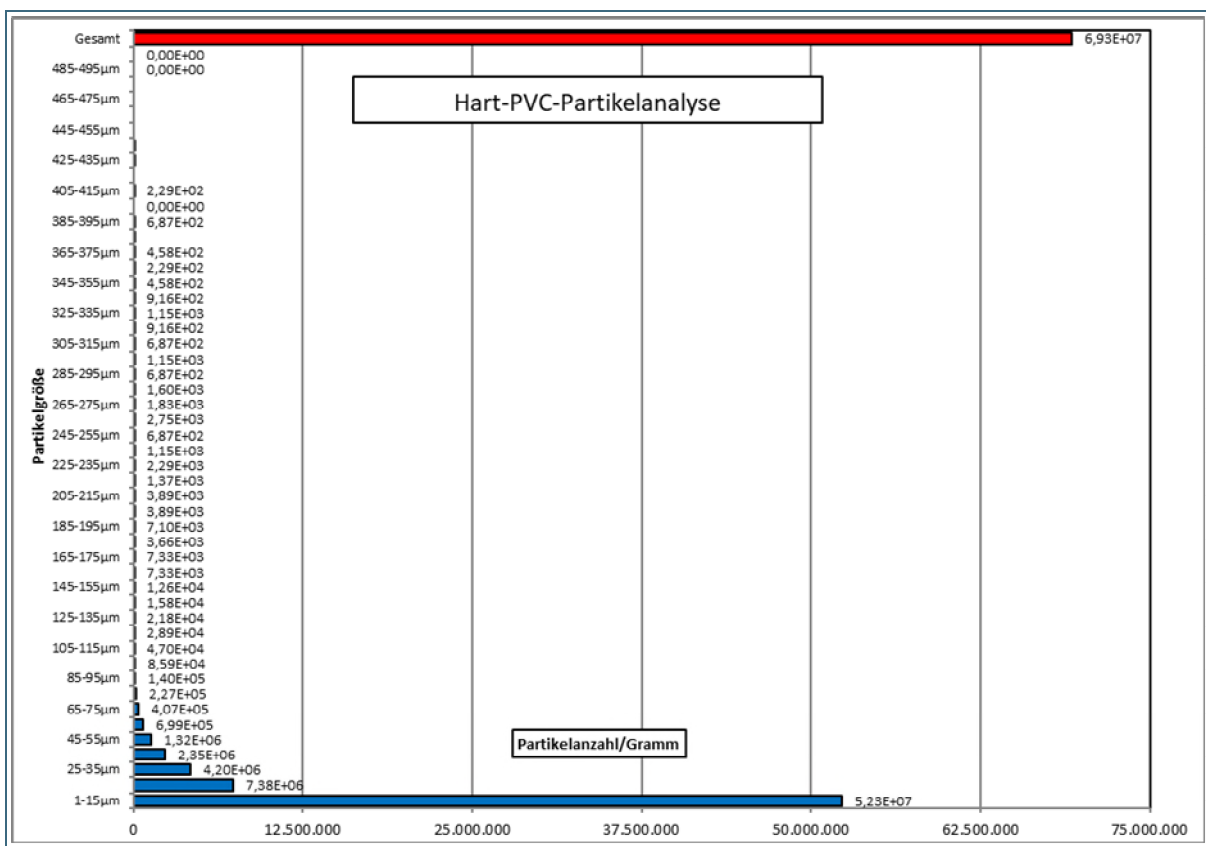


Abb. 2: Größenverteilung und Anzahl der Partikel pro Gramm Hart-PVC-Pulver

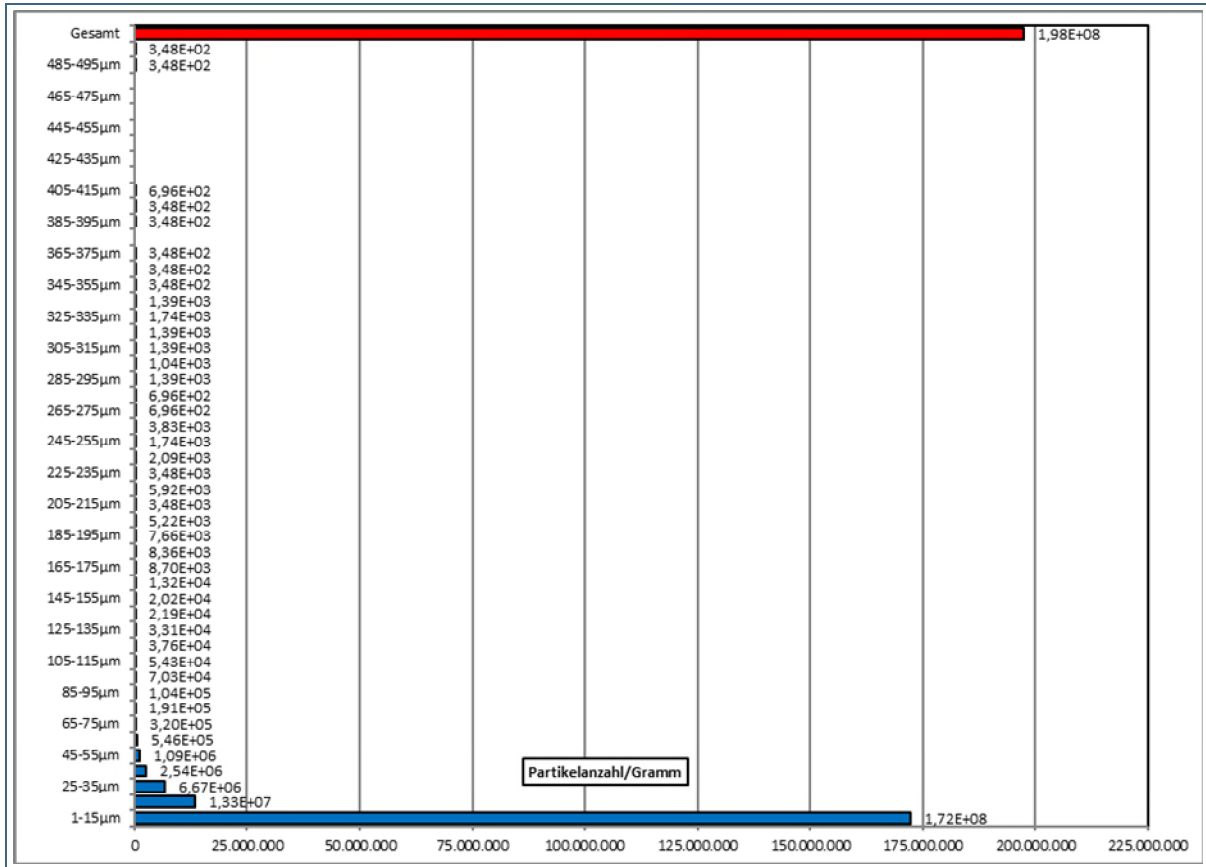


Abb. 3: Größenverteilung und Anzahl der Partikel pro Gramm Weich-PVC-Pulver

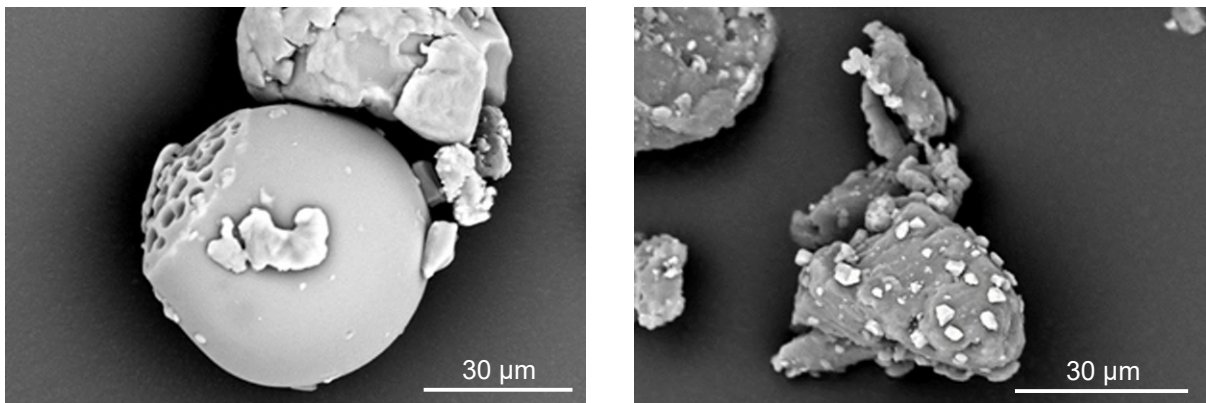


Abb. 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PVC-Partikeln. Hart-PVC (links) und Weich-PVC (rechts)

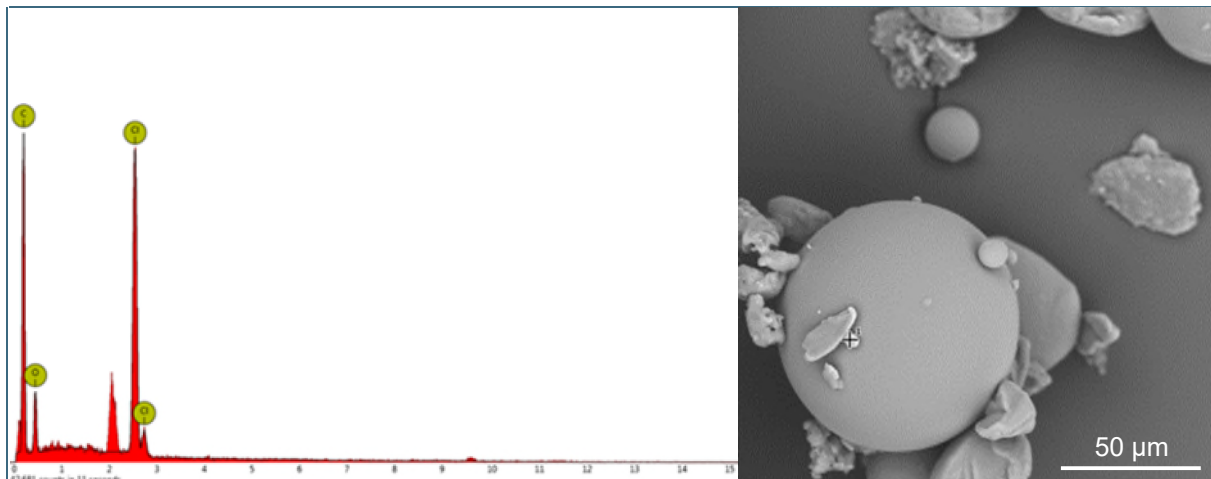


Abb. 5: Spektrogramm eines Hart-PVC-Partikels. Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O), Chlor (Cl)

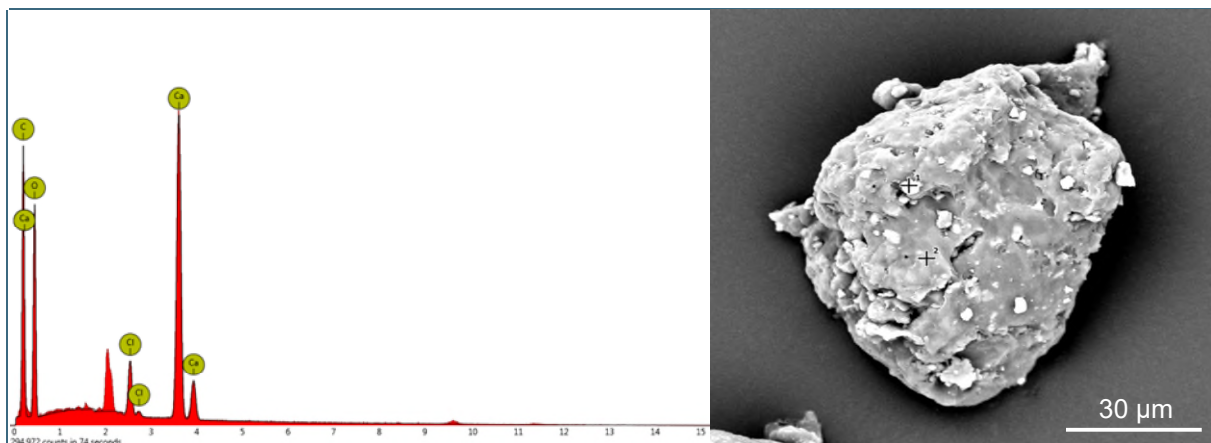


Abb. 6: Spektrogramm eines Weich-PVC-Partikels. Kohlenstoff (C), Sauerstoff (O), Chlor (Cl), Calcium (Ca)

2.3 Untersuchung der Versuchsfische

Vor Beginn des Tierversuches erfolgte eine stichprobenartige Untersuchung des Gesundheitszustandes von Tieren aus dem Pool der zukünftigen Versuchsfische. Zwei Wochen vor Versuchsbeginn wurden 80 Individuen unter Narkose (MS-222, Tricain-Methansulfonat, Fa. Pharmaq, UK; Dosierung: 100 mg/l Wasser) für die Versuche ausgewählt, vermessen, gewogen und zur Wiedererkennung mit Transpondern versehen (Dechra Alvet Mini ISO-Transponder in Kanüle, Fa. Albrecht LOT A2585-0458).

