

Einfluss der Antidepressiva Citalopram und  
Venlafaxin auf Biomarker und das Verhalten  
der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*)

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Michael Ziegler  
aus Koblenz

Tübingen  
2021

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

Tag der mündlichen Qualifikation:	23.07.2021
Dekan:	Prof. Dr. Thilo Stehle
1. Berichterstatterin:	apl. Prof. Dr. Rita Triebskorn
2. Berichterstatter:	apl. Prof. Dr. Thomas Braunbeck



Ach, immer dieser Biologismus.

– **das Känguru** (aus Marc-Uwe Klings „Die Känguru-Offenbarung“)

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
Teil 1: Zusammenfassung .....	10
1 Promotionsthema.....	10
2 Zusammenfassung.....	10
3 Einleitung.....	15
4 Übergeordnete Fragestellungen .....	23
5 Material und Methoden .....	24
6 Ergebnisse und Diskussion .....	48
7 Synthese .....	65
8 Referenzen .....	90
Teil 2: Eigenanteil an den durchgeführten Arbeiten in den zur Dissertation eingereichten Publikationen und Manuskripten.....	110
Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten .....	113
Kapitel I: Impact of the antidepressant citalopram on the behaviour of two different life stages of brown trout .....	113
Kapitel II: Behavioral and Developmental Changes in Brown Trout After Exposure to the Antidepressant Venlafaxine .....	142
Kapitel III: Biochemical and cellular biomarkers in brown trout ( <i>Salmo trutta f. fario</i> ) in response to the antidepressants citalopram and venlafaxine.....	172
Kapitel IV: The role of behavioural toxicology in environmental protection: A consensus statement .....	199
Anhang .....	222
Publikationsliste und Konferenzbeiträge .....	230
Danksagung .....	232

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
&	und
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µS	Mikrosiemens
5-HT	Serotonin ( <b>5-Hydroxytryptamin</b> )
A	Ampere
ACE-Hemmer	<b>Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer</b>
AChE	Acetylcholinesterase
AcSch	Acetylthiocholiniodid
AG	Arbeitsgruppe
AMG	Arzneimittelgesetz
ANOVA	Varianzanalyse ( <b>analysis of variance</b> )
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	einfach destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin ( <b>bovine serum albumin</b> )
bzw.	beziehungsweise
CAS	<b>C</b> hemical <b>A</b> bstracts <b>S</b> ervice; CAS-Nummer: internationaler Bezeichnungsstandard für chemische Stoffe
CbE	<b>C</b> arboxylesterase
CEC	kritische Umweltkonzentration ( <b>predicted critical environmental concentration</b> )
CIT	<b>C</b> italopram
cm	Zentimeter
CYP	<b>C</b> ytochrome <b>P</b> 450
d	Tag
DCT	<b>D</b> esmethyl <b>c</b> italopram
DDCT	<b>D</b> idesmethyl <b>c</b> italopram
DDD	definierte Tagesdosis ( <b>defined daily dose</b> )
DILUTION	Verdünnungsfaktor ( <b>dilution factor</b> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <b>deoxyribonucleic acid</b> )

DOSEai	höchste empfohlenen Tagesdosis des Medikaments (maximum daily <b>dose</b> consumed per inhabitant)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <b>ethylendiamintetraacetat</b> )
EG	<b>Europäische Gemeinschaft</b>
ELISA	Antikörperbasiertes Nachweisverfahren ( <b>enzyme-linked immunosorbent assay</b> )
EMA/EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur ( <b>European Medicines Evaluation Agency/European Medicines Agency</b> )
EPA	Amerikanische Umweltschutzbehörde ( <b>Environmental Protection Agency</b> )
<i>et al.</i>	und andere (lat.: <i>et alii</i> )
etc.	und so weiter (lat.: <i>et cetera</i> )
EU	<b>Europäische Union</b>
EW	Einwohner
Fpen	Marktdurchdringungsfaktor ( <b>fraction of market penetration</b> )
g	Gramm
$\vec{g}$	Fallbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> ), entspricht der relativen Zentrifugalkraft (relative centrifugal force – rcf)
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure ( <b>gamma-aminobutyric acid</b> )
h	Stunde
HBr	Bromwasserstoff
HCl	Chlorwasserstoff
HE	<b>Hämatoxylin-Eosin</b>
HPA	Hypothalamus Hypophyse Nebennierenrinde Achse ( <b>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</b> )
HPI	Hypothalamus-Hypophyse-Interrenal-Achse ( <b>hypothalamic-pituitary-interrenal axis</b> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <b>high-performance liquid chromatography</b> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <b>horseradish peroxidase</b> )
Hsp70	Hitzeschockproteine mit dem Molekulargewicht 70 kDa ( <b>heatshockprotein 70 kDa</b> )
ID	Identifikator
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
K <sub>ow</sub>	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

L	Liter
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (Liquid chromatography–mass spectrometry)
lm	Lumen
log	Logarithmus
logD	dekadischer Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten bei unterschiedlichem pH
logP	dekadischer Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten bei unterschiedlicher Dissoziation ionisierbarer Substanzen
M	Molar (Stoffmengenkonzentration)
mA	Milliampere
MEC	gemessene Umweltkonzentration ( <b>measured environmental concentration</b> )
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Stoffmengenkonzentration)
MS222	Tricain-Methansulfonat
mU	Milliunit
NDV	<b>N-Desmethylvenlafaxin</b>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NODV	<b>N,O-Desmethylvenlafaxin</b>
NOEC	höchste Konzentration eines Stoffes die in einem ökotoxikologischen Test keinen Effekt zeigt ( <b>no observed effect concentration</b> )
NPA	<b>p-Nitrophenylacetat</b>
NPV	<b>p-Nitrophenylvalerat</b>
ODV	<b>O-Desmethylvenlafaxin</b>
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung ( <b>Organisation for Economic Co-operation and Development</b> )
OGewV	<b>Oberflächengewässerverordnung</b>
PAS	Perjodsäure-Schiffs Reagenz ( <b>periodic acid-Schiff</b> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <b>phosphate-buffered saline</b> )
PCP	persönliche Pflegeprodukte ( <b>personal care products</b> )



PEC	vorausgesagte Umweltkonzentration ( <b>p</b> redicted <b>e</b> nvironmental <b>c</b> oncentration)
pg	Pikogramm
pK <sub>a</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PNEC	Konzentration bei der kein Effekt erwartet wird ( <b>p</b> redicted <b>n</b> o <b>e</b> ffect <b>c</b> oncentration)
POP	persistente organische Schadstoffe ( <b>p</b> ersistent <b>o</b> rganic <b>p</b> ollutants)
Q-TOF-MS	Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer ( <b>q</b> uadrupole- <b>t</b> ime- <b>o</b> f- <b>f</b> light <b>m</b> ass <b>s</b> pectrometry)
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung ( <b>r</b> elative <b>c</b> entrifugal <b>f</b> orce)
QuEChERS	Probenvorbereitungsmethode ( <b>Q</b> uick, <b>E</b> asy, <b>C</b> heap, <b>E</b> fficient, <b>R</b> ugged, <b>S</b> afe)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <b>r</b> eactive <b>o</b> xygen <b>s</b> pecies)
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <b>r</b> evolutions <b>p</b> er <b>m</b> inute)
RQ	<b>R</b> isiko <b>q</b> uotient
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <b>s</b> odium <b>d</b> odecyl <b>s</b> ulphate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese ( <b>s</b> odium <b>d</b> odecyl <b>s</b> ulphate <b>p</b> olyacrylamide <b>g</b> el <b>e</b> lectrophoresis)
SERT	Serotonin Wiederaufnahmetransporter ( <b>s</b> erotonin <b>r</b> euptake <b>t</b> ransporter)
SNRI	Serotonin und Noradrenalin Wiederaufnahmehemmer ( <b>s</b> erotonin and <b>n</b> oradrenalin <b>r</b> euptake <b>i</b> nhibitor)
SOD	<b>S</b> upero <b>x</b> iddismutase
SSRI	selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer ( <b>s</b> elective <b>s</b> erotonin <b>r</b> euptake <b>i</b> nhibitor)
SW	Oberflächengewässer ( <b>s</b> urface <b>w</b> ater)
t	Tonne
TBS	Tris gepufferte Salzlösung ( <b>t</b> ris- <b>b</b> uffered <b>s</b> aline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'- <b>T</b> etramethyl <b>b</b> enzidin
Tris	<b>Tris</b> (hydroxymethyl)aminomethan
TZA	trizyklische Antidepressiva
U	Enzymeinheit Unit
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem

VEN	<b>Venlafaxin</b>
v/v	Volumen/Volumen Verhältnis ( <b>v</b> olume/ <b>v</b> olume)
v/w	Volumen/Gewicht Verhältnis ( <b>v</b> olume/ <b>w</b> eight)
WASTEWinhab	Anzahl Abwasser pro Einwohner pro Tag (amount of <b>w</b> astewater per <b>i</b> nhabitant per day)
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <b>W</b> orld <b>H</b> ealth <b>O</b> rganization)
WRRL	<b>W</b> asserrahmenrichtlinie
ZAG	<b>Z</b> entrum für <b>A</b> ngewandte <b>G</b> eowissenschaften der Universität Tübingen
z.B.	zum Beispiel

# Teil 1: Zusammenfassung

## 1 Promotionsthema

Einfluss der Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin auf Biomarker und das Verhalten der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*)