Die Versuchsfische wurden während des gesamten Expositionszeitraumes täglich einer 30-minütigen Beobachtung im Hinblick auf Futteraufnahme, Verhalten sowie Auftreten klinischer Symptome unterzogen.

Im Anschluss an die 56-tägige Versuchsphase wurden die Fische gruppenweise, nach Geschlechtern getrennt wiederum mit MS-222 narkotisiert, vermessen und gewogen (Tischwaage 7292, Digitalanzeige 2790, Fa. Soehnle Professional). Die Zuordnung erfolgte über das Auslesen des Transponders

(ARE H5 Handlesegerät, Fa. AEG Identifikationssysteme GmbH & Co.) an der linken Flanke des Fisches. Anschließend wurde jedem Fisch Blut für hämatologische, biochemische sowie Biomarkeranalysen entnommen. Im direkten Anschluss an die Blutentnahme wurde der Fisch mittels Genickschnitt getötet (Amlacher 1992).

2.3.1 Pathologische Untersuchungen

Zunächst erfolgte eine Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustandes. Dokumentiert wurden der Ernährungszustand sowie äußere, pathologische Veränderungen. Zusätzlich wurde eine parasitologische Untersuchung von Haut- und Kiemenabstrichen durchgeführt. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden die inneren Organe begutachtet.

Von insgesamt je 16 Hart- bzw. Weich-PVC-exponierten Fischen sowie 32 Kontrolltieren wurden Gewebeproben von Kiemen, Haut und Muskulatur, Leber, Milz, Magen, Pylorusanhängen, Mittel- und Enddarm, Schwimmblase, Gonaden, Rumpf- und Kopfnieren sowie Herz für histopathologische Untersuchungen asserviert und anschließend zur Herstellung von mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnittpräparaten histotechnisch aufgearbeitet.

Die histologischen Untersuchungen umfassten auch eine Beurteilung des Glykogengehaltes der Leber an mit Karminlösung nach Best gefärbten Schnitten. Die semiquantitative Bewertung erfolgte nach einem Protokoll von Bui-Nguyen et al. (2015). Die Intensität der Anfärbung von Glykogen in den Hepatozyten wurde in 10- und 20-facher Objektivergrößerung untersucht und mit Grad 1 bis 4 bewertet (Abb. 7).

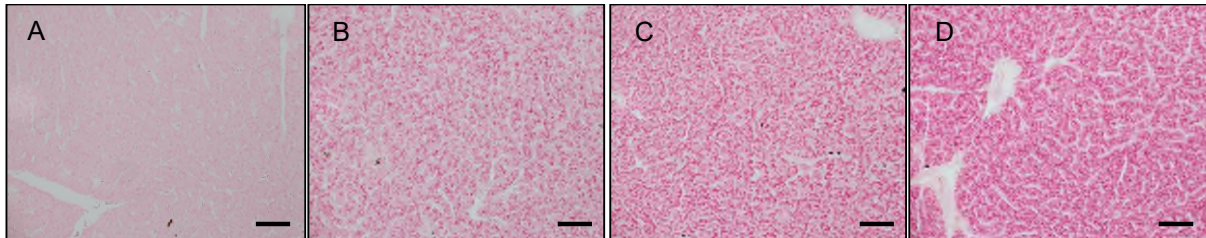


Abb. 7: Histologische Präparate der Leber, Glykogengehalt der Hepatozyten. A: Grad 1 (kein Glykogen); B: Grad 2; C: Grad 3; D: Grad 4. Färbung mit Karminlösung nach Best. Maßstabsbalken: 100 μ m

2.3.2 Hämatologische Untersuchungen

Die hämatologischen Untersuchungen wurden an allen PVC-exponierten Fischen sowie Kontrollindividuen durchgeführt und erfolgten an frischem, unter Narkose entnommenem, heparinisiertem Vollblut. Die Untersuchungen umfassten die Bestimmung von Gesamterthrozyten und -leukozyten, Differentialblutbild, Hämatokrit sowie Hämoglobingehalt.

2.3.3 Klinisch-chemische Blutuntersuchungen

Die klinisch-chemischen Blutuntersuchungen erfolgten an frisch gewonnenem Blutplasma aller Versuchsfische und Kontrollindividuen und beinhalteten die Konzentrationen von Gesamteiweiß/Totalprotein, Albumin, Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin, Triglyceriden, Cholesterin, Calcium, Magnesium, Glukose sowie das Verhältnis von Albumin zu Globulin. Weiterhin wurde die Aktivität der Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alkalische Phosphatase (AP) sowie der Laktatdehydrogenase (LDH) gemessen. Die Plasmaproben wurden mit 15 gebrauchsfertigen Einzeltest-Kartuschensystemen (Fa. Hitachi Chemical) mit vorkalibrierten Reagenzien für Nasschemie

gemessen. Die photometrische Aktivitätsmessung und quantitative Bestimmung erfolgten im dazugehörigen teilautomatisierten klinischen Analysegerät (Hitachi Clinical Analyzer M40, Fa. Hitachi) im Nasschemieverfahren.

2.3.4 Biomarkeranalysen

Für nachfolgende Biomarkeranalysen wurde von allen Versuchsfischen und Kontrolltieren frisch gewonnenes Blutplasma in Kryogefäße (Kryoröhrchen 1,2 mL, steril 12,5×43 mm/100 Stück, Fa. neoLab Art-Nr.: 7-8050) überführt, auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Um mögliche hormonelle Wirkungen des in Weich-PVC enthaltenen Weichmachers DINP zu erfassen, erfolgte eine Bestimmung der Konzentration der Geschlechtshormone 17 β -Estradiol, Testosteron, 11-Keto-Testosteron sowie der Aromatase. Bei allen männlichen Fischen wurde zusätzlich die Vitellogeninkonzentration bestimmt. Zur Abbildung sowohl toxischer Wirkungen als auch unspezifischer Stressbelastungen wurden die Plasmakonzentrationen von Cytochrom P450 1A1, Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) und Kortisol bestimmt.

Es kamen kompetitive ELISA-Tests, sowie Sandwich-ELISA-Tests die als Fertigtestsets für die genannten Parameter kommerziell erhältlich sind (Fa. Cusabio GmbH, Fa. Cayman Chemical, Fa. Biosense Laboratories) zur Anwendung. Die Durchführung der ELISA-Tests erfolgte nach Herstellerangaben, zur photometrischen Bestimmung wurde ein Mikrotiterplatten-Lesegerät (Sunrise, TECAN Deutschland, Crailsheim) bei 405 nm eingesetzt.

2.3.5 DINP-Rückstandsanalytik in Fischgewebe

Rückstandsanalysen erfolgten an 16 Weich-PVC-exponierten Fischen. Proben von Leber, Niere sowie Muskulatur wurden mittels GC-MS/MS analysiert. Die Nachweisgrenze lag bei 0,05 mg/kg.

2.3.6 Statistische Datenauswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mit Hilfe der IBM SPSS Statistics Software (Version 26.0, IBM Corporation). Die Normalverteilung der Körpergewichte, Biomarker, klinisch-chemischen und hämatologischen Parameter wurde mittels Shapiro-Wilk-Test und die Homogenität der Varianzen mittels Levene-Test geprüft. Waren die Voraussetzungen erfüllt, wurden mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen (Kontrollen und Weich- oder Hart-PVC-exponierte Tiere) mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Post-Hoc-Tests ermittelt. Lag keine Normalverteilung und/oder Varianzhomogenität vor, wurde der Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die wesentlichen Ergebnisse der Studie zusammengefasst. Soweit für bestimmte Parameter statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrolltieren und Hart- bzw. Weich-PVC-exponierten Fischen ermittelt wurden, sind die Befunde, sofern ihnen eine diagnostische Bedeutung zukommt, graphisch oder tabellarisch dargestellt. Die gesamten, erhobenen Messwerte finden sich in den jeweiligen Tabellen im Anhang dieses Berichtes.

3.1 Körpergewicht

Versuchsfische, denen Weich-PVC verabreicht wurde, wiesen gegenüber Kontrolltieren eine statistisch signifikant verminderte Gewichtszunahme auf. Dieser Effekt war bei weiblichen Fischen ($p < 0,001$) stärker ausgeprägt als bei männlichen Individuen ($p < 0,01$). Weibliche, Weich-PVC-exponierte Fische wiesen darüber hinaus auch eine signifikant geringere Gewichtszunahme auf

($p < 0,05$) als weibliche, Hart-PVC-exponierte Individuen. Nach Exposition in Hart-PVC war die Gewichtszunahme bei Fischen beiderlei Geschlechts nicht signifikant reduziert. In den Abb. 8 und 9 sind die Körpergewichte der PVC-exponierten Versuchsfische sowie der Kontrolltiere vor und nach der Exposition sowie die daraus resultierenden Gewichtszunahmen nach Geschlechtern getrennt dargestellt.

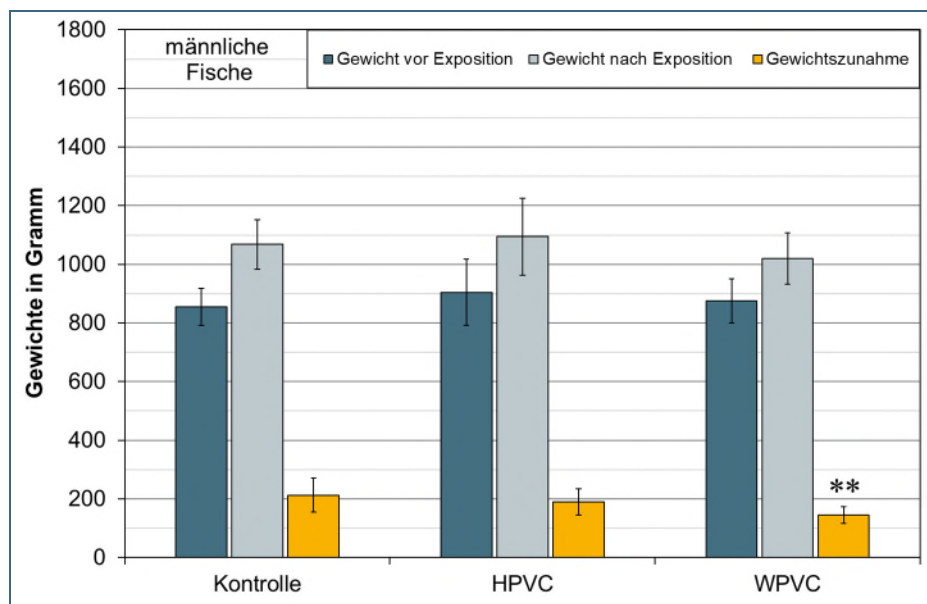


Abb. 8: **Körpergewicht bei männlichen Fischen, Gewichtszunahme.** Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); **: $p < 0,01$; statistisch signifikanter Unterschied zwischen Weich-PVC-exponierten und Kontrollfischen

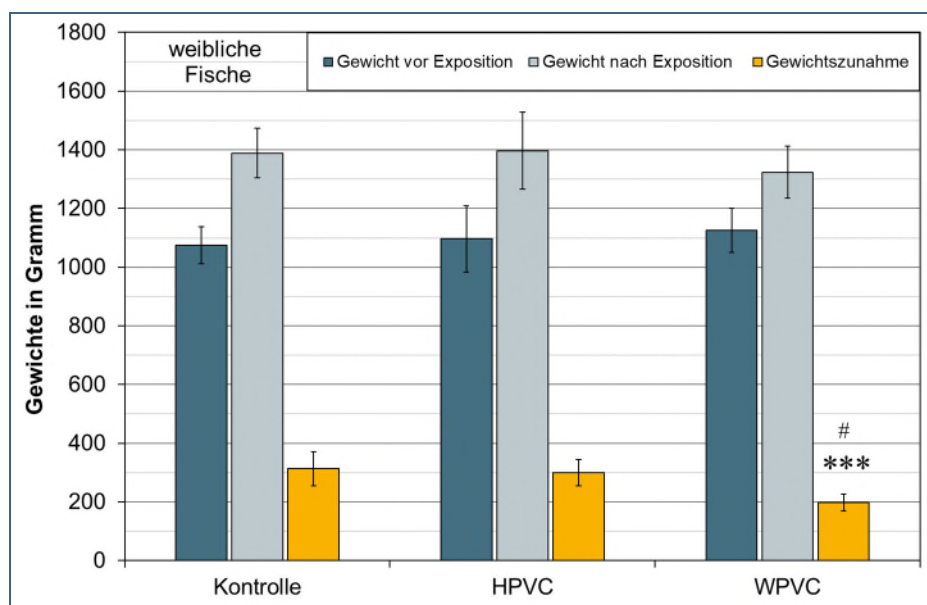


Abb. 9: **Körpergewicht bei weiblichen Fischen, Gewichtszunahme.** Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); ***: $p < 0,001$; statistisch signifikanter Unterschied zwischen Weich-PVC-exponierten und Kontrollfischen; #: $p < 0,05$; statistisch signifikanter Unterschied zwischen Hart- und Weich-PVC-exponierten Fischen

3.2 Pathologische Untersuchungen

3.2.1 Pathologisch-anatomische Untersuchung

Die makroskopische Beurteilung der Test- und Kontrollfische ergab vereinzelte Nebenbefunde, wie z. B. Abschürfungen der Haut im Bereich der Flossen, die jedoch nicht in einem kausalen Zusammenhang mit der PVC-Exposition stehen. Die Tiere wiesen weder im Bereich von Haut und Kiemen noch im Darm einen Parasitenbefall auf.

3.2.2 Pathologisch-histologische Untersuchung

Die histopathologische Untersuchung von Haut, Muskulatur, Schwimmblase, Pylorusanhängen und Kopfnieren ergaben keine auffälligen Veränderungen. Im Bereich von Rumpfnieren, Leber, Milz, Herz, Magen, Mitteldarm sowie den Kiemen wurden zwar pathologische Organläsionen detektiert, die Veränderungen traten jedoch bei PVC-exponierten und Kontrolltieren gleichermaßen auf und stellen somit Nebenbefunde dar.

Im Bereich des Enddarmepithels wurde bei 100 % der Weich- bzw. Hart-PVC-exponierten Fische und 97 % der Kontrolltiere in den kolumnaren Enterozyten eine Verkleinerung oder ein Fehlen supranukleärer Vakuolen beobachtet. Dieser Befund war bei Tieren der Weich-PVC-Gruppe hochsignifikant ($p < 0,001$) stärker ausgeprägt als bei Hart-PVC-exponierten und Kontrollfischen. In Tab. 1 sind die Daten aus der semiquantitativen Bewertung dieses Befundes dargestellt.

Tab. 1: Schweregrad der semiquantitativ ermittelten Veränderungen der kolumnaren Enterozyten im Enddarmepithel männlicher und weiblicher Versuchs- und Kontrollfische (n = 64 Fische).

Parameter	Kontrolle	Hart-PVC	Weich-PVC
Schweregrad (0-6)	1,77 ± 0,96	2,00 ± 0,97	3,91 ± 0,62***###
Anzahl betroffener Fische	31 (96,87%)	16 (100%)	16 (100%)

*** < 0,001: statistisch signifikante Unterschiede zwischen Weich-PVC-exponierten und Kontrollfischen; ### p<0,001: statistisch signifikanter Unterschied zwischen Hart- und Weich-PVC-exponierten Fischen.

3.2.3 Glykogen

Generell wiesen die männlichen Tiere weniger Glykogen in der Leber auf als die weiblichen Individuen. Bei den männlichen Fischen war der Glykogengehalt sowohl nach Exposition in Hart-PVC ($p < 0,01$) als auch in Weich-PVC ($p < 0,05$) gegenüber Kontrolltieren signifikant reduziert. Auch bei weiblichen Fischen wurde nach PVC-Exposition ein geringerer Glykogengehalt der Leber nachgewiesen. Allerdings war der Unterschied nur bei Fischen der Weich-PVC-Gruppe statistisch signifikant ($p < 0,05$). In Tab. 2 sind die semiquantitativ ermittelten Glykogengehalte der Leber von PVC-exponierten und Kontrolltieren dargestellt.

Tab. 2: Semiquantitativ ermittelter Glykogengehalt in den Hepatozyten der Leber männlicher und weiblicher Versuchs- und Kontrollfische (n = 64 Fische)

Parameter	Kontrolle	Hart-PVC	Weich-PVC
Männliche Fische	n = 16	n = 9	n = 8
Glykogengehalt (0-4)	2,69 ± 0,58	2,00 ± 0,00**	2,00 ± 0,71*
Weibliche Fische	n = 16	n = 7	n = 8
Glykogengehalt (0-4)	0,94 ± 0,56	0,71 ± 0,45	0,25 ± 0,43*

* < 0,05, ** p<0,01: statistisch signifikante Unterschiede zwischen Hart- und Weich-PVC-exponierten und Kontrollfischen; die Bewertung erfolgte an Paraffinschnitten der Leber (Färbung mit Karminlösung nach Best) nach Bui-Nguyen et al. (2015).

3.3 Hämatologie

Die hämatologischen Parameter Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration, die Gesamtanzahl an Erythrozyten und Leukozyten sowie die Auswertung des Differentialblutbildes wiesen keine Unterschiede zwischen Hart- und Weich-PVC-exponierten Tieren und Kontrolltieren auf. Die ermittelten Werte sind in Tab. 3 im Anhang aufgelistet.

3.4 Klinische Chemie

Die Plasmakonzentrationen von Albumin, Gesamteiweiß, Alkalischer Phosphatase, Bilirubin, Kreatinin, Harnstoff, Triglyceriden, Magnesium, Lactatdehydrogenase, Cholesterin und Glukose zeigten keine signifikanten Veränderungen.

Die Plasmaaktivität der AST war bei männlichen Tieren, die Aktivität der ALT bei weiblichen Tieren gegenüber den Kontrolltieren signifikant reduziert. Da diesen beiden Plasmaenzymen nur im Falle eines Aktivitätsanstiegs eine Aussagekraft zukommt, ist dieser Befund ohne diagnostische Bedeutung. Darüber hinaus wiesen weibliche Tiere nach Exposition in Weich-PVC signifikant niedrigere Calciumgehalte im Blut auf als nach Exposition in Hart-PVC. Gegenüber den Calciumwerten bei Kontrollfischen waren jedoch keine Unterschiede erkennbar, sodass die Befunde nicht auf die PVC-Exposition zurückgeführt werden. Die Analysenergebnisse aller untersuchten, klinisch-chemischen Parameter sind in Tab. 4 im Anhang aufgelistet.

3.5 Biomarker

Die serologischen Analysen ergaben je nach Geschlecht der Tiere z. T. unterschiedliche Biomarkerantworten.

Die Plasmakonzentration von 11-Keto-Testosteron war bei weiblichen Tieren der Hart- bzw. Weich-PVC-Gruppe signifikant niedriger als bei Kontrolltieren, während bei männlichen Individuen keine Effekte auftraten (Abb. 10). Die Werte für Testosteron wiesen bei Tieren beider Geschlechter keine Veränderungen auf. Die Konzentration der Aromatase zeigte bei männlichen, Hart-PVC-exponierten Tieren einen signifikanten Anstieg gegenüber den Kontrollen (Abb. 11). 17 β -Estradiol war sowohl bei männlichen, als auch bei weiblichen Fischen beider PVC-Versuchsgruppen gegenüber den Kontrollwerten signifikant erhöht (Abb. 12). Die Bestimmung des Biomarkers Vitellogenin erfolgte nur bei männlichen Tieren und ergab eine signifikante Erhöhung ausschließlich bei Weich-PVC-exponierten Individuen (Abb. 13). Die Werte für Hsp70 waren sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Fischen der Hart-PVC-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe, bei weiblichen Tieren zudem auch gegenüber der Weich-PVC-Gruppe signifikant erhöht (Abb. 14). Cytochrom P450 1A1 lag bei weiblichen Tieren der Weich-PVC-Gruppe deutlich unter den Werten der Kontrolltiere (Abb. 15). Die Plasmakonzentrationen von Kortisol zeigten im Gruppenvergleich keine signifikanten Veränderungen. Die Werte aller untersuchten Biomarker sind in Tab. 5 im Anhang dargestellt.

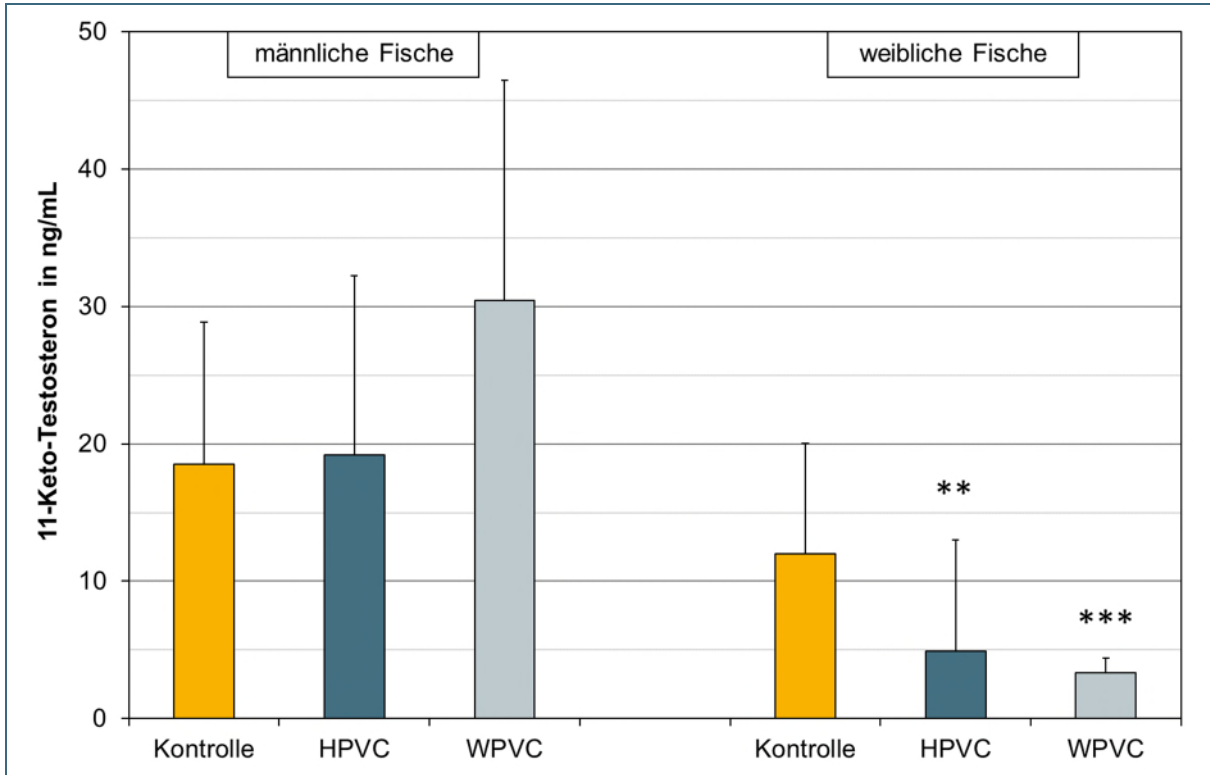


Abb. 10: Konzentration von 11-Keto-Testosteron im Blutplasma von männlichen und weiblichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen PVC-exponierten und Kontrolltieren.

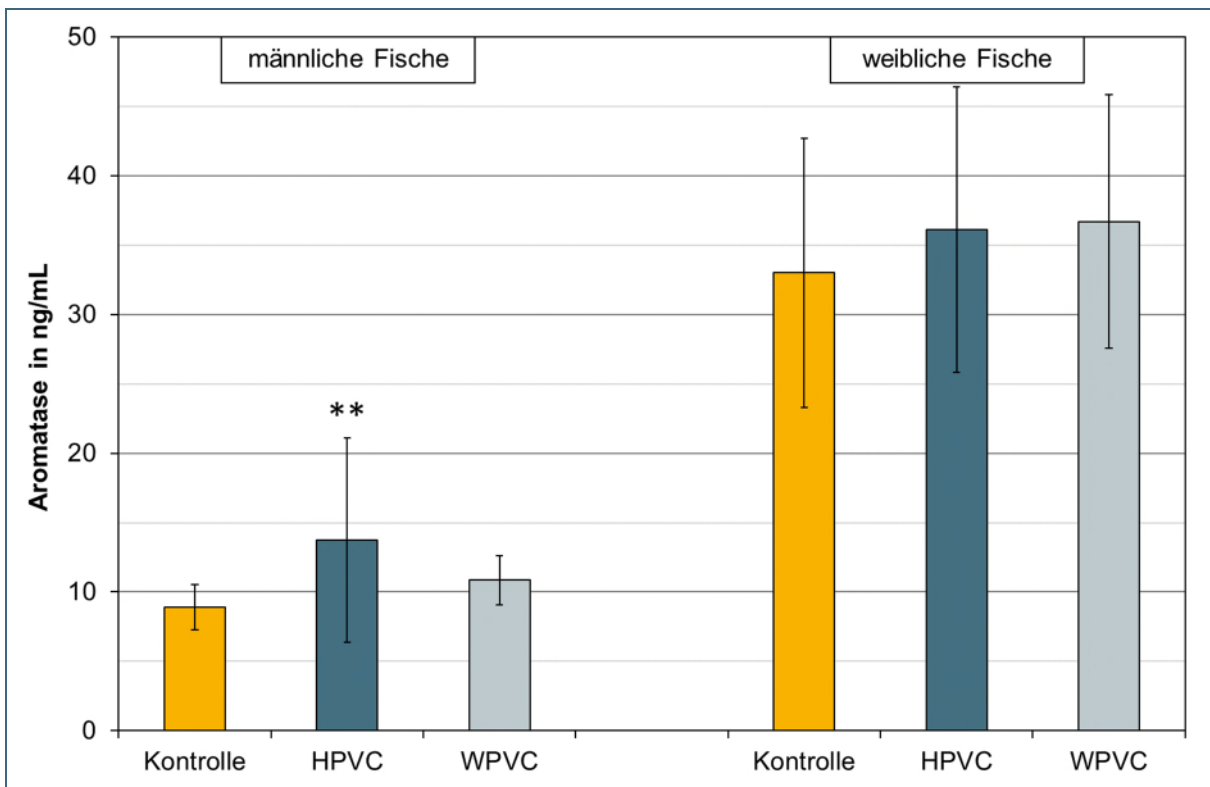


Abb. 11: Konzentration der Aromatase im Blutplasma von männlichen und weiblichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); ** $p < 0,01$ statistisch signifikanter Unterschied zwischen männlichen, Hart-PVC-exponierten und Kontrolltieren.