## 2 Zusammenfassung

### 2.1 Grafische Zusammenfassung

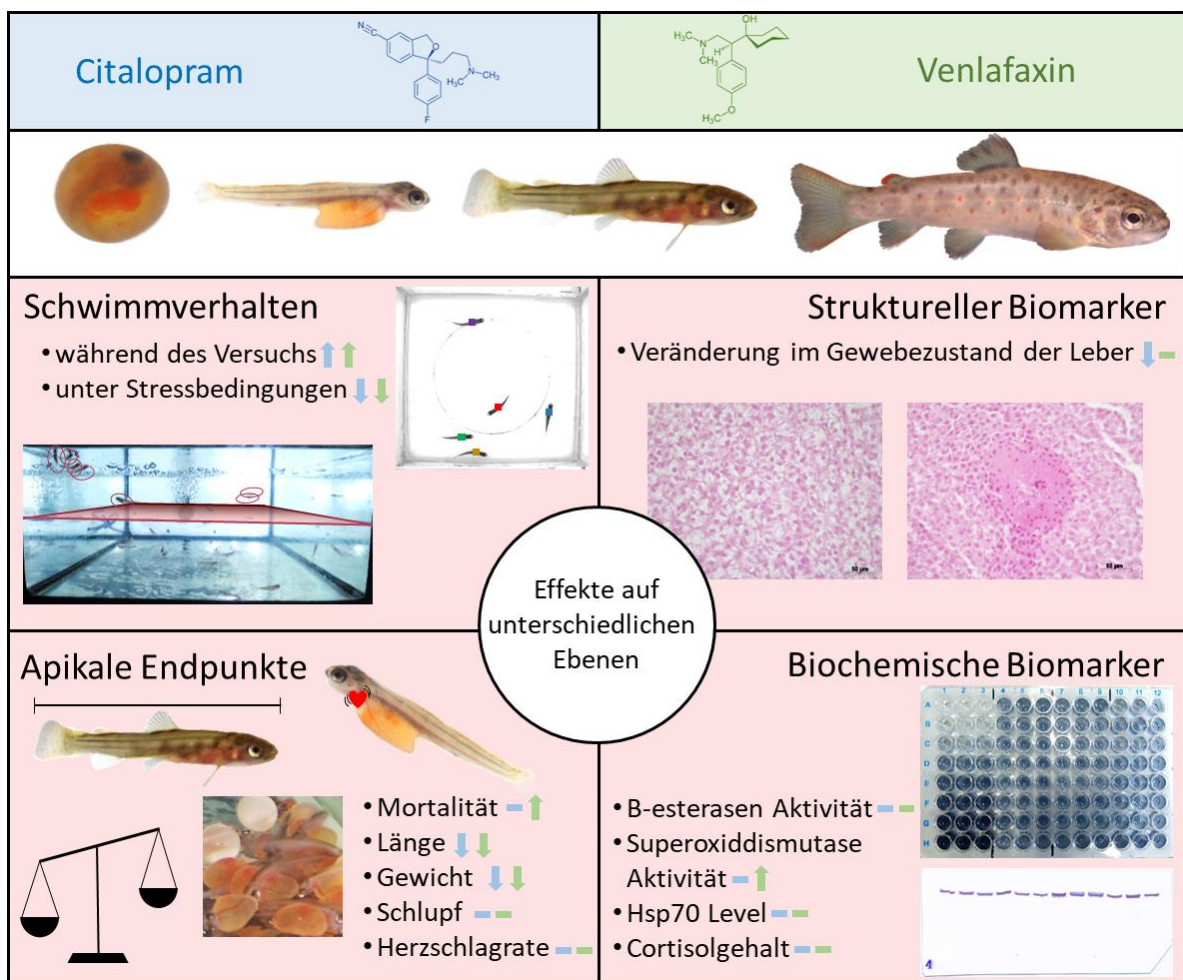


Abbildung 1: Grafische Zusammenfassung der vorliegenden Arbeit

## 2.2 Deutsche Zusammenfassung

Weltweit steigen die Zahlen der an Depressionen erkrankter Menschen seit Jahren an. Zur Behandlung dieser Erkrankung werden im großen Umfang Antidepressiva verschrieben. Damit einhergehend nahmen in den letzten Jahrzehnten auch die Verschreibungszahlen dieser Pharmazeutikagruppe zu. Durch ihre häufige Verwendung und dadurch, dass diese Stoffe teilweise unverändert ausgeschieden und über Abwassersysteme in Kläranlagen gelangen, in denen sie nicht vollständig eliminiert werden, werden diese Antidepressiva immer häufiger und in höheren Konzentrationen in Oberflächengewässern nachgewiesen. Da diese Substanzen mit der Hemmung der Wiederaufnahme von Neurotransmittern wie Serotonin und/oder Noradrenalin einen sehr konservierten Wirkmechanismus haben, können diese Stoffe auch auf Nicht-Zielorganismen in der aquatischen Umwelt wirken.

Die beiden in Deutschland am häufigsten verschriebenen Antidepressiva sind Citalopram und Venlafaxin. Sie gehören zu der Gruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer bzw. der Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer. Beide Substanzen werden weltweit in Oberflächengewässern nachgewiesen. Zudem belegen verschiedene Studien, dass Citalopram und Venlafaxin das Verhalten von Fischen beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit ist in das Verbundprojekt Effekt-Net eingebettet, welches die Effekte häufig konsumierter Substanzen und Medikamente, wie Antidiabetika, Antidepressiva und Zuckerersatzstoffe untersucht. Auf der Basis der Projektergebnisse sollen Leitlinien für gesellschaftliche und politische Entscheidungen erstellt werden, die das Konsumverhalten von Menschen ändern sowie den Eintrag dieser Substanzen in die Umwelt vermindern sollen. Um Effekte der Stoffe auf aquatische Organismen abschätzen zu können, wurden Bachforellen in unterschiedlichen Lebensstadien (larval und juvenil) gegenüber umweltrelevanten und höheren Konzentrationen der Antidepressiva Venlafaxin und Citalopram exponiert und Effekte auf Verhalten, Wachstum, Entwicklung sowie verschiedene strukturelle und biochemische Biomarker erfasst. Es zeigte sich, dass sowohl Citalopram als auch Venlafaxin negative Auswirkungen auf das Verhalten und Wachstum von Bachforellen hatten. Bachforellen, die gegenüber hohen Konzentrationen der beiden Antidepressiva exponiert waren, zeigten während des Versuchs einen vermehrten Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte. Zudem war die Aktivität der Fische unter Stress verringert. Beides konnte unter anderem auf die angsthemmende Wirkung der Stoffe zurückgeführt werden. Citalopram führte bei hohen Konzentrationen zu einem verringerten Wachstum von Bachforellenlarven und juvenilen Tieren. Venlafaxin dagegen zeigte diesen Effekt nur bei exponierten Larven. Es konnte ein Trend zu erhöhter Mortalität bei gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin exponierten Bachforellenlarven gezeigt werden. Citalopram dagegen hatte keine Auswirkungen auf die Mortalität

der Tiere. Weiterhin konnte für Citalopram ein leberschädigender Effekt ab 100 µg/L sowie eine Verringerung des Glykogengehalts in der Leber ab 1000 µg/L nachgewiesen werden. Venlafaxin zeigte dagegen keine Effekte auf den Gewebezustand der Leber. Bereits ab 10 µg/L Venlafaxin kam es zu einer Erhöhung der Superoxiddismutase-Aktivität, einem Marker für oxidativen Stress. Beide Stoffe zeigten keine Effekte auf die Schlupf- und Herzschlagrate exponierter Bachforellenlarven. Auch die B-Esterasen-Aktivität (Marker für Neurotoxizität) sowie das Hsp70-Level (Marker für Proteotoxizität) und der Cortisolgehalt (Marker für Stress) wurden durch die Exposition gegenüber Citalopram und Venlafaxin nicht verändert.

Insgesamt konnte für beide Antidepressiva eine angsthemmende Wirkung bei Bachforellen nachgewiesen werden. Zudem können alle gezeigten Effekte auf Wirkungen und Nebenwirkungen, die bereits beim Menschen für beide Antidepressiva bekannt sind, zurückgeführt werden. Zudem waren die auftretenden Effekte bei Bachforellenlarven stärker ausgeprägt, was nicht eindeutig auf die Expositionszeit, die Temperatur oder das Lebensstadium zurückzuführen war. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin starke Auswirkungen auf Nicht-Zielorganismen wie Bachforellen haben können und ein Umweltrisiko durch beide Substanzen nicht ausgeschlossen werden kann.

## 2.3 English Abstract

Since the 1990 years, there is a worldwide increase in diagnosed depressions. Accompanied with this, the prescription rates of pharmaceuticals treating depression is raising. These antidepressants are partly excreted unchanged and enter wastewater treatment plants via the sewage system. Here, antidepressants are not eliminated completely and can therefore enter surface waters. In the last decades, antidepressants are found frequently in surface waters with increasing concentrations. These groups of pharmaceuticals have a very conserved mode of action, namely inhibiting the reuptake of neurotransmitter like serotonin and/or noradrenalin, which makes influences of antidepressants on exposed aquatic organisms highly probable. In Germany, citalopram and venlafaxine are the most prescribed antidepressants and belong to the groups of selective serotonin or serotonin and noradrenalin reuptake inhibitors, respectively. Both substances were frequently found in populated areas all around the world. Furthermore, in several studies, both antidepressants showed adverse effects in aquatic species, including behavioural changes in fish.

The work in hand is embedded in the project Effect-Net, which investigates the effects of high consumption chemicals such as antidiabetics, antidepressants and artificial sweeteners in aquatic species. The results aim at having repercussions on political and cultural discussions and, as a consequence, at reducing the discharge of these chemicals into the environment. To provide information on antidepressant-related effects in feral fish, in the present work brown trout were exposed against environmentally relevant up to explicitly higher concentrations of the antidepressants citalopram and venlafaxin in two different life stages. Possible impact on behaviour, growth, development, health and different biochemical biomarkers were assessed. It became apparent that citalopram and venlafaxine both affected behaviour and growth of fish. When exposed to high concentrations of either citalopram or venlafaxine fish stayed longer time in the upper part of the aquaria near the water surface during the exposure. In addition, the overall activity of exposed fish was decreased in a stressful environment setup. Both can be attributed to the anti-anxiety effect of the two pharmaceuticals. Citalopram led to a decreased growth in fish exposed to 1000 µg/L. Similarly, venlafaxine exposure resulted in a reduced growth of exposed brown trout larvae but not juvenile brown trout. However, a trend to increased mortality in brown trout larvae exposed to 1000 µg/L venlafaxine could be shown, whilst citalopram did not affect mortality. Histopathological examination of livers of brown trout exposed to at least 100 µg/L citalopram showed a decreased health of fish. An exposure to 1000 µg/L citalopram led to a reduction in liver glycogen content. Venlafaxine did not result in any histological alterations in the liver. Though, venlafaxine exposed brown trout showed an increased superoxide dismutase activity, which is a marker for oxidative stress. Both substances did not have any effect on the hatching rate and heart rate of exposed brown

trout larvae. Likewise, neither citalopram nor venlafaxine did alter the B-esterase activity (marker for neurotoxicity), the Hsp70 level (marker for proteotoxicity) or the muscle- and kidney tissue cortisol (marker for stress) content of brown trout.

Altogether, for both antidepressants an anti-anxiety effect in brown trout could be shown. All observed effects can be related to effects and side-effects known for humans. Likewise, the differences between the substances can be explained. All shown effects were stronger in brown trout larvae; however, the effects could not be attributed to particularly to the exposure time, the temperature or the life stage. Summarising, the effects support the conclusion, that the antidepressants citalopram and venlafaxine have effects on non-target organisms like brown trout. Furthermore, comparing the results with environmental concentrations and applying safety factors, an environmental risk posed by either citalopram or venlafaxine cannot be excluded.

### 3 Einleitung

Wasserressourcen und aquatische Ökosysteme sind durch verschiedene anthropogene Einflüsse bedroht. Hierzu zählen die Schifffahrt oder Einleitungen von Abwässern in Oberflächengewässer, aber auch der menschengemachte Klimawandel, der zu steigenden Wassertemperaturen und mehr Extremwetterereignissen wie Dürren oder Fluten führt (Oki & Kanae, 2006). Eine weitere Bedrohung stellt die stetige anthropogene Verschmutzung der Umwelt mit Chemikalien und Spurenstoffen dar (Schwarzenbach *et al.*, 2010). Zum Schutz der Ressource Wasser und zur Verbesserung des Zustands aquatischer Ökosysteme wurde im Jahr 2000 die europaweite Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) verfasst. Diese hat u.a. zum Ziel, Süßwasserressourcen zu schützen, diese nachhaltig zu bewirtschaften, die Last durch prioritäre Stoffe zu reduzieren sowie deren Freisetzung zu verhindern. Weiterhin soll die Trinkwasserverschmutzung reduziert und die Auswirkungen von Überschwemmungen und Dürren vermindert werden (EU, 2000). Ziel ist es, dass bis 2027 alle Gewässer Europas, sowohl Oberflächengewässer als auch das Grundwasser, in einem guten chemischen und ökologischen Zustand sind. Die Beurteilung des Zustands erfolgt sowohl anhand von biologischen Komponenten, wie der Zusammensetzung und Abundanz der Flora, Invertebraten- und Fischfauna, hydromorphologischen Komponenten, wie Durchgängigkeit und Struktur des Gewässers, als auch anhand von chemischen und physikalischen Parametern, wie der Temperatur oder des pH-Wertes (EU, 2000). Bezüglich der Chemikalienbelastung wurde eine Liste an 45 prioritären Stoffen erstellt, die ein erhebliches Risiko für die aquatische Umwelt darstellen (EU, 2013). Diese umfasst unter anderem viele der bereits seit den 1970er Jahren im Fokus stehenden, persistenten organischen Schadstoffe (**p**ersistent **o**rganic **p**ollutants – POP). 2015 wurde die erste zusätzliche Beobachtungsliste erstellt, die Stoffe enthält, „[...] die nach verfügbaren Informationen ein erhebliches Risiko für [...] die aquatische Umwelt [...] darstellen, für die aber keine ausreichenden Überwachungsdaten vorliegen [...]“ (EU, 2015). Am 4. August 2020 wurde diese Liste zuletzt aktualisiert und enthält unter anderem „aufkommende Schadstoffe“ („emerging pollutants“), die mittlerweile in sehr großen Mengen verwendet und verbraucht werden (Ellis, 2006). Hierzu gehören unter anderem Antibiotika, wie Ciprofloxacin und Amoxicillin oder auch das Antidepressivum Venlafaxin sowie dessen Hauptmetabolit O-Desmethylvenlafaxin (EU, 2020). Weiterhin wurden in Deutschland noch zusätzlich 67 flussgebietsspezifische Schadstoffe auf die Liste aufgenommen (OGewV, 2016). Für all diese Stoffe wurden Umweltqualitätsnormen festgelegt, deren Überschreitung zu einer negativen Bewertung des chemischen Zustands eines Gewässers führt.