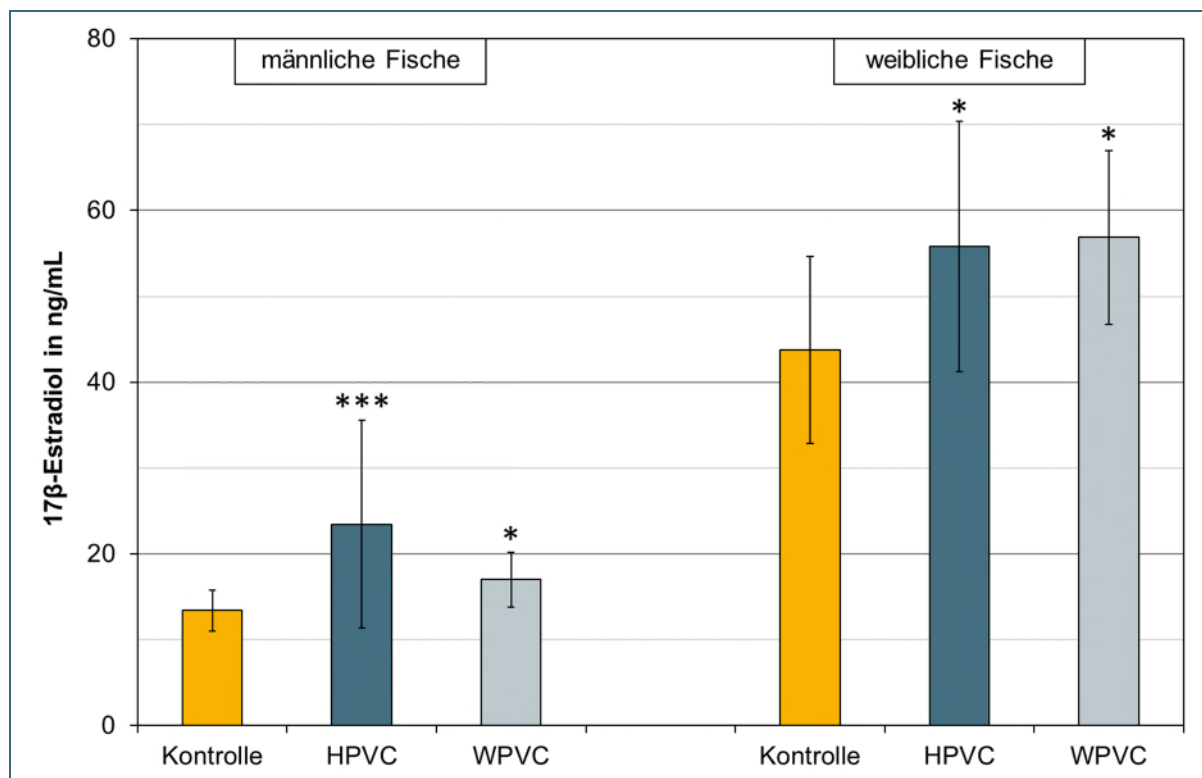


Abb. 12: Konzentration von 17β-Estradiol im Blutplasma von männlichen und weiblichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen PVC-exponierten und Kontrolltieren.

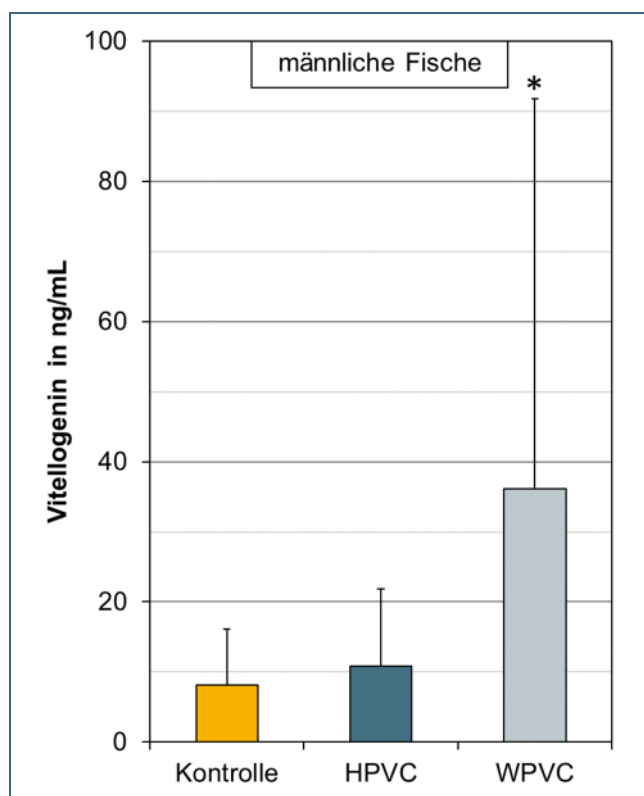


Abb. 13: Konzentration von Vitellogenin im Blutplasma von männlichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); * $p < 0,05$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen Weich-PVC-exponierten und Kontrolltieren.

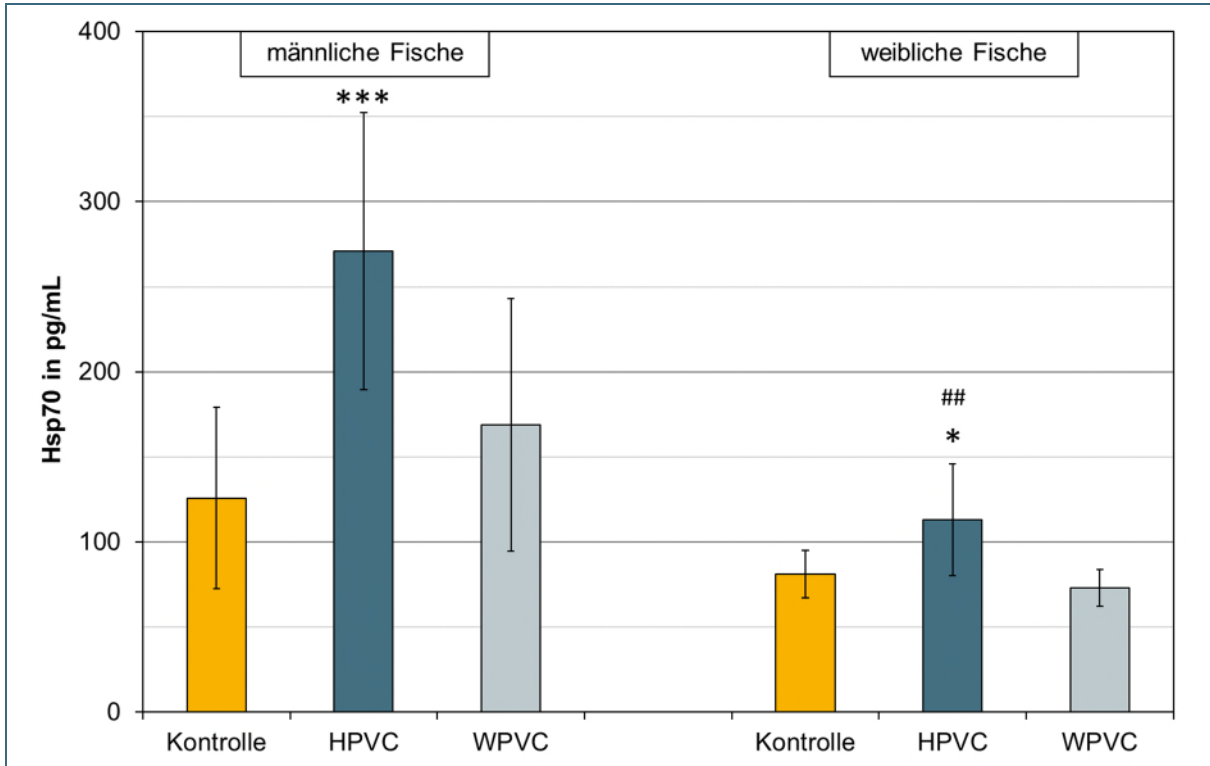


Abb. 14: Konzentration von Hsp70 im Blutplasma von männlichen und weiblichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen Hart-PVC-exponierten und Kontrolltieren; ## $p < 0,01$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen Hart- und Weich-PVC-exponierten Tieren.

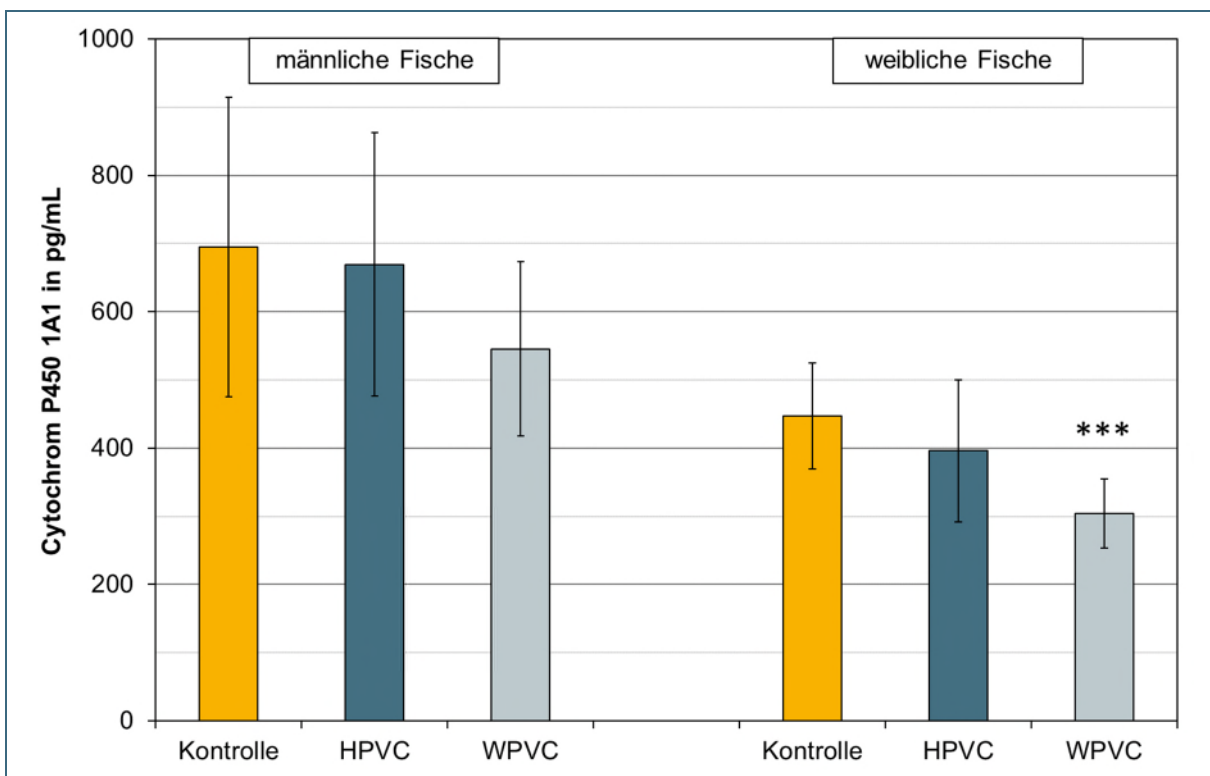


Abb. 15: Konzentration von Cytochrom P450 1A1 im Blutplasma von männlichen und weiblichen Fischen. Kontrolle, HPVC (Hart-PVC), WPVC (Weich-PVC); *** $p < 0,001$: statistisch signifikanter Unterschied zwischen Weich-PVC-exponierten und Kontrolltieren.

3.6 Rückstandsanalytik

Eine bei Fischen der Weich-PVC-Gruppe durchgeführte Analyse auf Rückstände des Weichmachers DINP mittels GC-MS/MS ergab keinen Nachweis der chemischen Verbindung in Leber, Niere und Muskulatur der Versuchsfische (Nachweisgrenze 0,05 mg/kg).

4 Diskussion

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass Mikroplastik nicht nur in marinen Gewässern nachweisbar ist (Carpenter et al. 1972; Bergmann et al. 2015), sondern auch in allen Gewässerkompartimenten von Flüssen und Seen vorkommt (Faure et al. 2012; Imhof et al. 2013; Besseling et al. 2015; Heß et al. 2018; Schwaiger 2019). Auch die Aufnahme von Mikroplastik durch Fische in Binnengewässern wurde in mehreren Studien belegt (Wagner et al. 2014; Phillips und Bonner 2015; Roch und Brinker 2017). Bis heute ist anhand der bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisse zur Auswirkung von Mikroplastik auf Süßwasserorganismen keine fundierte Risikobewertung der in Flüssen und Seen nachgewiesenen Mikroplastikkonzentrationen möglich. Die Tatsache, dass Mikroplastik ubiquitär in Gewässern vorhanden ist und auch von Gewässerorganismen aufgenommen wird, erlaubt noch keine Aussage darüber, in wieweit die in den Gewässern nachgewiesenen Konzentrationen zu einer Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes aquatischer Lebewesen führen können.

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, mögliche Auswirkungen von Mikroplastik auf die Fischgesundheit zu ermitteln. Fische sind in ihrer natürlichen Umgebung einer Vielzahl von biologischen, physikalischen und chemischen Faktoren ausgesetzt, die Einfluss auf deren Gesundheitszustand haben können. Um diese Faktoren auszuschließen, wurde in der ökotoxikologischen Versuchsanlage des LfU an der Dienststelle in Wielenbach ein Expositionsversuch unter kontrollierten Laborbedingungen durchgeführt. Nur so war es möglich, zwischen eventuell auftretenden Effekten und definierten Mikroplastikkonzentrationen einen kausalen Zusammenhang herzustellen. Als Testpolymer wurde PVC (Polyvinylchlorid) ausgewählt, das auch in bayerischen Flüssen und Seen neben PE und PP zu den am häufigsten nachgewiesenen Kunststoffen zählt (Heß et al. 2018; Schwaiger 2019). Zudem stellt PVC einen der am meisten produzierten und eingesetzten Kunststoffe dar (PlasticsEurope 2020). Durch den Zusatz von Additiven, die je nach Anforderung an die Materialeigenschaften variieren, stellt PVC einen sehr vielseitig einsetzbaren Werkstoff dar. Um exemplarisch mögliche Effekte von Additiven zu ermitteln, wurden in vorliegender Studie neben Hart-PVC- auch Weich-PVC-Partikel eingesetzt. In letzterem war mit einem Anteil von 30 % der Weichmacher DINP (Di-Isononylphthalat) enthalten.

Als Versuchstiere wurden Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) eingesetzt, eine im Rahmen ökotoxikologischer Fragestellungen häufig verwendete und gut dokumentierte Fischart. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von acht Wochen unter kontrollierten Bedingungen Fischfutter verabreicht, dem entweder Hart-PVC oder Weich-PVC zu je 10 % zugesetzt wurde. Da bis heute keine Studien zu Auswirkungen sehr geringer, umweltrelevanter PVC-Konzentrationen auf Fische vorliegen, wurde ein PVC-Gehalt im Futter gewählt, der deutlich über den bisher in der Wasserphase von Fließgewässern und Seen nachgewiesenen PVC-Konzentrationen lag. Ziel war zu ermitteln, ob Mikroartikel aus Hart- und Weich-PVC überhaupt zu Veränderungen bei Fischen führen können. Die PVC-Konzentrationen im Futter lagen dabei in einer ähnlichen Größenordnung wie sie auch in anderen Studien verwendet wurden (Iheanacho et al. 2020a; 2020b; Xia et al. 2020). Um trotzdem einen Bezug zur Realität herzustellen, wurden jedoch im Gegensatz zu den genannten Studien keine industriell hergestellten PVC-Partikel verwendet, sondern es erfolgte eine Vermahlung von Hart- und Weich-PVC zu Partikeln unterschiedlicher Größenklassen, die anschließend zu gleichen Gewichtsanteilen vermischt und dem Testfutter zugesetzt wurden. Eine Partikelanalyse ergab bei 95 % der Partikel einen Durchmesser von kleiner 4 µm (Hart-PVC) sowie kleiner 2 µm (Weich-PVC). Damit lag ein Großteil der Partikel in einer

Größenordnung vor, wie sie unter anderem in bayerischen Flüssen und Seen nachgewiesen wurde. Vergleichbar der Situation in den Gewässern handelte es sich zudem bei der Mehrzahl der Partikel um Fragmente (Heß et al. 2018; Schwaiger 2019).

Zur Ermittlung potenzieller, durch PVC-Partikel induzierter Veränderungen kamen medizinisch-toxikologische Untersuchungen zum Einsatz. Anhand von hämatologischen und klinisch-chemischen Parametern, Biomarkern sowie pathologisch-anatomischen und histopathologischen Befunden lassen sich physiologische sowie krankhafte Prozesse im Organismus diagnostizieren.

Die makroskopische Untersuchung der Tiere ergab keine Veränderungen, die auf eine PVC-Exposition zurückzuführen waren. Sowohl bei Kontrolltieren als auch bei PVC-exponierten Fischen waren gelegentlich pathologische Veränderungen, wie z. B. geringgradige Verletzungen im Bereich der Flossen, abgeheilte Kiemenverletzungen oder Konkrementablagerungen in der Niere zu beobachten. Derartige Veränderungen finden sich häufig bei Zuchtfischen und werden als Nebenbefunde gewertet, die nicht in kausalem Zusammenhang mit einer PVC-Exposition stehen.

Die Bestimmung des Körpergewichts ergab jedoch bei Fischen, denen über das Futter Weich-PVC-Partikel mit einem Anteil von 10 % verabreicht wurde, eine gegenüber Kontrolltieren signifikant reduzierte Gewichtszunahme. Bei männlichen Fischen lag die Reduktion bei 32 %, bei weiblichen Individuen bei 37 %. Tiere der Hart-PVC-Gruppe wiesen gegenüber Kontrollindividuen keine signifikant verringerte Gewichtszunahme auf. Auch bei Karpfen führte eine Verabreichung von PVC-haltigem Futter für 30 bzw. 60 Tage zu einer deutlichen Reduzierung der Gewichtszunahme (Xia et al. 2020). Prinzipiell ist aufgrund dessen, dass das verabreichte Fischfutter in vorliegender Studie zu 10 % PVC-Partikel und damit um 10% weniger Nährstoffe enthielt als das Kontrollfutter, eine reduzierte Zunahme des Körpergewichtes zu erwarten. Unplausibel erscheint jedoch, dass dieser Effekt in erster Linie bei Fischen der Weich-PVC-Gruppen auftrat, während Tiere der Hart-PVC-Gruppe keine statistisch signifikanten Veränderungen bezüglich der Gewichtszunahme aufwiesen. Untersuchungen an Zebraquärlingen (*Danio rerio*) sprechen jedoch dafür, dass auch die Form der eingesetzten Mikroplastikpartikel indirekt einen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung haben kann. So wurde an dieser Fischart nach Exposition in Mikroplastikpartikeln verschiedener Form und Polymerzusammensetzung gezeigt, dass Fasern deutlich länger im Verdauungstrakt verbleiben als Beads und gleichzeitig zu einer reduzierten Gewichtszunahme führen (Qiao et al. 2019). Es ist nicht auszuschließen, dass auch in vorliegender Studie die eher kantige Form der Weich-PVC-Partikel gegenüber den meist rundlichen Hart-PVC-Partikeln zu einer längeren Verweildauer im Verdauungstrakt und in der Folge zu einer reduzierten Gewichtszunahme bei Fischen der Weich-PVC-Gruppe beigetragen hat.

Hinweise auf eine negative Beeinflussung des Ernährungszustandes der PVC-exponierten Fische liefert auch die semiquantitativ-histologische Bewertung des Glykogengehaltes der Leberzellen. Generell wiesen die weiblichen Fische aller Gruppen einen geringeren Gehalt dieses Energiespeicherstoffes in den Hepatozyten auf als männliche Individuen. Dieser Zustand ist bei geschlechtsreifen, weiblichen Fischen während der Gonadenreife als physiologisch anzusehen und spiegelt den für die Produktion von Vitellogenin erhöhten Energiebedarf wieder (Hinton 1993; Wolf und Wheeler 2018). Auffällig war jedoch ein sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Weich-PVC-exponierten Fischen signifikant reduzierter Glykogengehalt der Leberzellen. Bei den männlichen Fischen der Hart-PVC-Gruppe war der Gehalt an Glykogen in der Leber gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls signifikant reduziert während bei den weiblichen Fischen nur eine entsprechende Tendenz zu beobachten war. Die bei Fischen nach Verabreichung von PVC-dotiertem Futter beobachtete Glykogendepletion wird ebenso wie die reduzierte Gewichtszunahme als Folge einer gegenüber Kontrollfischen verminderten Nährstoff- bzw. Energiezufuhr interpretiert.

Im Rahmen der histopathologischen Untersuchung wurden mit Ausnahme von Nebenbefunden, die bei PVC-exponierten und Kontrollfischen gleichermaßen auftraten, nur im Bereich des Enddarms Veränderungen der kolumnaren Enterozyten beobachtet, die bei Weich-PVC-Fischen stärker ausgeprägt waren als bei Tieren der Hart-PVC- sowie der Kontrollgruppe. Auch in anderen Studien wurden nach Verabreichung von mit PVC-Mikropartikeln dotiertem Futter an Fische histopathologische Veränderungen im Bereich des Enddarms festgestellt (Pedà et al. 2016; Espinosa et al. 2017). Allerdings wurde weder in den zitierten Studien noch in vorliegender Untersuchung eine Bewertung der Befunde anhand aufwendiger, quantitativ-stereologischer Methoden, sondern nur eine semiquantitative Bewertung durchgeführt, wodurch sich die Aussagekraft der Befunde deutlich verringert. Des Weiteren sind histologische Schnittpräparate von Gewebeproben aus dem Verdauungstrakt aufgrund sehr rasch einsetzender Autolyse-Prozesse generell kritisch zu beurteilen. Deshalb und auch bedingt durch die Tatsache, dass die Veränderungen in geringerer Ausprägung auch bei Kontrolltieren und Fischen der Hart-PVC-Gruppe zu beobachten waren, ist ein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen den Alterationen im Bereich des Enddarmepithels und der Weich-PVC-Exposition nicht darstellbar. Auch die hämatologischen und klinisch-chemischen Untersuchungen ergaben keine Veränderungen, die auf eine Schädigung der Tiere infolge einer Aufnahme von PVC-Mikropartikeln zurückzuführen sind.

Die serologische Bestimmung einzelner Biomarker ergab jedoch Unterschiede zwischen PVC-exponierten Fischen und Kontrolltieren. Biomarker reagieren sehr empfindlich und sind Ausdruck stressbedingter biochemischer Reaktionen von Organismen (Fent 1998). Sie können entweder spezifisch auf bestimmte Chemikalien reagieren oder eine unspezifische Stressreaktion anzeigen. Die Analyse von Hsp70 im Blutplasma ergab sowohl bei männlichen, als auch bei weiblichen Fischen der Hart-PVC-Gruppe signifikant höhere Konzentrationen von Hsp70 als bei Kontrollindividuen. Hsp70 wird als unspezifischer Biomarker für eine Vielzahl von Umweltstressoren und metabolischen Störungen im Organismus herangezogen (Köhler et al. 2001; Yamashita et al. 2010). Es ist nicht auszuschließen, dass die Erhöhung von Hsp70 bei Hart-PVC-exponierten Fischen eine unspezifische Stressreaktion der Tiere darstellt.