Nach Beschluss des Europäischen Parlaments und Rates im Jahr 2000 bestand zu Beginn nur die Umsetzung der Wasserrahmenrichtlinie in nationales Recht, gefolgt von einer ersten Bestandsaufnahme und Überwachungs- bzw. Monitoringprogrammen. Darauf folgen die drei Bewirtschaftungszyklen der Wasserrahmenrichtlinie, welche jeweils in den Jahren 2015, 2021 und



2027 enden. Ziel ist es, dass alle Gewässer der EU ab dem Jahr 2027 einen guten chemischen und ökologischen Zustand aufweisen. Die Erkenntnisse des bereits abgeschlossenen ersten Bewirtschaftungszyklus ergaben, dass in Deutschland sich nur etwa 8 % der Oberflächengewässer in einem guten ökologischen und 100 % der Oberflächengewässer in einem chemisch „nicht guten“ Zustand befinden (Völker & Mohaupt, 2016). Aufgrund dessen wurden für 92 % der Oberflächengewässer Fristverlängerungen zum Erreichen des guten Zustands, bis 2021 bzw. 2027 in Anspruch genommen (Völker & Mohaupt, 2016).

In Oberflächengewässern sind eine Vielzahl von Substanzen in Konzentrationen von pg/L bis µg/L nachzuweisen, wie beispielsweise Pestizide, Düngemittel, Industriechemikalien, persönliche Pflegeprodukte (**p**ersonal **c**are **p**roducts – PCP), Waschmittel oder auch Medikamente (Acuña *et al.*, 2015; Corcoran *et al.*, 2010; Loos *et al.*, 2009; Schwarzenbach *et al.*, 2006). Diese führen zu einer Gewässerverschmutzung, die bereits seit über einem halben Jahrhundert in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben ist und erforscht wird (Bick, 1963; Faust & Aly, 1964; Key, 1956; Sproul & Ryckman, 1961). Vor diesem Hintergrund entwickelte sich aus der Umweltchemie und der Toxikologie der Forschungsbereich der Ökotoxikologie (Fent, 2013). Diese untersucht Schadwirkungen anthropogener Substanzen auf die Umwelt auf unterschiedlichen Ebenen, von suborganismischen Effekten bis hin zu Auswirkungen auf ganze Ökosysteme. Der Fokus der ökotoxikologischen Forschung lag jedoch zu Beginn auf der Erforschung der Verschmutzung durch erhöhte Einträge von Phosphor und Stickstoff oder durch Pestizide und persistente organische Schadstoffe (POP) (Fent, 2013). Seit den 1990er Jahren stieg das Verordnungsvolumen von Arzneimitteln stetig an (Schwabe *et al.*, 2019). Damit einhergehend wurden seit den 1990er Jahren Pharmazeutika in immer größeren Mengen in Oberflächengewässern nachgewiesen (Zwiener & Frimmel, 2004). Aufgrund dessen traten Pharmazeutika auch immer weiter in den Fokus der Ökotoxikologie.

Pharmazeutika werden für den Zweck, spezifische Wirkungen in Menschen bzw. in Haus- und Nutztieren hervorzurufen, hergestellt und konzipiert. Aufgrund ihrer inhärenten Eigenschaften, wie zum Beispiel ihrer Lipophilität, die die Membranpassage erleichtert, oder ihrer Persistenz, die sofortigen Abbau zu inaktiven Metaboliten verhindert, können viele Pharmazeutika beispielsweise über häusliches Abwasser in aquatische Ökosysteme gelangen und dort verweilen bzw. ihre Wirkung bei exponierten Organismen entfalten (Halling-Sørensen *et al.*, 1998). Wirkmechanismen bzw. Targets vieler Medikamente sind evolutionär stark konserviert, weshalb sie auch in aquatischen Nicht-Zielorganismen wirkmechanismus-spezifische Effekte sowie bekannte Nebenwirkungen hervorrufen können (Gunnarsson *et al.*, 2008).

Generell werden Medikamente von Patienten aufgenommen und im Körper zu wirksamen oder weniger wirksamen Metaboliten umgebaut oder teilweise unverändert über den Urin oder Faeces des Patienten ausgeschieden. Diese ausgeschiedenen Stoffe gelangen über den Abwasserpfad in Kläranlagen. Hier können sie abgebaut und teilweise weiter transformiert werden, wobei jedoch die Wirkweise der Transformationsprodukte variiert, oder es kann auch kein Abbau der Ausgangssubstanz stattfinden. Anschließend gelangen sowohl Ursprungssubstanzen als auch Metabolite und Transformationsprodukte über das gereinigte Abwasser in Oberflächengewässer (Golovko *et al.*, 2014; Halling-Sørensen *et al.*, 1998).

Für zahlreiche Pharmazeutika konnten bereits Effekte bei aquatischen Organismen in umweltrelevanten Konzentrationen nachgewiesen werden. Beispielsweise konnte in unterschiedlichen Studien gezeigt werden, dass bereits sehr niedrige Konzentrationen von 4 – 5 ng/L des Kontrazeptivums 17- $\alpha$ -Ethinylestradiol zur Verweiblichung von Fischen, zu Störungen der Reproduktion bis hin zum Zusammenbrechen ganzer Populationen führen kann (Kidd *et al.*, 2014; Länge *et al.*, 2001; Nash *et al.*, 2004). Ein anderes Medikament, das nicht-steroidale Antiphlogistikum Diclofenac, zeigte in umweltrelevanten Konzentrationen bei Fischen starke Schädigungen der Leber und Niere (Schwaiger *et al.*, 2004; Tribskorn *et al.*, 2004; Tribskorn *et al.*, 2007). Und auch neuroaktive Substanzen, wie die Antidepressiva Citalopram und Sertralin oder das Benzodiazepin Oxazepam, führten zu Verhaltensänderungen bei Fischen im umweltrelevanten Bereich (Brodin *et al.*, 2013; Kellner *et al.*, 2015; Porseryd *et al.*, 2017; Valenti *et al.*, 2012).

Zur Regulierung der Umwelteffekte von Pharmazeutika wurden 2001 Richtlinien zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Arzneimittel von der EU erlassen. Diese besagen in Artikel 8 bzw. 12, dass bei der Neuzulassung von Human- und Veterinärarzneimitteln teilweise Unterlagen zu Umweltrisiken bereitgestellt werden müssen (EU, 2001a, b). Diese Direktiven wurden anschließend in das Deutsche Arzneimittelgesetz implementiert (AMG, 1976). Die Bewertung der Umweltrisiken von Humanpharmazeutika nach Richtlinie 2001/83/EG verläuft in zwei Phasen (EU, 2001b). In Phase I wird das Risiko für eine Umweltexposition abgeschätzt. Falls die vorausgesagte Umweltkonzentration (**p**redicted **e**nvironmental concentration – PEC) höher als 10 ng/L ist, wird das Medikament in Phase II A einer vertieften Umweltprüfung unterzogen (EMA, 2006). Hierbei werden unter anderem Tests mit Algen, Daphnien und Fischen sowie Atmungshemmtests mit Belebtschlamm und Tests zur Abbaubarkeit gefordert. Falls die in Phase II A vorausgesagte Umweltkonzentration (PEC) höher eingeschätzt wird als die Konzentration, bei der kein Effekt erwartet wird (**p**redicted **n**o-**e**ffect concentration – PNEC), werden in Phase II B weitere Informationen, unter anderem zu terrestrischen Wirkungen oder Metabolitenstudien, nachgefordert. Falls weiterhin ein Risiko besteht, wird die Zulassung unter Auflagen, wie einer speziellen Kennzeichnung oder Entsorgungsempfehlungen,

erteilt (EMA, 2006). Eine Versagung der Zulassung ist für Humanarzneimittel aus Umweltgründen nicht möglich. Arzneimittel, die vor der Implementierung der Direktiven zugelassen wurden, fallen ebenso wenig unter diese Richtlinien wie Vitamine, homöopathische und pflanzliche Arzneimittel (AMG, 1976). Ähnlich zu den Humanarzneimitteln erfolgt die Bewertung der Umweltrisiken für Tierarzneimittel, denen im Gegensatz zu Humanarzneimitteln jedoch eine Zulassung aufgrund eines Umweltrisikos versagt werden kann (EU, 2001a, b).

Eine sehr wichtige Gruppe an Pharmazeutika sind Antidepressiva, die v.a. zur Behandlung von Depressionen angewandt werden. Depression ist eine psychische Erkrankung, die sich unter anderem durch Desinteresse, Traurigkeit, Verlust an Genussfähigkeit oder Niedergeschlagenheit äußert (Liu *et al.*, 2020; Reuter, 2004; WHO, 2020). Sie wird von der WHO als die Erkrankung mit der größten Krankheitslast weltweit eingeschätzt (Smith, 2014). Es wird angenommen, dass mehr als 300 Millionen Menschen weltweit an Depressionen leiden (Liu *et al.*, 2020). Neuere Daten besagen, dass die Zahlen der an Depressionen erkrankten Personen seit 1990 bis 2017 um knapp 50 % gestiegen sind (Liu *et al.*, 2020). Damit einhergehend stiegen seit 1990 auch die Verschreibungszahlen von Antidepressiva in verschiedenen Ländern (Abbildung 2) (OECD, 2019b).