Die Analyse des Biomarkers Cytochrom P450 1A1 ergab ausschließlich bei weiblichen Fischen, denen mit Weich-PVC-dotiertes Futter verabreicht wurde, signifikant niedrigere Werte als bei Kontrollfischen. Bei männlichen Fischen der Weich-PVC-Gruppe war eine tendenzielle Abnahme der Konzentration zu beobachten. Es handelt sich bei diesem Biomarker um einen Vertreter der Cytochrome P450, einer Gruppe von Proteinen mit enzymatischer Aktivität, die an der Metabolisierung und Eliminierung von Fremdstoffen beteiligt ist (Lewis 1996). Cytochrom P450 1A1 wird häufig in ökotoxikologischen Studien als Indikator für Xenobiotika eingesetzt (Bard et al. 2002; Moore et al. 2003; Široká und Drastichová 2004). Eine Studie an Karpfen, denen über 60 Tage unterschiedliche Konzentrationen von PVC-Partikeln über das Futter verabreicht wurden, ergab nach einem initialen Anstieg nach 30 Tagen ebenfalls eine signifikante Reduktion der Genexpression von Cytochrom P450 1A1 (Xia et al. 2020). Eine *in vitro* Studie an Hepatozyten der Regenbogenforelle weist auf eine suppressive Wirkung des weiblichen Sexualhormons 17 β -Estradiol auf die Genexpression von Cytochromen P450 durch Bindung an den Estrogenrezeptor hin (Navas und Segner 2001). In vorliegender Studie zeigten die Testfische beiderlei Geschlechts sowohl der Hart- als auch der Weich-PVC-Gruppe gegenüber Kontrolltieren signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von 17 β -Estradiol. Auch wenn nur bei weiblichen Tieren der Weich-PVC-Gruppe eine statistisch signifikante Abnahme der Konzentration von Cytochrom P450 1A1 und in den anderen PVC-Gruppen nur jeweils abnehmende Tendenzen beobachtet wurden, ist ein kausaler Zusammenhang zwischen den erhöhten 17 β -Estradiolwerten und den erniedrigten Konzentrationen von Cytochrom P450 1A1 möglich. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass durch die Aufnahme des im Weich-PVC enthaltenen, schwach estrogen wirksamen Weichmachers DINP (Harris et al. 1997) und dessen Bindung an den Estrogenrezeptor eine Hemmung der Ex-

pression von Cytochrom P450 1A1 erfolgte. Die Tatsache, dass weibliche Tiere deutlich mehr betroffen waren als männliche Individuen, beruht eventuell darauf, dass weibliche Fische schon physiologisch insbesondere während der Laichanbildung über mehr Estrogenrezeptoren verfügen als männliche Fische (Nelson und Habibi 2008).

Die serologische Bestimmung der Aromatase-Konzentration ergab bei männlichen, Hart-PVC-exponierten Fischen einen signifikanten Anstieg gegenüber Kontrolltieren. Bei dieser Versuchsgruppe wurde auch der im Vergleich zu Kontrolltieren höchste Anstieg von 17 β -Estradiol ermittelt. Eine Funktion der Aromatase besteht darin, die Synthese von 17 β -Estradiol aus Testosteron zu katalysieren (Göppert et al. 2016). Weibliche Fische der Hart- und Weich-PVC-Gruppe wiesen gegenüber Kontrolltieren ebenfalls signifikant erhöhte 17 β -Estradiolwerte auf, allerdings weniger ausgeprägt als männliche Fische. Korrespondierend war auch die Konzentration der Aromatase nur tendenziell erhöht. Die Werte für Testosteron waren bei Tieren beider Geschlechter und PVC-Versuchsgruppen nicht verändert. Die Plasmakonzentrationen von 11-Keto-Testosteron war bei weiblichen Tieren der Hart- bzw. Weich-PVC-Gruppe signifikant niedriger als bei Kontrolltieren, während bei männlichen Individuen keine statistisch signifikanten Unterschiede auftraten. Allerdings wiesen die Messdaten eine hohe individuelle Variabilität auf, sodass die Werte eher eine relativ hohe, physiologische Schwankungsbreite abbilden als einen durch PVC induzierten Effekt.

Eine Analyse von Vitellogenin erfolgte nur bei männlichen Versuchs- und Kontrollfischen. Vitellogenin stellt einen Eiweißstoff dar, der von weiblichen Fischen unter Estrogeneinfluss in der Leber gebildet wird. Als Vorstufe des Dotterproteins wird Vitellogenin in die heranreifenden Eier eingebaut und dient dort der Versorgung der Embryonen mit Nährstoffen. Unter Einfluss estrogen wirksamer Substanzen sind auch männliche und juvenile Tiere in der Lage, dieses Eiweiß zu bilden. Somit stellt ein Nachweis von Vitellogenin in Blutproben männlicher Fische ein Indiz für eine Einwirkung estrogener Substanzen dar (Schwaiger und Negele 1998). Die Untersuchung ergab bei Fischen, denen Weich-PVC verabreicht wurde, eine gegenüber den Kontrolltieren um den Faktor 4,4 höhere Konzentration von Vitellogenin im Blutplasma. Ein Anstieg in dieser Größenordnung ist im Vergleich zur Wirkstärke natürlicher Estrogene wie z. B. Ethinylestradiol und Diethylstilbestrol als sehr gering einzustufen (Christiansen et al. 1998). Zwar handelt es sich bei DINP um eine sehr schwach estrogen wirksame Verbindung (Soto et al. 1995; Harris et al. 1997), der Anteil von DINP im verwendeten Weich-PVC betrug jedoch 30 %. Auch wenn die chemische Analyse bei einer Nachweisgrenze 0,05 mg/kg keine Rückstände von DINP in den Versuchsfischen ergab, ist davon auszugehen, dass die Fische deutlich mehr DINP aufgenommen haben als unter natürlichen Bedingungen in Gewässern.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei den Testfischen unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine schwerwiegenden Veränderungen zu beobachten waren. Diese Einschätzung stimmt überein mit Ergebnissen aus anderen Studien, in denen ebenfalls keine Effekte durch Mikroplastikpartikel (Polystyrol) nachgewiesen wurden (Schmiege et al. 2020a; Schmiege et al. 2020b). Im Vordergrund der beobachteten Veränderungen stand eine Beeinflussung ernährungsphysiologischer Parameter in Form einer reduzierten Gewichtszunahme sowie einer Reduzierung des Energiespeicherstoffes Glycerin in der Leber. Dies ist aller Wahrscheinlichkeit nach darauf zurückzuführen, dass die Tiere aufgrund des hohen Mikroplastikanteils im Futter entsprechend weniger Nährstoffe aufgenommen haben. Bei Tieren der Hart-PVC-Gruppe wurden erhöhte Hsp70-Werte beobachtet, die im Sinne einer unspezifischen Stressreaktion interpretiert werden. Veränderungen der Geschlechtshormonspiegel im Blut der Fische spiegeln zum einen die hohe natürliche Variabilität dieser Parameter in Abhängigkeit von Jahreszeit und Zyklusstadium wieder. Zum anderen ist auch ein Einfluss des in Weich-PVC enthaltenen, schwach estrogen wirkenden Weichmachers DINP, unter anderem in Form eines Anstiegs des Biomarkers Vitellogenin bei männlichen Fischen, nicht auszuschließen.

Bei der Interpretation und Bewertung der vorliegenden Untersuchungsergebnisse ist zu berücksichtigen, dass den Tieren sehr hohe Konzentrationen von PVC zugeführt wurden. So erhielten die Fische der Hart-PVC-Gruppe während der gesamten Versuchsphase jeden zweiten Tag etwa 69 Millionen PVC-Partikel pro Fisch. In der Weich-PVC-Gruppe betrug die jeden zweiten Tag oral applizierte Menge rund 192 Millionen PVC-Partikel pro Fisch. Zum Vergleich: in oberflächennahen Wasserproben ausgewählter bayerischer Flüsse wurden maximal 151 Partikeln/m³ (Heß et al. 2018), in bayerischen Seen maximal 42 Partikeln/m³ (Schwaiger 2019) detektiert. In der Wassersäule von Seen wurden mit bis zu 44 Partikeln/m³ ähnliche Werte gemessen (Schwaiger 2019).

Aufgrund der Tatsache, dass die in vorliegender Studie eingesetzten PVC-Konzentrationen somit um Größenordnungen über den in Gewässern nachgewiesenen Konzentrationen lagen und die Effekte im Vergleich dazu sehr gering waren, ist unter den in Gewässern vorliegenden Bedingungen von keiner negativen Beeinflussung der Fischgesundheit durch PVC-Partikel auszugehen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass Fische im Gewässer einer Vielzahl anthropogener Einflüsse, wie zum Beispiel chemischen Verbindungen, Krankheitserregern und klimatischen Faktoren ausgesetzt sind. Unter ungünstigen Umweltbedingungen ist nicht auszuschließen, dass ein vorliegendes Energiedefizit, welches beispielsweise durch die Aufnahme von Mikroplastik anstatt von natürlicher Nahrung ausgelöst werden kann, zu einer Beeinträchtigung der Fitness von Fischen führen kann.

5 Zusammenfassung

Zahlreiche Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass Mikroplastik ubiquitär in Flüssen und Seen nachweisbar ist. Bekannt ist auch, dass Mikroplastik von verschiedenen Gewässerorganismen aufgenommen wird. Im Gegensatz dazu liefern bisher publizierte Studien unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Resultate, wenn es darum geht, ein von Mikroplastik ausgehendes Risiko für Gewässerorganismen zu bewerten.

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, mögliche Auswirkungen von Mikroplastik auf die Fischgesundheit zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde in der ökotoxikologischen Versuchsanlage des LfU an der Dienststelle in Wielenbach ein Expositionsversuch unter standardisierten Laborbedingungen durchgeführt. Als Testpolymer wurde Polyvinylchlorid (PVC) ausgewählt, da es sich dabei um einen der am häufigsten in Gewässern nachgewiesenen Kunststoffe handelt. Um exemplarisch auch mögliche Effekte von Additiven zu ermitteln, wurde neben Hart-PVC auch Weich-PVC eingesetzt, welches zu einem Anteil von 30 % den Weichmacher DINP (Di-Isononylphthalat) enthielt.

Als Versuchstiere dienten Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), denen über einen Zeitraum von acht Wochen unter kontrollierten Bedingungen Fischfutter verabreicht wurde, dem entweder Hart-PVC oder Weich-PVC zu je 10 % zugesetzt war. Diese PVC-Konzentration lag deutlich über der in Flüssen und Seen nachgewiesenen Anzahl an PVC-Partikeln. Sie wurde gewählt, um etwaige, durch PVC induzierte Veränderungen und die zugrundeliegenden Wirkmechanismen eindeutig erfassen zu können. Um trotzdem einen Realitätsbezug herzustellen, wurden keine industriell produzierten PVC-Partikel, sondern durch Vermahlung hergestellte PVC-Fragmente verwendet. Gemäß einer Partikelanalyse wiesen 95 % der Partikel einen Durchmesser von kleiner 4 µm (Hart-PVC) sowie kleiner 2 µm (Weich-PVC) auf und entsprachen damit der in Gewässern überwiegend vorliegenden Größensfraktion von Mikroplastik.

Im Anschluss an die Exposition wurden die PVC-exponierten Fische sowie die Kontrolltiere einem breiten Spektrum an medizinisch-toxikologischen Untersuchungen unterzogen. Diese umfassten hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen sowie Biomarker-Analysen. Darüber hinaus

wurden pathologisch-anatomische und histopathologische Befunde erhoben um eine mögliche Beeinträchtigung der Fischgesundheit durch die PVC-Exposition nachzuweisen.

Die Untersuchungen ergaben eine Beeinflussung ernährungsphysiologischer Parameter in Form einer reduzierten Gewichtszunahme bei männlichen und weiblichen Fischen der Weich-PVC-Gruppe sowie einer Reduzierung des Energiespeicherstoffes Glykogen in der Leber bei Weich-PVC-exponierten Tieren beiderlei Geschlechts und männlichen Individuen der Hart-PVC-Gruppe. Zudem wiesen die Tiere der Hart-PVC-Gruppe erhöhte Hsp70-Werte im Sinne einer unspezifischen Stressreaktion auf. Die beobachteten Veränderungen der Geschlechtshormonspiegel im Blut der Fische spiegeln in erster Linie die hohe natürliche Variabilität dieser Parameter wieder. Ein geringer Einfluss des in Weich-PVC enthaltenen, schwach estrogen wirkenden Weichmachers DINP ist jedoch nicht auszuschließen. Dafür spricht unter anderem ein Anstieg des Biomarkers Vitellogenin bei den männlichen Fischen.

Aufgrund der Tatsache, dass die in vorliegender Studie eingesetzten PVC-Konzentrationen um Größenordnungen über den in Gewässern nachgewiesenen Konzentrationen lagen und die Effekte im Vergleich dazu sehr gering waren, ist unter den in Gewässern vorliegenden Bedingungen von keiner negativen Beeinflussung der Fischgesundheit durch die PVC-Partikel auszugehen. Eine generelle Entwarnung für Mikroplastik ist aus diesen Ergebnissen jedoch nicht abzuleiten. Es ist nicht auszuschließen, dass andere Polymere, gegebenenfalls enthaltene Additive sowie abweichende Partikelgrößen und Formen zu Effekten bei Fischen führen können.

Literaturverzeichnis

- Allsopp, M.W.; Vianello, G. (2000): Poly(Vinyl Chloride). In: ULLMANN'S Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim, Germany: Wiley Online Library.
- Amlacher, E. (1992): Taschenbuch der Fischkrankheiten. Grundlagen der Fischpathologie; mit 19 Tabellen. 6., überarb. Aufl. Jena, Stuttgart: G. Fischer.
- Avery-Gomm, S.; O'Hara, P.D.; Kleine, L.; Bowes, V.; Wilson, L.K.; Barry, K.L. (2012): Northern fulmars as biological monitors of trends of plastic pollution in the eastern North Pacific. In: *Marine pollution bulletin* 64 (9), S. 1776–1781. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2012.04.017.
- Bard, S.M.; Woodin, B.R.; Stegeman, J.J. (2002): Expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpureus*) exposed to environmental contaminants. In: *Aquatic Toxicology* 60 (1-2), S. 17–32. DOI: 10.1016/S0166-445X(01)00272-7.
- Bergmann, M.; Gutow, L.; Klages, M. (Hg.) (2015): Marine Anthropogenic Litter. Cham: Springer International Publishing.
- Besseling, E.; Foekema, E.M.; van Franeker, J.A.; Leopold, M.F.; Kuhn, S.; Bravo Rebolledo, E.L.; Hesse, E.; Mielke, L.; IJzer, J.; Kamminga, P.; Koelmans, A.A. (2015): Microplastic in a macro filter feeder: Humpback whale *Megaptera novaeangliae*. In: *Marine pollution bulletin* 95 (1), S. 248–252. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2015.04.007.
- Besseling, E.; Wegner, A.; Foekema, E.M.; van den Heuvel-Greve, Martine J; Koelmans, A.A. (2013): Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). In: *Environmental science & technology* 47 (1), S. 593–600. DOI: 10.1021/es302763x.
- Browne, M.A.; Dissanayake, A.; Galloway, T.S.; Lowe, D.M.; Thompson, R.C. (2008): Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). In: *Environmental science & technology* 42 (13), S. 5026–5031. DOI: 10.1021/es800249a.
- Bui-Nguyen, T.M.; Baer, C.E.; Lewis, J.A.; Yang, D.; Lein, P.J.; Jackson, D.A. (2015): Dichlorvos exposure results in large scale disruption of energy metabolism in the liver of the zebrafish, *Danio rerio*. In: *BMC genomics* 16, S. 853. DOI: 10.1186/s12864-015-1941-2.
- Bundesinstitut für Risikobewertung; Umweltbundesamt (2013): Häufige Fragen zu Phthalaten bzw. Weichmachern - FAQ des Bundesinstitutes für Risikobewertung (BfR) und des Umweltbundesamtes (UBA) vom 10. Februar 2013. Online verfügbar unter <https://www.umweltbundesamt.de/themen/gesundheit/umwelteinfluesse-auf-den-menschen/chemische-stoffe/weichmacher/haeufige-fragen-zu-phthalaten-bzw-weichmachern#was-sind-phthalate-wozu-dienen-sie>.
- Carpenter, E.J.; Anderson, S.J.; Harvey, G.R.; Miklas, H.P.; Peck, B.B. (1972): Polystyrene spherules in coastal waters. In: *Science (New York, N.Y.)* 178 (4062), S. 749–750.
- 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.
- Cole, M.; Lindeque, P.; Fileman, E.; Halsband, C.; Galloway, T.S. (2015): The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. In: *Environmental science & technology* 49 (2), S. 1130–1137. DOI: 10.1021/es504525u.
- de Sá, L.C.; Oliveira, M.; Ribeiro, F.; Rocha, T.L.; Fütter, M.N. (2018): Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms. What do we know and where should we focus our efforts in the future? In: *The Science of the total environment* 645, S. 1029–1039. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.207.

- Dris, R.; Imhof, H.K.; Löder, M.G.J.; Gasperi, J.; Laforsch, C.; Tassin, B. (2018): Microplastic Contamination in Freshwater Systems. Methodological Challenges, Occurrence and Sources. In: *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*: Elsevier, S. 51–93.
- Espinosa, C.; Cuesta, A.; Esteban, M.Á. (2017): Effects of dietary polyvinylchloride microparticles on general health, immune status and expression of several genes related to stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). In: *Fish & shellfish immunology* 68, S. 251–259. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.07.006.
- Farrell, P.; Nelson, K. (2013): Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). In: *Environmental Pollution* 177, S. 1–3. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.01.046.
- Faure, F.; Corbaz, M.; Baecher, H.; Alencastri, L.F. de (2012): Pollution due to plastics and microplastics in lake Geneva and in the Mediterranean sea. In: *Archives des Sciences* 2012 (65), S. 157–164, zuletzt geprüft am 03.03.2017.
- Fent, K. (1998): Ökotoxikologie. Stuttgart; New York: Thieme Verlag
- Fischer, J.; Domogalla-Urbansky, J.; Ferling, H.; Scholz-Göppel, K.; Schwaiger, J. (2021): Vorkommen und Auswirkungen von Mikroplastik in einheimischen Flussmuscheln (*Unio* sp.). Hg. v. Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU). Augsburg. Online verfügbar unter https://www.lfu.bayern.de/analytik-stoffe/mikroplastik/auswirkung_mikroplastik_flussmuscheln/index.htm.
- Göppert, C.; Harris, R.M.; Theis, A.; Boila, A.; Hohl, S.; Rüegg, A.; Hofmann, H.A.; Salzburger, W.; Böhne, A. (2016): Inhibition of Aromatase Induces Partial Sex Change in a Cichlid Fish. Distinct Functions for Sex Steroids in Brains and Gonads. In: *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 10 (2), S. 97–110. DOI: 10.1159/000445463.
- Harris, C.A.; Henttu, P.; Parker, M.G.; Sumpter, J.P. (1997): The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. In: *Environmental Health Perspectives* 105 (8), S. 802–811. DOI: 10.1289/ehp.97105802.
- Heß, M.; Diehl, P.; Mayer, J.; Rahm, H.; Reifenhäuser, W.; Stark, J.; Schwaiger, J. (2018): Mikroplastik in Binnengewässern Süd- und Westdeutschlands. Bundesländerübergreifende Untersuchungen in Baden-Württemberg, Bayern, Hessen, Nordrhein-Westfalen und Rheinlandpfalz. Teil 1: Kunststoffpartikel in der oberflächennahen Wasserphase. Hg. v. Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg, Bayerisches Landesamt für Umwelt, Hessisches Landesamt für Naturschutz, Umwelt und Geologie, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Landesamt für Umwelt Rheinland-Pfalz.
- Hinton, D.E. (1993): Toxicologic Histopathology of Fishes: A Systemic Approach and Overview. In: John A. Couch und John W. Fournie (Hg.): *Pathobiology of marine and estuarine organisms*. 1. Aufl.: CRC Press, S. 177–216.
- Iheanacho, S. C., & Odo, G. E. (2020a). Dietary exposure to polyvinyl chloride microparticles induced oxidative stress and hepatic damage in *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(17), 21159–21173. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08611-9>
- Iheanacho, S. C., & Odo, G. E. (2020b). Neurotoxicity, oxidative stress biomarkers and haematological responses in African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to polyvinyl chloride microparticles. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 232, 108741. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108741>
- Imhof, H.K.; Ivleva, N.P.; Schmid, J.; Niessner, R.; Laforsch, C. (2013): Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles. In: *Current Biology* 23 (19), R867-R868. DOI: 10.1016/j.cub.2013.09.001.

- Koelmans, A.A.; Mohamed Nor, N.H.; Hermesen, E.; Kooi, M.; Mintenig, S.M.; France, J. de (2019): Microplastics in freshwaters and drinking water. Critical review and assessment of data quality. In: *Water research* 155, S. 410–422. DOI: 10.1016/j.watres.2019.02.054.
- Köhler, H.-R.; Bartussek, C.; Eckwert, H.; Farian, K.; Gränzer, S.; Knigge, T.; Kunz, N. (2001): The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. In: *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8 (3/4), S. 261–279. DOI: 10.1023/A:1012935931161.
- Koltzenburg, S.; Maskos, M.; Nuyken, O.; Mülhaupt, R. (2014): *Polymere. Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*. Berlin: Springer Spektrum. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-34773-3>.
- Lewis, D.F.V. (1996): *Guide to Cytochromes P450. Structure and Function*. 1. Aufl.: CRC Press.
- Lithner, D. (2011): *Environmental and health hazards of chemicals in plastic polymers and products*. Göteborg: Department of Plant and Environmental Science, Faculty of Science, University of Gothenburg.
- Lumesberger-Loisl, F.; Gumpinger, C. (2015): *Mikroplastik in Fischen. Pilotstudie in der oberösterreichischen Donau, zuletzt geprüft am 12.01.2017*.
- Maier, R.-D.; Schiller, M. (2016): *Handbuch Kunststoff-Additive. 4., vollständig neu bearbeitete Auflage*. München: Hanser. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.3139/9783446432918>.
- Mazurais, D.; Ernande, B.; Quazuguel, P.; Severe, A.; Huelvan, C.; Madec, L.; Mouchel, O.; Soudant, P.; Robbens, J.; Huvet, A.; Zambonino-Infante, J. (2015): Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. In: *Marine environmental research* 112 (Pt A), S. 78–85. DOI: 10.1016/j.marenvres.2015.09.009.
- Moore, M.J.; Mitrofanov, I.V.; Valentini, S.S.; Volkov, V.V.; Kurbskiy, A.V.; Zhimbey, E.N.; Eglinton, L.B.; Stegeman, J.J. (2003): Cytochrome P4501A expression, chemical contaminants and histopathology in roach, goby and sturgeon and chemical contaminants in sediments from the Caspian Sea, Lake Balkhash and the Ily River Delta, Kazakhstan. In: *Marine pollution bulletin* 46 (1), S. 107–119. DOI: 10.1016/s0025-326x(02)00325-9.
- Moos, N. von; Burkhardt-Holm, P.; Kohler, A. (2012): Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. In: *Environmental science & technology* 46 (20), S. 11327–11335. DOI: 10.1021/es302332w.
- Navas, J.M.; Segner, H. (2001): Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes. Role of estrogen receptor. In: *Chemico-Biological Interactions* 138 (3), S. 285–298. DOI: 10.1016/s0009-2797(01)00280-0.
- Nelson, E.R.; Habibi, H.R. (2008): Seasonal-related homologous regulation of goldfish liver Estrogen receptor subtypes. In: *Cybium, International Journal of Ichthyology* 32 (2 suppl.), S. 248–249. DOI: 10.26028/cybium/2008-322SP-124.
- Nicholson, J.W. (2006): *The chemistry of polymers*. 3rd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry (Royal Society of Chemistry paperbacks). Online verfügbar unter <http://swbplus.bsz-bw.de/bsz421322047cov.htm>.
- Ogonowski, M.; Schür, C.; Jarsén, Å.; Gorokhova, E. (2016): The Effects of Natural and Anthropogenic Microparticles on Individual Fitness in *Daphnia magna*. In: *PloS one* 11 (5), e0155063. DOI: 10.1371/journal.pone.0155063.

- Pedà, C.; Caccamo, L.; Fossi, M.C.; Gai, F.; Andaloro, F.; Genovese, L.; Perdichizzi, A.; Romeo, T.; Maricchiolo, G. (2016): Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics. Preliminary results. In: *Environmental Pollution* 212, S. 251–256. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.01.083.
- Phillips, M.B.; Bonner, T.H. (2015): Occurrence and amount of microplastic ingested by fishes in watersheds of the Gulf of Mexico. In: *Marine pollution bulletin* 100 (1), S. 264–269. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2015.08.041.
- PlasticsEurope (2020): *Plastics - The Facts 2020*. An analysis of European plastics production, demand and waste data. Hg. v. PlasticsEurope.
- Qiao, R.; Deng, Y.; Zhang, S.; Wolosker, M.B.; Zhu, Q.; Ren, H.; Zhang, Y. (2019): Accumulation of different shapes of microplastics initiates intestinal injury and gut microbiota dysbiosis in the gut of zebrafish. In: *Chemosphere* 236, S. 124334. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.07.065.
- Roch, S.; Brinker, A. (2017): Rapid and Efficient Method for the Detection of Microplastic in the Gastrointestinal Tract of Fishes. In: *Environmental science & technology* 51 (8), S. 4522–4530. DOI: 10.1021/acs.est.7b00364.
- Rochman, C.M.; Hoh, E.; Kurobe, T.; Teh, S.J. (2013): Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. In: *Scientific reports* 3, S. 3263. DOI: 10.1038/srep03263.
- Rummel, C.D.; Löder, M.G.J.; Fricke, N.F.; Lang, T.; Griebeler, E.-M.; Janke, M.; Gerdt, G. (2016): Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from the North Sea and Baltic Sea. In: *Marine pollution bulletin* 102 (1), S. 134–141. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2015.11.043.
- Saykali, M. (2010): *Phthalates and their future in PVC applications - Current status and path forward*. European Council for Plasticizers and Intermediates. Brüssel, Belgien, 10.02.2010.
- Schmiege, H.; Burmester, J.K.Y.; Kraiss, S.; Ruhl, A.S.; Tisler, S.; Zwiener, C.; Köhler, H.-R.; Triebkorn, R. (2020a): Interacting Effects of Polystyrene Microplastics and the Antidepressant Amitriptyline on Early Life Stages of Brown Trout (*Salmo trutta f. fario*). In: *Water* 12 (9), S. 2361. DOI: 10.3390/w12092361.
- Schmiege, H.; Huppertsberg, S.; Knepper, T.P.; Kraiss, S.; Reitter, K.; Rezbach, F.; Ruhl, A.S.; Köhler, H.-R.; Triebkorn, R. (2020b): Polystyrene microplastics do not affect juvenile brown trout (*Salmo trutta f. fario*) or modulate effects of the pesticide methiocarb. In: *Environ Sci Eur* 32 (1), S. 405. DOI: 10.1186/s12302-020-00327-4.
- Schwaiger, J. (2019): *Mikroplastik in bayerischen Seen - Eine Pilotstudie*. Hg. v. Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU). Augsburg (UmweltSpezial).
- Schwaiger, J.; Negele, R.D. (1998): Plasma Vitellogenin – a Blood Parameter to Evaluate Exposure of Fish to Xenoestrogens. In: *Acta Vet. Brno* 67 (4), S. 257–264. DOI: 10.2754/avb199867040257.
- Setälä, O.; Fleming-Lehtinen, V.; Lehtiniemi, M. (2014): Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. In: *Environmental Pollution* 185, S. 77–83. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.10.013.
- Široká, Z.; Drastichová, J. (2004): Biochemical Marker of Aquatic Environment Contamination - Cytochrome P450 in Fish. A Review. In: *Acta Vet. Brno* 73 (1), S. 123–132. DOI: 10.2754/avb200473010123.
- Sonnenschein, C.; Soto, A.M. (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 65 (1-6), S. 143–150. DOI: 10.1016/S0960-0760(98)00027-2.

- Soto, A.M.; Sonnenschein, C.; Chung, K.L.; Fernandez, M.F.; Olea, N.; Serrano, F.O. (1995): The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens. An update on estrogenic environmental pollutants. In: *Environmental Health Perspectives* 103 Suppl 7, S. 113–122. DOI: 10.1289/ehp.95103s7113.
- Talsness, C.E.; Andrade, A.J.M.; Kuriyama, S.N.; Taylor, J.A.; Vom Saal, F.S. (2009): Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 364 (1526), S. 2079–2096. DOI: 10.1098/rstb.2008.0281.
- Teuten, E.L.; Saquing, J.M.; Knappe, D.R.U.; Barlaz, M.A.; Jonsson, S.; Bjorn, A.; Rowland, S.J.; Thompson, R.C.; Galloway, T.S.; Yamashita, R.; Ochi, D.; Watanuki, Y.; Moore, C.; Viet, P.H.; Tana, T.S.; Prudente, M.; Boonyatumanond, R.; Zakaria, M.P.; Akkhang, K.; Ogata, Y.; Hirai, H.; Iwasa, S.; Mizukawa, K.; Hagino, Y.; Imamura, A.; Saha, M.; Takada, H. (2009): Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 364 (1526), S. 2027–2045. DOI: 10.1098/rstb.2008.0284.
- Thompson, R.C.; Olsen, Y.; Mitchell, R.P.; Davis, A.; Rowland, S.J.; John, A.W.G.; McGonigle, D.; Russell, A.E. (2004): Lost at sea: where is all the plastic? In: *Science (New York, N.Y.)* 304 (5672), S. 838. DOI: 10.1126/science.1094559.
- Umweltbundesamt (2016): Mikroplastik: Entwicklung eines Umweltbewertungskonzepts. Erste Überlegungen zur Relevanz von synthetischen Polymeren in der Umwelt (Texte 32 / 2016).
- van Franeker, J.A.; Blaize, C.; Danielsen, J.; Fairclough, K.; Gollan, J.; Guse, N.; Hansen, P.-L.; Heubeck, M.; Jensen, J.-K.; Le Guillou, G.; Olsen, B.; Olsen, K.-O.; Pedersen, J.; Stienen, E.W.M.; Turner, D.M. (2011): Monitoring plastic ingestion by the northern fulmar *Fulmarus glacialis* in the North Sea. In: *Environmental Pollution* 159 (10), S. 2609–2615. DOI: 10.1016/j.envpol.2011.06.008.
- Wagner, M.; Scherer, C.; Alvarez-Muñoz, D.; Brennholt, N.; Bourrain, X.; Buchinger, S.; Fries, E.; Grosbois, C.; Klasmeier, J.; Marti, T.; Rodriguez-Mozaz, S.; Urbatzka, R.; Vethaak, A.D.; Winther-Nielsen, M.; Reifferscheid, G. (2014): Microplastics in freshwater ecosystems. What we know and what we need to know. In: *Environ Sci Eur* 26 (1), S. 1977. DOI: 10.1186/s12302-014-0012-7.
- Werner, S.; Budziak, A.; van Franeker, J.; Galgani, F.; Hanke, G.; Maes, T.; Matiddi, M.; Nilsson, P.; Oosterbaan, L.; Priestland, E.; Thompson, R.; Veiga, J.; Vlachogianni, T. (2016): Harm caused by Marine litter. MSFD GES TG Marine Litter - Thematic Report. Hg. v. European Commission.
- Wolf, J.C.; Wheeler, J.R. (2018): A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. In: *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 197, S. 60–78. DOI: 10.1016/j.aquatox.2018.01.013.
- Xia, X.; Sun, M.; Zhou, M.; Chang, Z.; Li, L. (2020): Polyvinyl chloride microplastics induce growth inhibition and oxidative stress in *Cyprinus carpio* var. larvae. In: *Science of The Total Environment*, S. 136479. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.136479.
- Yamashita, M.; Yabu, T.; Ojima, N. (2010): Stress Protein HSP70 in Fish. In: *Aqua-BioSci. Monogr. (ABSM)* 3 (4), S. 111–141. DOI: 10.5047/absm.2010.00304.0111.

6 Anhang

Tab. 3: Hämatologische Untersuchungsergebnisse bei PVC-exponierten und Kontrollfischen

Parameter	Geschlecht	Kontrolle	Hart-PVC	Weich-PVC
Hämatokrit [%]	m	54,80 ± 3,33	53,55 ± 4,48	53,10 ± 2,95
	w	45,45 ± 3,67	46,78 ± 4,16	43,60 ± 4,63
Hämoglobin [g/dL]	m	10,16 ± 0,64	9,98 ± 0,83	9,75 ± 0,87
	w	9,16 ± 1,89	9,03 ± 0,74	8,37 ± 0,65
Erythrozyten [$10^6/\mu\text{L}$]	m	1,42 ± 0,26	1,26 ± 0,19	1,49 ± 0,25
	w	1,29 ± 0,16	1,32 ± 0,15	1,34 ± 0,15
Leukozyten [$10^3/\mu\text{L}$]	m	22,65 ± 4,75	25,27 ± 6,33	26,02 ± 6,53
	w	27,81 ± 9,79	25,22 ± 9,59	25,92 ± 10,47
Differentialblutbild				
Lymphozyten [%]	m	89,60 ± 5,58	89,64 ± 7,49	91,00 ± 6,24
	w	84,30 ± 7,66	81,33 ± 5,79	88,10 ± 4,91
Stabkernige neutrophile Granulozyten [%]	m	2,00 ± 1,10	2,36 ± 1,72	1,60 ± 1,36
	w	3,65 ± 2,63	4,44 ± 2,01	2,40 ± 1,62
Segmentkernige neutrophile Granulozyten [%]	m	8,35 ± 5,28	8,00 ± 6,24	7,40 ± 5,10
	w	12,05 ± 6,35	14,22 ± 5,49	9,50 ± 4,39
Monozyten [%]	m	0,05 ± 0,22	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	w	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen PVC-exponierten und Kontrolltieren sowie zwischen Hart- und Weich-PVC-Gruppe; m: männlich; w: weiblich

Tab. 4: Analysenergebnisse klinisch-chemischer Parameter bei PVC-exponierten und Kontrollfischen

Parameter	Geschlecht	Kontrolle	Hart-PVC	Weich-PVC
Albumin (g/dL)	m	1,89 ± 0,17	1,77 ± 0,10	1,77 ± 0,18
	w	2,84 ± 0,50	2,57 ± 0,31	2,71 ± 0,24
Gesamteiweiß (g/dL)	m	4,00 ± 0,41	3,75 ± 0,23	3,91 ± 0,40
	w	5,14 ± 0,73	4,62 ± 0,46	4,95 ± 0,49
Alkalische Phosphatase (AP; U/L)	m	69,90 ± 25,18	65,36 ± 15,71	61,00 ± 20,22
	w	74,00 ± 12,70	66,67 ± 23,80	59,90 ± 17,21
Aspartat-Aminotransferase (AST; U/L)	m	143,40 ± 65,51	103,55 ± 22,83	98,20 ± 25,29
	w	105,65 ± 49,66	74,78 ± 15,28	69,20 ± 9,44 **
Alanin-Aminotransferase (ALT; U/L)	m	11,30 ± 5,79	8,36 ± 1,92	6,80 ± 1,78 *
	w	9,00 ± 7,46	6,78 ± 1,62	6,20 ± 0,60
Bilirubin (mg/dL)	m	0,23 ± 0,11	0,22 ± 0,06	0,20 ± 0,00
	w	0,24 ± 0,11	0,36 ± 0,18	0,24 ± 0,12
Kreatinin (mg/dL)	m	0,22 ± 0,04	0,23 ± 0,05	0,23 ± 0,02
	w	0,24 ± 0,05	0,21 ± 0,07	0,27 ± 0,08
Harnstoff (mg/dL)	m	1,51 ± 0,04	1,65 ± 0,37	1,50 ± 0,00
	w	1,85 ± 1,08	1,82 ± 0,88	1,86 ± 0,70
Triglyceride (mg/dL)	m	267,95 ± 65,54	238,82 ± 35,48	249,00 ± 59,95
	w	454,70 ± 115,00	421,00 ± 107,55	372,4 ± 64,88
Calcium (mg/dL)	m	10,89 ± 0,53	11,20 ± 1,09	11,24 ± 0,34
	w	17,35 ± 1,57	17,93 ± 1,16	16,22 ± 0,83 #
Magnesium (mg/dL)	m	2,85 ± 0,22	3,02 ± 0,49	2,79 ± 0,16
	w	3,39 ± 0,39	3,29 ± 0,30	3,12 ± 0,22
Lactatdehydrogenase (U/L)	m	381,40 ± 101,70	402,45 ± 122,56	349,10 ± 69,07
	w	461,90 ± 177,48	444,89 ± 203,39	377,30 ± 97,77
Cholesterin (mg/dL)	m	234,40 ± 41,87	231,91 ± 42,09	225,90 ± 33,24
	w	229,45 ± 30,90	201,78 ± 26,92	213,90 ± 21,48
Glukose (mg/dL)	m	91,10 ± 11,76	123,18 ± 68,25	97,20 ± 17,23
	w	75,40 ± 9,89	76,89 ± 11,28	79,40 ± 6,42

* $p < 0,05$, ** $< 0,01$: statistisch signifikante Unterschiede zwischen PVC-exponierten und Kontrolltieren; # $p < 0,05$: statistisch signifikante Unterschiede zwischen Hart- und Weich-PVC-Gruppe; m: männlich; w: weiblich

Tab. 5: Analysenergebnisse verschiedener Biomarker bei PVC-exponierten und Kontrollfischen

Parameter	Geschlecht	Kontrolle	Hart-PVC	Weich-PVC
11-Keto-Testosteron (ng/mL)	m	18,5 ± 10,38	19,2 ± 13,03	30,4 ± 16,02
	w	12,0 ± 8,03	4,9 ± 8,14**	3,4 ± 1,06***
Testosteron (ng/mL)	m	183 ± 151,31	157 ± 228,51	128 ± 76,48
	w	253 ± 258,02	229 ± 364,94	118 ± 55,19
Aromatase (ng/mL)	m	8,9 ± 1,64	13,7 ± 7,37**	10,9 ± 1,78
	w	33,0 ± 9,69	36,1 ± 10,29	36,7 ± 9,14
17β-Estradiol (ng/mL)	m	13,4 ± 2,37	23,4 ± 12,11***	17,0 ± 3,23*
	w	43,8 ± 10,87	55,8 ± 14,58*	56,8 ± 10,08*
Vitellogenin (ng/mL)	m	8,18 ± 7,92	10,79 ± 11,37	36,08 ± 55,66*
Hsp70 (pg/mL)	m	126 ± 53,29	271 ± 81,43***	169 ± 74,22
	w	81 ± 13,92	113 ± 32,90###	73 ± 10,92
Cytochrom P450 1A1 (pg/mL)	m	695 ± 219,59	669 ± 193,12	546 ± 128,08
	w	447 ± 77,58	396 ± 104,16	304 ± 50,70***
Kortisol (ng/mL)	m	16,0 ± 7,46	19,1 ± 10,42	12,3 ± 6,89
	w	16,7 ± 7,83	19,9 ± 8,18	17,4 ± 4,97

* p < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001: statistisch signifikante Unterschiede zwischen PVC-exponierten und Kontrolltieren; # p < 0,01: statistisch signifikante Unterschiede zwischen Hart- und Weich-PVC-Gruppe; m: männlich, w: weiblich



Eine Behörde im Geschäftsbereich
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz