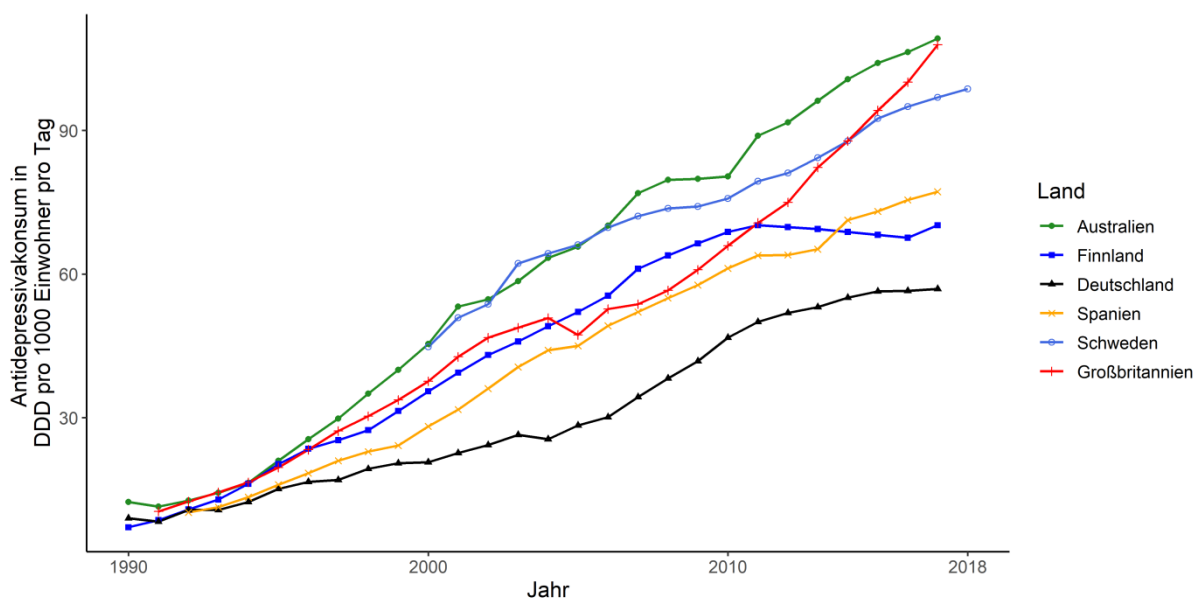


Abbildung 2: Antidepressivakonsum ausgewählter Industrieländer in den Jahren 1990 bis 2018. Der Konsum ist definiert als die Anzahl definierter Tagesdosen (defined daily dose – DDD) pro Tausend Einwohner pro Tag. Quelle: OECD (2019b)

Ebenso stieg in Deutschland in den letzten 10 Jahren das Verordnungsvolumen von Psychopharmaka um 30 %, wobei der Großteil auf den Anstieg der Verordnungen von Antidepressiva zurückzuführen ist (Schwabe *et al.*, 2019). Betrachtet man die Zahlen der drei am meisten verordneten Medikamentengruppen in Deutschland, machen Angiotensinhemmstoffe wie der ACE-Hemmer Ramipril, Analgetika wie Paracetamol und Psychopharmaka wie die Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin knapp 23 % der Gesamtverordnungen aus. Allein die Verordnungen der Psychopharmaka

umfassten im Jahr 2018 etwa 7 % der gesamten verordneten Arzneimittel in Deutschland (Schwabe *et al.*, 2019).

Psychopharmaka werden in Deutschland in drei Gruppen unterteilt, Tranquillantien (Anxiolytika), Neuroleptika und Antidepressiva, wobei letztere hierbei etwa 80 % der Psychopharmaka ausmachen (Schwabe *et al.*, 2019). Innerhalb der Antidepressiva sind hauptsächlich drei Gruppen zu unterscheiden: die selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), die Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRI) und die trizyklischen Antidepressiva (TZA) mit jeweils einem relativen Marktanteil von 48 % (SSRI), 19 % (SNRI) bzw. 16 % (TZA) (Schwabe *et al.*, 2019). Der Wirkmechanismus von Antidepressiva beruht hauptsächlich auf der Hemmung der Wiederaufnahme von Neurotransmittern in die Präsynapse und somit der Erhöhung der extrazellulären Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt (Herdegen *et al.*, 2008). Hierbei sind die selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, wie bereits im Namen enthalten, auf den Membran- gebundenen Serotonin-Wiederaufnahme-Transporter (SERT) der Präsynapse selektiv wirksam (Hyttel, 1982). Das in Deutschland am meisten verkaufte Antidepressivum Citalopram gehört zur Gruppe der SSRI. 2018 wurden 262 Millionen definierte Tagesdosen (**defined daily dose** – DDD) dieses Antidepressivums in Deutschland verschrieben. Dies entspricht bei einer definierten Tagesdosis von 20 mg (WHO, 2019) einer Menge von 5,2 t allein in Deutschland im Jahr 2018 (Schwabe *et al.*, 2019). Es wird im menschlichen Körper hauptsächlich zu Desmethylcitalopram (DCT) und Didesmethylcitalopram (DDCT) metabolisiert, wobei 13 – 23 % der Ursubstanz unverändert ausgeschieden werden (Bezchlibnyk-Butler *et al.*, 2000; Noble & Benfield, 1997). Über das Abwasser gelangt der Stoff in Kläranlagen und wird dort nur zu etwa 18 – 27 % eliminiert (Golovko *et al.*, 2014; Lajeunesse *et al.*, 2012). Daher werden Konzentrationen von bis zu 382 ng/L Citalopram in Kläranlagenabläufen, bzw. bis zu 219 ng/L in Oberflächengewässern nachgewiesen (Himmelsbach *et al.*, 2006; Schlüsener *et al.*, 2015; Schultz *et al.*, 2010; Vasskog *et al.*, 2006). Das in Deutschland am zweit häufigsten verschriebene Antidepressivum ist Venlafaxin (Schwabe *et al.*, 2019). Es gehört zur Gruppe der SNRI und hemmt die präsynaptische Wiederaufnahme von Serotonin und Noradrenalin und zu einem kleinen Teil auch Dopamin (Burnett & Dinan, 1998). Im Jahr 2018 wurden in Deutschland 200 Millionen definierte Tagesdosen (100 mg) des Antidepressivums verschrieben, was einer Gesamtmenge von etwa 20 t entspricht (Schwabe *et al.*, 2019). Venlafaxin wird nur zu etwa 5 % unmetabolisiert ausgeschieden. Sein Hauptmetabolit O-Desmethylvenlafaxin (ODV), der zu etwa 56 % exkretiert wird, ist jedoch ebenso wirksam wie die Muttersubstanz (Holliday & Benfield, 1995). Über die Ausscheidungen gelangen beide Substanzen in Kläranlagen, wo diese bis zu 48 % eliminiert werden (Golovko *et al.*, 2014; Lajeunesse *et al.*, 2012; Rúa-Gómez & Püttmann, 2012a). In Kläranlagenabläufen wurden Konzentrationen von bis zu 2,5 µg/L Venlafaxin und sogar bis zu 4 µg/L O-Desmethylvenlafaxin nachgewiesen. Oberflächengewässerkonzentrationen belaufen sich auf bis zu

690 ng/L Venlafaxin und 743 ng/L des Hauptmetaboliten ODV (Lajeunesse *et al.*, 2012; Rúa-Gómez & Püttmann, 2012b; Schultz *et al.*, 2010).

Diese und andere neuroaktive Substanzen hatten bereits in niedrigen Konzentrationen Einfluss auf das Verhalten von aquatischen Organismen (Brodin *et al.*, 2014). Psychopharmaka, wie die Benzodiazepine Diazepam oder Oxazepam, führten beispielsweise bei Zebrafischen (*Danio rerio*), Gemeinen Sonnenbarschen (*Lepomis gibbosus*) und Flussbarschen (*Perca fluviatilis*) zu aktivitätssteigernde Wirkungen (Brandão *et al.*, 2013; Brodin *et al.*, 2013; Oggier *et al.*, 2010; Saaristo *et al.*, 2019). Im Gegensatz dazu zeigten unterschiedliche Studien, dass die Antidepressiva Amitriptylin, Fluoxetin, Venlafaxin oder Sertralin bei Fischen aktivitätsmindernde Wirkungen haben (Demin *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2019; Maulvault *et al.*, 2018; Meshalkina *et al.*, 2018; Saaristo *et al.*, 2017; Sehonova *et al.*, 2019). Angsthemmende Effekte durch Antidepressiva konnten in Moskitofischen (*Gambusia holbrooki*) und Dickkopfritzen (*Pimephales promelas*) nachgewiesen werden, die nach einer Exposition gegenüber Fluoxetin und Venlafaxin eine Verringerung des Fluchtverhaltens aufwiesen (Martin *et al.*, 2017; Painter *et al.*, 2009). Ebenso stellte ein erhöhter Aufenthalt in der oberen Wasserhälfte im Novel Tank Test eine Verringerung des Angstverhaltens dar (Maximino *et al.*, 2010a; Stewart *et al.*, 2012). Dies konnte für verschiedene Antidepressiva wie Amitriptylin, Fluoxetin, Citalopram, Venlafaxin und Sertralin bei unterschiedlichen Fischarten wie Zebrafischen, Koboldkärpflingen (*Gambusia affinis*), Dreistachligen Stichlingen (*Gasterosteus aculeatus*), Adlerfischen (*Argyrosomus regius*), Endlers Guppys (*Poecilia wingei*) und Goldfischen (*Carassius auratus*) nachgewiesen werden (Demin *et al.*, 2017; Henry & Black, 2008; Kellner *et al.*, 2016; Maulvault *et al.*, 2018; Meshalkina *et al.*, 2018; Olsén *et al.*, 2014; Porseryd *et al.*, 2017; Sackerman *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2015). Aber auch eine Verringerungen des Fraßverhaltens durch Venlafaxin, Fluoxetin, Sertralin oder Citalopram konnte beobachtet werden (Bisesi *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2019; Gaworecki & Klaine, 2008; Hedgspeth *et al.*, 2014; Kellner *et al.*, 2015; Mennigen *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2015). Durch die Fortschritte und Entwicklungen der letzten Jahre sind die Möglichkeiten zur quantitativen Erfassung von Verhaltensparameter deutlich gewachsen (Melvin & Wilson, 2013). Zudem sind Verhaltensexperimente weniger zeitintensiv und oftmals sensitiver als klassische Entwicklungs- oder Reproduktionsexperimente (Melvin & Wilson, 2013). Jedoch ist die Erfassung von Verhaltensparametern derzeit nur sehr spärlich in regulatorischen Richtlinien integriert (Ågerstrand *et al.*, 2020). Das Verhalten von Tieren steht in direkter und indirekter Verbindung mit deren Fitness und kann durch Verknüpfung mit molekularen und physiologischen Prozessen ein sensitives Frühwarnsystem für Chemikalienbelastung in der Umwelt darstellen (Ågerstrand *et al.*, 2020; Pyle & Ford, 2017). Zudem können Verhaltensänderungen, die durch eine Chemikalienbelastung ausgelöst wurden, durch Kaskaden-Effekte ebenfalls Effekte auf Populationsebene auslösen. Beispielsweise kann eine Erhöhung der Fraßrate eines

Sekundärkonsumenten durch reduzierten Prädationsdruck die Primärkonsumenten begünstigen und so zu einer verringerten Abundanz der Primärkonsumenten führen. Somit kann durch eine Chemikalienbelastung einer sensitiven Spezies die Populationsdynamik eines kompletten Ökosystems gestört werden (Ågerstrand *et al.*, 2020; Brodin *et al.*, 2014; Saaristo *et al.*, 2018).

Das Projekt Effect-Net (Effect-Network in Water Research) ist ein Multiskalennetzwerk zur Risikobewertung von Substanzen und Medikamenten, die aktuell in hohen Mengen verbraucht werden. Hierzu zählen Zuckerersatzstoffe wie Sucralose, Antidiabetika wie Metformin oder auch Neuropharmaka wie die Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin. Das Projekt wird im Rahmen des Wassernetzwerks Baden-Württemberg vom Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg gefördert. Es werden sowohl kleinskalige Effekte auf Rezeptorebene, als auch Effekte auf mittleren Ebenen, wie der individuellen Gesundheit von einheimischen Nicht-Zielorganismen und Modellorganismen bis hin zu großskaligen Effekten auf Populationsebene erfasst. Die gewonnenen Erkenntnisse werden dann in einen sozio-kulturellen Kontext eingebettet und sollen Auswirkungen auf persönliche Entscheidungs- sowie politische Prozesse haben, die die Verminderung von Einträgen dieser Chemikalien in die Umwelt nach sich ziehen (Braunbeck, 2020).

Die hier vorliegende Arbeit ist in das Projekt Effect-Net eingebettet und beschäftigt sich mit den Auswirkungen der Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin auf Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*). Um Effekte auf unterschiedliche Lebensstadien zu erfassen, wurden Bachforellenlarven und juvenile Tiere gegenüber den beiden Substanzen exponiert und unterschiedliche Endpunkte betrachtet. Zudem wurden die Bachforellenlarven bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (7 °C und 11 °C) exponiert, um mögliche Temperatureffekte zu erfassen. Die getesteten Konzentrationen der Antidepressiva lagen bei umweltrelevanten Konzentrationen von 1 µg/L bis zur 1000-fach höheren Konzentration von 1 mg/L. Es wurden apikale Endpunkte wie Gewicht, Länge und Mortalität der Tiere aufgenommen sowie die Entwicklungsparameter Schlupfrate und Herzschlagrate der Bachforellenlarven erfasst. Weiterhin wurde das Verhalten während des Versuchs sowie das Schwimmverhalten unter Stressbedingungen untersucht. Zusätzlich wurden biochemische Biomarker wie Acetylcholinesterase-Aktivität, Stressproteinlevel, Superoxiddismutase-Aktivität und Cortisolgehalt sowie ein struktureller Biomarker, die Histopathologie der Leber, analysiert.

Ein Großteil der in der Literatur vorhandenen Ergebnisse zu Wirkungen von Antidepressiva bei Fischen beziehen sich auf das Antidepressivum Fluoxetin und wurden an Modellorganismen wie Zebraquärlingen, Dickkopfelritzen oder Medaka erhoben (Airhart *et al.*, 2007; Chiffre *et al.*, 2016; Foran *et al.*, 2004; Nowakowska *et al.*, 2020; Painter *et al.*, 2009; Schultz *et al.*, 2011, etc.). Daten für einheimische Nicht-Modellorganismen sind bislang nur wenige vorhanden (Kellner *et al.*, 2015; Kellner *et al.*, 2016; Kellner *et al.*, 2017; Melnyk-Lamont *et al.*, 2014). Weiterhin wurden in den

meisten Studien entweder Verhaltensparameter, biochemische Biomarker oder histologische Endpunkte isoliert voneinander untersucht (z.B. Kellner *et al.*, 2015; Kellner *et al.*, 2016; Kellner *et al.*, 2017; Schultz *et al.*, 2011), jedoch wurde noch keine gemeinsame integrierte Bewertung vorgenommen. Vor diesem Hintergrund, wurden die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit mit einer sensitiven einheimischen Fischart, der Bachforelle durchgeführt, und es wurden die Effekte zweier Antidepressiva vergleichend bei verschiedenen Lebensstadien betrachtet. Innovativ ist zudem, dass Reaktionen auf unterschiedlichen biologischen Ebenen an identischen Tieren beurteilt wurden, sodass Verhaltensänderungen, biochemische Biomarker und histopathologische Effekte in Kombination mit der Gewebe- und Wasseranalytik ganzheitlich diskutiert und als Grundlage für eine Risikobewertung dieser Substanzen zur Verfügung gestellt werden können.

## 4 Übergeordnete Fragestellungen

- I. Beeinflussen die Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin das Verhalten von Bachforellen? Wie ändert sich das Verhalten in unterschiedlichen Expositionsszenarien? In welchen Konzentrationsbereichen treten Effekte auf?
- II. Wird die Mortalität und Entwicklung von Bachforellen durch die beiden Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin beeinflusst, und wenn ja, in welchen Konzentrationsbereichen?
- III. Resultiert die Exposition gegenüber Citalopram oder Venlafaxin in Veränderungen des Gewebezustands der Leber von Bachforellen? In welchen Konzentrationsbereichen treten Effekte auf?
- IV. Können die Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin Proteotoxizität, Neurotoxizität oder oxidativen Stress in Bachforellen auslösen? In welchem Konzentrationsbereichen treten diese Effekte auf?
- V. Reagieren verschiedene Altersstadien der Bachforelle unterschiedlich auf die beiden Antidepressiva?
- VI. Beeinflusst die Temperatur die Wirkstärke der beiden Antidepressiva bei Bachforellen?
- VII. Unterscheiden sich die Effekte der beiden Antidepressiva in ihrer Qualität und/oder Quantität? Wenn ja, welche Unterschiede treten auf?



## 5 Material und Methoden

### 5.1 Testsubstanzen

#### 5.1.1 Citalopram

Das Antidepressivum Citalopram ist ein bicyklisches Phtalat-Derivat und gehört zur Gruppe der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) (Hyttel, 1982; Pollock, 2001). Es wird hauptsächlich zur Behandlung von Major Depression, depressiven Störungen und Panikstörungen verschrieben (1 A Pharma GmbH, 2019; Bezchlibnyk-Butler *et al.*, 2000). Weiterhin kann Citalopram bei Angststörungen und Alkoholmissbrauch eine positive Wirkung erzielen (Bezchlibnyk-Butler *et al.*, 2000). Sowohl Citalopram, ein racemisches Gemisch aus dem aktiven (S)-(+)-Citalopram- und (R)-(-)-Citalopram-Enantiomeren, als auch Escitalopram (nur das (S)-(+)-Citalopram-Enantiomer) sind zugelassene Antidepressiva (Bezchlibnyk-Butler *et al.*, 2000; Noble & Benfield, 1997; Schwabe *et al.*, 2019). Der Wirkmechanismus von Citalopram beruht, wie bei allen SSRI, auf einer Hemmung des Serotonin-Wiederaufnahmetransporters (SERT) und somit der Erhöhung der extrazellulären Serotonin(5-HT)-Konzentration (Hyttel, 1982). Da Serotonin ein wichtiges Gewebshormon und Neurotransmitter ist, hat diese Erhöhung des Serotoninlevels unter anderem Einfluss auf das Verhalten, aber auch auf die gastrointestinale Motilität, den peripheren und cerebralen Gefäßtonus sowie den Blutdruck oder die Thrombozytenfunktion (Freissmuth *et al.*, 2020; Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008).

Citalopram besitzt im Vergleich zu anderen SSRI und trizyklischen Antidepressiva eine sehr geringe Affinität zu Noradrenalin-Wiederaufnahmetransportern, Dopamin-Wiederaufnahmetransportern, adrenergen, muscarinergen, dopaminergen, serotonergen oder GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure – **gamma-aminobutyric acid**)-Rezeptoren (Hyttel, 1982; Milne & Goa, 1991; Noble & Benfield, 1997). Es hat eine 3000-fach niedrigere, mittlere inhibitorische Konzentration für die Hemmung der Serotoninwiederaufnahme als für die Hemmung der Noradrenalinwiederaufnahme. Aufgrund dessen ist Citalopram eines der am stärksten selektiv wirkenden Antidepressiva (Bezchlibnyk-Butler *et al.*, 2000; Milne & Goa, 1991). Weiterhin kann Citalopram auf die Cytochrom P450 Isoenzyme CYP 1A2, 2D6 und 2C19 leicht inhibitorisch wirken, da diese teilweise an seiner Metabolisierung beteiligt sind (Bezchlibnyk-Butler *et al.*, 2000). Die Primärmetaboliten von Citalopram, Desmethylcitalopram (DCT) und Didesmethylcitalopram (DDCT), werden durch die Cytochrom P450 Isoenzyme CYP 2C19, 3A4 sowie CYP 2D6 metabolisiert. Zusätzlich können ein Propionsäure-Derivat sowie Citalopram-N-Oxid mittels Oxidation durch Monoaminoxidase A und B sowie Aldehydoxidase gebildet werden (Bezchlibnyk-Butler *et al.*, 2000). Beide Hauptmetabolite kommen in deutlich geringeren Konzentrationen im Körper vor als Citalopram (DCT: 30 – 50 % der Plasmakonzentration von

Citalopram, DDCT: 5 – 10 % der Plasmakonzentration von Citalopram). Zudem sind diese weniger wirksam (Citalopram vier Mal wirksamer als DCT, Citalopram 15 Mal wirksamer als DDCT) und können die Bluthirnschranke nicht so leicht passieren wie ihre Muttersubstanz (Bezchlibnyk-Butler *et al.*, 2000). Aufgrund dessen tragen die Metaboliten nicht bedeutend zur pharmakologischen Wirkung des Antidepressivums bei (Bezchlibnyk-Butler *et al.*, 2000; Pollock, 2001).

Die Elimination von Citalopram erfolgt biphasisch. Bis zu 23 % werden unmetabolisiert über den Urin, der Rest als polare Metabolite über den Urin oder die Faeces ausgeschieden (Bezchlibnyk-Butler *et al.*, 2000; Noble & Benfield, 1997). Die Halbwertszeit von Citalopram beträgt etwa 30 – 35 h, weshalb eine einmal tägliche orale Gabe empfohlen wird. Die empfohlene definierte Tagesdosis (DDD) von Citalopram beträgt 20 mg, jedoch werden bis zu 60 mg täglich verschrieben (Noble & Benfield, 1997; WHO, 2019). Citalopram war mit 262 Millionen definierten Tagesdosen und einem Marktanteil von etwa 18 % aller Antidepressiva das am häufigsten verkaufte Antidepressivum in Deutschland im Jahr 2018. Mit einer angenommenen DDD von 20 mg entspricht dies einem Konsum von 5,2 t Citalopram im Jahr 2018 allein in Deutschland (Schwabe *et al.*, 2019; WHO, 2019).

In Kläranlagen wird Citalopram zu etwa 18 – 27 % abgebaut, der Rest gelangt unverändert in die aquatische Umwelt (Golovko *et al.*, 2014; Lajeunesse *et al.*, 2012). Es werden normalerweise Konzentrationen von bis zu 382 ng/L in Kläranlagenabläufen und 219 ng/L in Oberflächengewässern nachgewiesen (Himmelsbach *et al.*, 2006; Schlüsener *et al.*, 2015; Schultz *et al.*, 2010; Vasskog *et al.*, 2006). Dennoch zeigte eine Studie Konzentrationen von 840 µg/L im Ablauf einer Medikamentenfabrik sowie bis zu 76 µg/L in Oberflächengewässern in der Region Patancheru in Indien (Fick *et al.*, 2009; Larsson *et al.*, 2007). In Gewässersedimenten konnte Citalopram in Konzentrationen von 290 ng/g nachgewiesen werden (Lahti & Oikari, 2012; Schultz *et al.*, 2010). Citalopram wird aufgrund seines  $pK_a$  Wertes von 9,78 als schwache Base klassifiziert (DrugBank, 2020). Somit kann bei höheren pH Werten von einer neutralen Ladung ausgegangen werden, welche zu einer besseren Aufnahme in Organismen führt (Karlsson *et al.*, 2017). Zudem neigt es, aufgrund seines logP-Wertes von 3,76 und seiner Lipophilie, zur Bioakkumulation in Geweben von Organismen (DrugBank, 2020). Je nach Gewebe, Tierart und Expositionsszenario erreichten die nachgewiesenen Gewebekonzentrationen an Citalopram bis zu  $193 \pm 33$  ng/g (Grabicova *et al.*, 2017; Metcalfe *et al.*, 2010; Sackerman *et al.*, 2010).

### 5.1.2 Venlafaxin

Venlafaxin ist ein bizyklisches Phenylethylamin-Derivat und gehört zur Gruppe der Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRI) (Holliday & Benfield, 1995). Dieses Antidepressivum wird zur Behandlung von Major Depression, generalisierten Angststörungen, sozialen Angststörungen und Panikstörungen verwendet (Aristo Pharma GmbH, 2019). Weiterhin gibt es

Hinweise auf positive Effekte bei der Behandlung von Entzugspatienten (Burnett & Dinan, 1998). Der Wirkmechanismus von Venlafaxin beruht auf der Hemmung der Wiederaufnahme der Neurotransmitter Serotonin und Noradrenalin an der präsynaptischen Membran, wobei auch die Wiederaufnahme von Dopamin leicht gehemmt wird (Freissmuth *et al.*, 2020; Holliday & Benfield, 1995). Eine Beeinflussung des Serotoninlevels kann zu Veränderungen des Verhaltens, des Blutgefäßtonus sowie der gastrointestinalen Motilität führen (Freissmuth *et al.*, 2020; Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). Der Neurotransmitter Noradrenalin ist der dominierende Transmitter im sympathischen Nervensystem und nimmt Einfluss auf Verhalten, Appetit und Schmerzempfinden (Freissmuth *et al.*, 2020).

Venlafaxin ist ein racemisches Gemisch aus den Enantiomeren R(-)-Venlafaxin und S(+)-Venlafaxin (Burnett & Dinan, 1998; Holliday & Benfield, 1995). Beide Enantiomere tragen zur antidepressiven Wirkung bei, wobei R(-)-Venlafaxin weniger effektiv die Serotonin-Wiederaufnahme, jedoch deutlich stärker die Noradrenalin-Wiederaufnahme hemmt als S(+)-Venlafaxin (Holliday & Benfield, 1995). Zusätzlich zu Venlafaxin trägt auch der durch das Cytochrom P450 Isomer 2D6 in der Leber metabolisierte Hauptmetabolit O-Desmethylvenlafaxin (ODV) gleichbedeutend zur antidepressiven Wirkung bei (Holliday & Benfield, 1995). Weiterhin können die weniger wirksamen und in geringeren Mengen vorkommenden Metabolite N-Desmethylvenlafaxin (NDV) und N,O-Desmethylvenlafaxin (NODV) durch weitere Cytochrom P450 Isomere wie z.B. CYP 3A3 oder 3A4 gebildet werden (Burnett & Dinan, 1998). Sowohl die Muttersubstanz als auch die Metabolite besitzen so gut wie keine Affinität zu anderen Rezeptoren, wie z.B. muscarinisch cholinergen, adrenergen, dopaminergen oder serotonergen Rezeptoren (Burnett & Dinan, 1998; Holliday & Benfield, 1995).

Die Exkretion von Venlafaxin verläuft primär renal (92 %), wobei nur etwa 5 % des Venlafaxin unmetabolisiert ausgeschieden werden. Der Großteil wird als Hauptmetabolit ODV (56 %) und als Nebenmetabolite NDV (1 %) und NODV (16 %) exkretiert (Holliday & Benfield, 1995). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Venlafaxin (4 h) und dessen Hauptmetabolit (10 h) wird empfohlen, dieses Antidepressivum zweimal täglich zu verabreichen. Die normalen empfohlenen Tagesmengen belaufen sich auf 75 – 225 mg Venlafaxin (Freissmuth *et al.*, 2020). 2011 gehörte Venlafaxin zu den 15 umsatzstärksten Medikamenten weltweit (Schueler *et al.*, 2011). In Deutschland wurden 2018 200,7 Millionen DDD Venlafaxin verschrieben, was einem Marktanteil von 14 % der gesamten Antidepressiva entspricht und somit das am zweit häufigsten verschriebene Antidepressivum in Deutschland darstellt. Mit einer DDD von 100 mg entspricht dies etwa 20 t Venlafaxinkonsum im Jahr 2018 allein in Deutschland (Schwabe *et al.*, 2019; WHO, 2019).

In Kläranlagen wird Venlafaxin und dessen Hauptmetabolit zu 1 – 48 % bzw. 10 – 29 % abgebaut (Golovko *et al.*, 2014; Lajeunesse *et al.*, 2012; Rúa-Gómez & Püttmann, 2012a). Somit gelangen Teile

des Venlafaxins und seines Hauptmetaboliten unverändert in Oberflächengewässer und können dort Effekte in Organismen hervorrufen. Es wurden in Kläranlagenausläufen bis zu 2563 ng/L sowie in Oberflächengewässern bis zu 690 ng/L Venlafaxin nachgewiesen (Golovko *et al.*, 2014; Lajeunesse *et al.*, 2012; Rúa-Gómez & Püttmann, 2012b; Schultz *et al.*, 2010). Die nachgewiesenen Konzentrationen des aktiven Hauptmetaboliten O-Desmethylvenlafaxin sind sogar höher. In Kläranlagenabläufen wurden bis zu 4 µg/L und in Oberflächengewässern bis zu 743 ng/L ODV detektiert (Lajeunesse *et al.*, 2012; Rúa-Gómez & Püttmann, 2012b). In Sedimenten konnten Konzentrationen von bis zu 26,07 ng/g Venlafaxin nachgewiesen werden (Schultz *et al.*, 2010). Der pK<sub>a</sub> Wert ist 8,91, weshalb Venlafaxin als schwache Base klassifiziert wird (DrugBank, 2020). Aufgrund der neutralen Ladung bei höheren pH Werten wird dann von einer besseren Aufnahme in Gewebe ausgegangen (Karlsson *et al.*, 2017). Infolge seines logP-Wertes von 2,74 besteht die Möglichkeit, dass Venlafaxin in Geweben von aquatischen Organismen bioakkumulieren kann (DrugBank, 2020; Maulvault *et al.*, 2018). Gewebekonzentrationen unterscheiden sich je nach Gewebe, Tierart oder Expositionsszenario, jedoch konnten Konzentrationen von bis zu 21 ng/g in Lebern von Regenbogenforellen nachgewiesen werden (Grabicova *et al.*, 2014; Schultz *et al.*, 2010). Am 4. August 2020 wurden sowohl Venlafaxin als auch sein Hauptmetabolit auf die „Beobachtungsliste von Stoffen für eine unionsweite Überwachung im Bereich Wasserpolitik“ aufgenommen (EU, 2020).

## 5.2 Testorganismus

### 5.2.1 Bachforelle

Die Forelle (*Salmo trutta*) ist eine von etwa 131 Arten der Familie der Lachsfische (Salmonidae). Sie kommt natürlich in ganz Europa vor, wurde jedoch in den letzten zwei Jahrhunderten in viele Länder außerhalb Europas eingeschleppt, unter anderem den USA, Russland oder auch Neuseeland (Klemetsen *et al.*, 2003). Die Art wird in anadrom wandernde und stationäre Süßwasserformen unterteilt (Westheide & Rieger, 2011). Die Bachforelle (*Salmo trutta* f. *fario*) ist eine Form, die ausschließlich in Süßgewässern vorkommt und keine anadrome Wanderung durchlebt (Westheide & Rieger, 2011). Wie alle Salmoniden besitzt die Bachforelle eine Fettflosse, die meist rot abgegrenzt ist. Die grünlich bis bräunlichen Flanken der Bachforelle sind mit schwarzen, dunklen und roten, hell umrandeten Flecken gesäumt (Dußling & Berg, 2001; Vilcinskas, 2004). Die Fische werden durchschnittlich 20 – 30 cm lang, können aber auch 50 cm und mehr erreichen (Dußling & Berg, 2001; Rasmussen, 2018). Bachforellen bevorzugen schnell fließende, kalte, sauerstoffreiche Gewässer und sind Leitfische, der nach ihnen benannten Forellenregion, der Fließgewässeroberläufe (Dußling & Berg, 2001). Sie sind visuelle Jäger und ernähren sich im jungen Alter räuberisch von Insekten und deren Larven. Ab einer Größe von etwa 15 cm ernähren sie sich auch von kleinen Fischen (Jonsson & Jonsson, 2018; Klemetsen *et al.*, 2003).

Die Tiere sind im Gegensatz zu einigen Salmonidenarten iteropar, pflanzen sich also mehrmals im Leben fort. Die Reproduktionszeit der Tiere liegt im Herbst und Winter zwischen Oktober und Januar (Barton, 2007; Jonsson & Jonsson, 2018). Die Weibchen graben zu Beginn der Laichzeit Nester in das steinige oder kiesige Bodensubstrat und legen hierin die Eier ab. Anschließend werden diese von einem oder mehreren Männchen befruchtet und mit Substrat bedeckt (Jonsson & Jonsson, 2018; Klemetsen *et al.*, 2003). Nach einem bis mehreren Monaten, abhängig von der Wassertemperatur, schlüpfen die Larven meist im Frühjahr und halten sich bis zur kompletten Aufzehrung ihres Dottersacks in den Zwischenräumen des kiesigen Bodens auf (Jonsson & Jonsson, 2018; Killeen *et al.*, 1999a; Klemetsen *et al.*, 2003). Nachdem der Dottersack aufgezehrt ist, schwimmen die Larven auf und ernähren sich von Insekten, wie z.B. Chironomidenlarven. Ab diesem Zeitpunkt verhalten sich die Tiere in der Natur territorial (Klemetsen *et al.*, 2003). In Gefangenschaft wurde bei dichter Haltung ein Schwarmverhalten der Bachforellen beobachtet (Schwarz *et al.*, 2017). Bachforellen sind in der Dämmerung am aktivsten und suchen tagsüber Schutz in Bodennähe und unter Steinen oder Geäst (Jonsson & Jonsson, 2018; Klemetsen *et al.*, 2003). Der kritische untere Temperaturbereich für das Wachstum der Tiere liegt zwischen 3 °C und 6 °C sowie die kritische Höchsttemperatur bei 25 °C (Jonsson & Jonsson, 2018; Klemetsen *et al.*, 2003). Eine optimale Überlebenswahrscheinlichkeit von Larven ist im Temperaturbereich zwischen 6 – 12 °C gegeben, wohingegen ein optimales Wachstum

der Tiere bei 13 – 18 °C statt findet (Jonsson & Jonsson, 2018; Ojanguren & Braña, 2003). Unterhalb von 8 °C wechseln sie hinsichtlich Verhalten und Habitatselektion von Sommer- auf Winteraktivität (Heggenes & Gunnar Dokk, 2001; Jonsson & Jonsson, 2018).

Die hier verwendeten Bachforellen stammten aus der Forellenzucht Lohmühle in Alpirsbach (Am Lohmühlebach 85, 72275 Alpirsbach-Ehlenbogen, Deutschland). Dieser Fischzuchtbetrieb ist als krankheitsfrei (Kategorie 1) nach Richtlinie 2006/88/EG gelistet (EU, 2006). Für die Versuche mit Bachforellenlarven wurden Eier im Augenpunktstadium direkt in die Expositionsaquarien eingesetzt (Versuch mit Citalopram: 37 Tage nach Befruchtung; Versuch mit Venlafaxin: 32 Tage nach Befruchtung). Die juvenilen Bachforellen (etwa 8 Monate nach Schlupf) wurden vor Versuchsbeginn mindestens eine Woche in einem Hälterungsaquarium gehalten und an die Bedingungen der Klimakammern akklimatisiert. Alle Versuche wurden von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Tübingen genehmigt (ZO 2/16).

## 5.3 Versuche

### 5.3.1 Testsubstanzen

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen wurde Citalopramhydrobromid ( $C_{20}H_{21}FN_2O \cdot HBr$ ; CAS: 59729-32-7) und Venlafaxinhydrochlorid ( $C_{17}H_{27}NO_2 \cdot HCl$ ; CAS: 99300-78-4) verwendet und von Sigma Aldrich bezogen (Steinheim, Deutschland). Es wurden jeweils zwei Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 mg/L und 1 mg/L Citalopram oder Venlafaxin hergestellt, aus denen jeweils die Testkonzentrationen herausverdünnt wurden. Alle angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Reinsubstanz Citalopram ( $C_{20}H_{21}FN_2O$ ) oder Venlafaxin ( $C_{17}H_{27}NO_2$ ).

### 5.3.2 Exposition der Bachforelleneier bzw. Larven

Für die Versuche wurden Bachforelleneier im Augenpunktstadium eingesetzt. Die Eier bzw. Larven waren in einem semistatischen Drei-Block-Design gegenüber 0, 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g/L}$  Citalopram oder Venlafaxin exponiert. Die Aquarien jedes Blocks wurden randomisiert positioniert und pro Aquarium 30 Eier direkt in die Aquarien eingebracht. Die Exposition fand in thermokonstanten Klimakammern bei 7 und 11 °C statt. Die 25 L-Aquarien waren mit 10 L Testmedium befüllt und zur Belüftung mit Ausströmersteinen (JBL ProSilent Areas Micro S2, JBL GmbH & Co. KG, Neuhofen, Deutschland) ausgestattet. Es wurde ein 10:14 h Tag:Nacht-Rhythmus eingestellt und die Aquarien zusätzlich mit schwarzer Folie abgedeckt, um direkte Beleuchtung zu vermeiden. Um konstante Konzentrationen der Testmedien zu gewährleisten sowie Verschmutzung der Aquarien vorzubeugen, wurde zweimal wöchentlich 50 % des Testmediums durch Neues ersetzt. Hierfür wurde vortemperiertes, gefiltertes Leitungswasser (Eisenfilter, Aktivkohlefilter, Partikelfilter) mit der entsprechenden Menge an Stammlösung versetzt. Von Versuchsbeginn an wurden täglich die Mortalität sowie die Schlupfrate der Tiere aufgezeichnet. Eine Woche nach Schlupf aller Tiere einer Klimakammer wurde die Herzschlagrate ausgewählter Tiere erfasst (Stadium 38/39 in Killeen *et al.*, 1999a). Hierzu wurden je fünf Larven der einzelnen Aquarien in Petrischalen mit dem jeweiligen Testmedium überführt, und von allen Tieren wurden die Herzschläge für 20 Sekunden gezählt. Hieraus wurde die Herzschlagrate pro Minute errechnet. Anschließend wurden die Tiere wieder in die jeweiligen Aquarien zurückgesetzt. Im Versuch mit Citalopram bei 11 °C wurden nur die Herzschläge der Kontrolltiere und der Larven der höchsten Konzentration erfasst, da bereits die Fische dieser beiden Expositionsgruppen keine Unterschiede aufwiesen. Ab dem Zeitpunkt, ab dem der Dottersack der Larven komplett aufgezehrt war, wurden die Tiere mit kommerziellen Forellenfutter gefüttert (etwa 3 % des Körpergewichts täglich, 5 mm INICO plus von Biomar, Brande, Dänemark). Während des Versuchs wurden Fotos der Aquarien gemacht, um das Verhalten bezüglich der Aufenthaltsposition der Tiere im Aquarium auswerten zu können (siehe 5.4.1.1. Verhalten während des Versuchs). Im Versuch mit Citalopram wurden drei Wochen nach Dottersackaufzehrung 10 Tiere jedes Aquariums

beprob. Die Ergebnisse hierzu sind nicht Teil dieser Arbeit. Etwa eine Woche vor Beendigung des Versuches wurde das Verhalten der Tiere unter Stressbedingungen in einer automatisierten Aufnahme-Apparatur erfasst (siehe 5.4.1.2. Verhalten unter Stressbedingungen). Im Versuch mit Citalopram wurden die übrigen Tiere acht Wochen nach Dottersackaufzehrung beprobt. Der Versuch mit Venlafaxin wurde sieben Wochen nach Dottersackaufzehrung beendet. Bei der Probenahme wurden die Fische mit einer Überdosis der Betäubungsmittels MS222 (1 g/L Tricain Methansulfonat) getötet und anschließend ein Genickschnitt zur Bestätigung des Todes durchgeführt. Im Anschluss wurden Gewicht und Länge der Tiere notiert und diese präpariert. Während der Präparation wurde zu Beginn die Bauchhöhle eröffnet, die Leber vorsichtig entnommen und in 2% Glutardialdehyd in Cacodylatpuffer fixiert (siehe 5.4.2. Histopathologische Untersuchungen). Weiterhin wurde der Kopf für die Analysen zur B-Esterasen-Aktivität (siehe 5.4.3 B-Esterasen-Aktivität) und der Schwanz zur Bestimmung der Gewebekonzentrationen von Citalopram und Venlafaxin (siehe 5.5.2 Gewebeanalytik) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im Versuch mit Venlafaxin wurde zusätzlich das Rückenstück unterhalb der Rückenflosse zur Analyse der Superoxiddismutase-Aktivität (siehe 5.4.6 Superoxiddismutase-Aktivität) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. In nachfolgender Tabelle 1 sind die relevanten Zeitpunkte sowie die entnommenen Proben aufgeschlüsselt.



Tabelle 1: Relevante Zeitpunkte und entnommene Proben der Versuche mit Bachforellenlarven.

Versuch	Bachforellenlarven + Citalopram		Bachforellenlarven + Venlafaxin	
	7 °C	11 °C	7 °C	11 °C
Exponierte Tiere	90 Tiere / Expositionsgruppe	90 Tiere / Expositionsgruppe	90 Tiere / Expositionsgruppe	90 Tiere / Expositionsgruppe
Versuchsdauer	135 Tage	107 Tage	128 Tage	105 Tage
Befruchtung der Eier	21.11.2016	21.11.2016	14.12.2018	14.12.2018
Versuchsbeginn	28.12.2016	28.12.2016	15.01.2019	15.01.2019
Schlupf beendet	23.01.2017	12.01.2017	17.02.2019	31.01.2019
Aufzeichnung Herzschlagrate	30.01.2017	19.01.2017	22.02.2019	07.02.2019
Dottersackaufzehrung	16.03.2017	16.02.2017	03.04.2019	08.03.2019
Fotos Aquarien	30.03 – 13.04.2017, 08.05 – 10.05.2017	30.03 – 13.04.2017	08.04 – 21.05.2019	13.03 – 28.04.2019
Videoaufzeichnungen	02.05.2017	05.04.2017	16.05.2019	23.04.2019
Versuchsende	11.05.2017	13.04.2017	22.05.2019	29.04.2019
Kopf – B-Esterasen-Aktivität	51 Tiere / Expositionsgruppe	51 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe
Leber – Histopathologie	60 Tiere / Expositionsgruppe	60 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe
Rücken – Superoxid- dismutase-Aktivität	-	-	30 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe
Schwanz – Gewebeanalytik	30 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe

### 5.3.3 Exposition der juvenilen Bachforellen

Die juvenilen Bachforellen wurden ebenso wie die Bachforellenlarven in einem semistatischen Drei-Block-Design exponiert. Die Exposition der Fische fand in einer thermokonstanten Klimakammer bei 7 °C statt. Die Tiere wurden gegenüber 0, 1, 10, 100 und 1000 µg/L der Antidepressiva Citalopram oder Venlafaxin exponiert. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere mindestens eine Woche lang in Hälterungsbecken an die Bedingungen der Klimakammer akklimatisiert. Anschließend wurden zehn Fische pro 25 L Aquarium, welches 15 L Testmedium enthielt, eingesetzt. Die Klimakammer war auf einen 10:14 h Tag:Nacht-Rhythmus eingestellt, und die Aquarien zusätzlich mit schwarzer Folie bedeckt, um direkte Beleuchtung der Aquarien zu vermeiden. Zweimal wöchentlich wurde 50 % des Testmediums durch neu präpariertes Medium ersetzt. Hierfür wurde zuvor temperiertes, gefiltertes Leitungswasser (Eisenfilter, Aktivkohlefilter, Partikelfilter) mit der äquivalenten Menge an Stammlösung versetzt. Die Tiere wurden täglich kontrolliert und gefüttert (etwa 3 % des Körpergewichts täglich, 8 mm INICO plus von Biomar, Brande, Dänemark). Während des Versuchs wurden Fotos der Aquarien angefertigt, um das Verhalten der Tiere bezüglich der Aufenthaltsposition im Aquarium zu untersuchen (siehe 5.4.1.1. Verhalten während des Versuchs). Nach vier Wochen wurde der Versuch beendet und sieben der zehn Tiere eines Aquariums beprobt. Das Schwimmverhalten der übrigen drei Tiere eines Aquariums wurde am nachfolgenden Tag in der automatisierten Aufnahme-Apparatur aufgezeichnet (siehe 5.4.1.2. Verhalten unter Stressbedingungen). Anschließend wurden diese Tiere ebenfalls beprobt. Hierfür wurden die Fische mit einer Überdosis des Fischbetäubungsmittels MS222 (1 g/L Tricain Methansulfonat) getötet und der Tod mittels eines Genickschnitts bestätigt. Anschließend wurden die Gewebeproben entnommen. Die Leber der Fische wurde vorsichtig herauspräpariert und direkt in 2 % Glutardialdehyd in Cacodylatpuffer fixiert (siehe 5.4.2. Histopathologische Untersuchungen). Der Kopf der Tiere (siehe 5.4.3 B-Esterasen-Aktivität), die Kiemen (siehe 5.4.4. Stressproteinlevel), der Rücken unterhalb der Schwanzflosse (siehe 5.4.6 Cortisolgehalt), und der Schwanz der Tiere (siehe 5.5.2. Gewebeanalytik) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Im Versuch mit Venlafaxin wurde zusätzlich der vordere Rückenteil zur Messung der Superoxiddismutase-Aktivität (siehe 5.4.6 Superoxiddismutase-Aktivität) entnommen und weggefroren. In nachfolgender Tabelle 2 sind alle relevanten Zeitpunkte sowie die entnommenen Proben aufgeschlüsselt.

Tabelle 2: Relevante Zeitpunkte und entnommene Proben der Versuche mit juvenilen Bachforellen.

Versuch	Juvenile Bachforellen + Citalopram	Juvenile Bachforellen + Venlafaxin
Exponierte Tiere	30 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe
Versuchsdauer	28 Tage	25 Tage
Versuchsbeginn	08.08.2017	31.07.2018
Fotos Aquarien	21.08 – 03.09.2017	01.08 – 22.08.2018
Versuchsende	04.09.2017	23.08.2018
Videoaufzeichnungen	06.09.2017	24.08.2018
Kopf – B-Esterasen-Aktivität	27 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe
Kieme – Hsp70-Level	30 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe
Leber – Histopathologie	30 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe
Rücken – Cortisolgehalt	20 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe
Rücken – Superoxiddismutase- Aktivität	-	30 Tiere / Expositionsgruppe
Schwanz – Gewebeanalytik	30 Tiere / Expositionsgruppe	30 Tiere / Expositionsgruppe

## 5.4 Untersuchte Wirkendpunkte und Biomarker

Die genaue Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Chemikalien ist im Anhang zu finden.

### 5.4.1 Verhalten

Das Verhalten der Bachforellen wurde während des Versuchs sowie unter Stressbedingungen untersucht. Unter Normalbedingungen halten sich Bachforellen in den Aquarien sowohl am Boden als auch in der unteren Wassersäule des Aquariums auf. Auch Schwarmverhalten ist für ähnlich alte Bachforellen beschrieben (Schwarz *et al.*, 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde der Aufenthaltsort der Forellen in den Aquarien täglich auf mehreren Fotos festgehalten. Der Aufenthaltsort der Fische wurde auf der Basis folgender Kenntnisse bewertet: Halten sich die Tiere konstant in der oberen Aquarienhälfte auf, deutet dies unter anderem auf eine hohe Schwimmaktivität hin. Eine Orientierung in Richtung Aquarienboden, ist unter anderem durch Scototaxis (Orientierungsbewegung in Richtung dunklerer Bereiche) und Geotaxis (Orientierungsbewegung in Richtung Schwerkraft) beeinflusst. Untersuchungen in denen das Verhalten von Fischen mit Hilfe des Novel Tank Tests<sup>1</sup> erfasst wurde, zeigten dass eine erhöhte Aufenthaltsdauer in der oberen Aquarienhälfte ein Zeichen für verringerte Angst darstellt (Maximino *et al.*, 2010a; Maximino *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2012). Mit Hilfe des Scototaxis-Tests<sup>2</sup>, wird der Einfluß verschiedener Lichtverhältnisse auf das Verhalten von Fischen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ein längerer Aufenthalt in einer helleren Umgebung ebenfalls als Zeichen für verringerte Angst zu beurteilen ist (Maximino *et al.*, 2010b). Da der Aquarienboden in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen schwarz war und die Aquarien durch die Klimakammerbeleuchtung während der Fotoaufnahmen von oben beleuchtet wurden, kann somit ein vermehrter Aufenthalt der Fische in der helleren oberen Hälfte als verringertes Angstverhalten gewertet werden (Maximino *et al.*, 2010a; Maximino *et al.*, 2010b). Weiterhin ist auch das Verlassen des Schwarms ein Zeichen für verringerte Angst bei Fischen (Maximino *et al.*, 2010a; Stewart *et al.*, 2012). Ein vermehrter Aufenthalt der Tiere in der oberen Aquarienhälfte deutet demnach auf eine erhöhte Aktivität und ein verringertes Angstverhalten der Fische hin.

Bezüglich des Verhaltens unter Stressbedingungen kann eine verringerte Schwimmaktivität der Tiere sowohl als angstinduziertes Paralyseverhalten als auch entspanntes Verhalten bzw. verringertes Fluchtverhalten gedeutet werden (Maximino *et al.*, 2010a; Painter *et al.*, 2009; Sackerman *et al.*,

---

<sup>1</sup> Versuchssystem in dem ein Fisch in ein neues Aquarium überführt wird, welches horizontal in zwei Hälften geteilt wird. Währenddessen wird u.a. die Zeit in der oberen Aquarienhälfte und die Anzahl der Übertritte in die obere Hälfte aufgezeichnet (Stewart *et al.*, 2012).

<sup>2</sup> Versuchssystem in dem ein Fisch in einem Aquarium, welches durch eine schwarz bemalte rechte und weiß bemalte linke Hälfte ausgezeichnet ist, überführt wird. Hierbei wird die Präferenz für die hellere oder dunklere Aquarienhälfte erfasst (Maximino *et al.*, 2010a).

2010; Stewart *et al.*, 2012). Hierzu ist es wichtig, das Verhalten und die Verhaltensänderungen der Tiere über die Aufnahmezeit zu betrachten, das Verhalten zwischen den Expositionsgruppen zu vergleichen und die Ergebnisse anderer Verhaltensanalysen in die Beurteilung mit einzubeziehen.

#### 5.4.1.1 Verhalten während des Versuchs

Während der Versuche wurde das Verhalten der Fische dadurch dokumentiert, dass täglich drei Fotos der Aquarien aufgenommen und auf diesen die Anzahl der Fische in der oberen und unteren Hälfte der Aquarien bestimmt wurde. Vor der jeweiligen Aufnahme wurde die schwarze Folie, durch welche die Aquarien abgedeckt waren, entfernt und fünf Minuten gewartet, sodass sich die Fische an die Beleuchtung gewöhnen konnten. Anschließend wurde hinter den Aquarien ein weißes Papier platziert, um einen besseren Kontrast zu erhalten. Zwischen den drei Fotos wurde jeweils eine fünfminütige Pause eingelegt. Die Fotos wurden täglich zu ähnlichen Tageszeiten zwischen 13 und 16 Uhr angefertigt. In den Versuchen mit Citalopram konnten nur Fotos der Aquarien gemacht werden, die nicht durch andere abgedeckt waren. Dennoch war diese Stichprobe repräsentativ, da mindestens zwei Aquarien der Kontrolle und der höchsten Konzentration fotografiert wurden. In den Versuchen mit Venlafaxin wurden die Aquarien so positioniert, dass von allen Aquarien Fotos angefertigt werden konnten. Ebenfalls unterschied sich die Anzahl der Tage, an welchen Fotos der Aquarien gemacht wurden, da während des ersten Versuchs mit Citalopram dieses Verhalten das erste Mal beobachtet wurde und somit erst später während des Versuchs erfasst wurde. Die Anzahl der Tage ist in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeschlüsselt. Die drei täglich angefertigten Fotos jedes einzelnen Aquariums wurden ausgewertet und jeweils der Mittelwerte der Tiere in der oberen und unteren Aquarienhälfte bestimmt.

#### 5.4.1.2 Verhalten unter Stressbedingungen

Das Schwimmverhalten der Fische unter Stressbedingungen wurde mit einer selbst konstruierten, automatisierten Aufnahme-Apparatur durchgeführt. Hierbei stellten die sehr helle Beleuchtung, der geringe Wasserstand und die geringe Größe der Aquarien Stressbedingungen für die Tiere dar. Es wurden vier Aquarien (17 × 17 × 8,5 cm) auf einer weißen Plexiglasplatte platziert und 32 cm über jedem Aquarium eine Kamera (Basler acA 130–60 gm, 1.3 Megapixel Auflösung, Basler AG, Ahrensburg, Germany, Linse: 4.5–12.5 mm; 1:1.2) positioniert. Die Plexiglasplatte wurde zu allen Seiten mit weißen Styroporplatten eingefasst. In den vier Ecken wurden Lampen (2700 K, 1521 lm) angebracht, die die obere Styroporplatte beleuchteten, um eine helle indirekte Beleuchtung zu erhalten. Es wurden jeweils fünf Bachforellenlarven oder drei juvenile Bachforellen aus dem Aquarium einer Expositionsgruppe in eines der oben beschriebenen Aquarien gesetzt, welche zuvor mit dem jeweiligen Testmedium befüllt wurden. Das Schwimmverhalten der Bachforellenlarven bzw. juvenilen Bachforellen wurde in 500 mL bzw. 1 L Testmedium für 20 Minuten aufgezeichnet.

Während jedes Durchlaufes wurde jeweils ein Kontrollaquarium mit aufgezeichnet, um anschließende Vergleichbarkeit zu garantieren. Das Schwimmverhalten der Tiere wurde nur einmal aufgezeichnet, um eine Habituation an die Apparatur zu verhindern. Im Anschluss wurden die Tiere getötet und beprobt, ausgenommen die Bachforellenlarven des Versuchs mit Citalopram. Diese wurden wieder in die Expositionsaquarien überführt und erst zu Versuchsende beprobt. In den aufgezeichneten Videos wurden die Tiere mit dem Programm EthoVision 12XT (Noldus Information Technology bv, Wageningen, Niederlande) individuell markiert und deren Schwimmverhalten über die Zeit verfolgt. Anschließend wurden die markierten Spuren manuell korrigiert, da häufig Identitätsverwechslungen zwischen den Tieren auftraten. Ausgewertet wurden zwanzigminütige Videosequenzen, wobei die ersten zwei Minuten der Aufnahme aufgrund von Habituation verworfen wurden. Analysiert wurden die gesamte zurückgelegte Distanz, die mittlere Geschwindigkeit über die Zeit, die Bewegungsaktivität sowie die Zeit, in der sich die Tiere nicht bewegten.

#### 5.4.2 Histopathologische Untersuchungen

Mit Hilfe von histopathologischen Untersuchungen können Gewebsschädigungen aufgrund von Stressoren untersucht werden. Beispielsweise können verschiedene Umweltchemikalien histopathologische Veränderungen in Geweben von Fischen hervorrufen (Nunes *et al.*, 2015; Schwaiger *et al.*, 2004; Triebskorn *et al.*, 2008). Aus diesem Grund sind histopathologische Veränderungen ein guter Biomarker, um den Gesundheitszustand der Tiere und sublethale Effekte auf Gewebe zu beschreiben (Bernet *et al.*, 1999; Köhler & Triebskorn, 2004; Schwaiger, 2001). Die histologisch nachweisbaren Effekte auf Gewebe, wie zum Beispiel der Leber, stellen einen strukturellen Biomarker dar, der einer Sättigungskurve folgt. Das bedeutet, dass mit steigendem Stress auch die Biomarkerantwort steigt, in diesem Fall die Zellveränderungen über Schädigungen bis hin zum Zelltod (Köhler & Triebskorn, 2004).

##### 5.4.2.1 Leber

Die Leber ist eines der wichtigsten metabolischen Organe im Körper. Sie ist nicht nur am Protein-, Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel beteiligt, sondern spielt auch eine tragende Rolle bei der Entgiftung von Umweltchemikalien und Schadstoffen (Bruslé & Anadon, 1996; Rodriguez & Fanta, 1998). Im Gegensatz zur lobulären Säugetierleber ist die Leber von Salmoniden eine retikulo-tubulär aufgebaute Drüse (Hampton *et al.*, 1985; Rocha *et al.*, 1994). Vier bis neun konzentrisch angeordnete Hepatozyten bilden mit ihrem apikalen Ende einen Gallencaliculus, der im Gallengang mündet. Die Tubuli sind von Sinusoiden umgeben (Akiyoshi & Inoue, 2004; Hampton *et al.*, 1988; Rocha *et al.*, 1994). Hepatozyten sind der am häufigsten vorkommende Zelltyp in der Leber. Sie besitzen einen großen runden Zellkern mit einem oder zwei Nucleoli (Hampton *et al.*, 1985). Weiterhin besitzen sie einen großen Anteil an rauem endoplasmatischem Retikulum zur Proteinsynthese und können

Glykogen speichern (Braunbeck *et al.*, 1990). Weitere Zellen, die in Lebergewebe von Fischen vorkommen, sind Makrophagen, Melanomakrophagen, Epithelzellen der Gallenkanäle, Ito-Zellen und Endothelzellen (Agius & Roberts, 2003; Bruslé & Anadon, 1996; Rocha *et al.*, 1994).

In die Bewertung aufgenommene Schadbilder der Leber sind Hypertrophien oder Hyperplasien von Hepatozyten, Entzündungen, dilatierte Kapillaren, vermehrte Makrophageninfiltration, Vakuolisierung des Zytoplasmas der Hepatozyten, erweiterter Interzellularraum zwischen den Hepatozyten und fokale sowie flächige Nekrosen (Triebskorn *et al.*, 2008).

#### 5.4.2.2 Methode

Die Leberproben wurden direkt nach der Entnahme in 2% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer (0,1 M; pH 7,6) fixiert. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung mindestens eine Woche bei 4 °C gelagert. Danach wurden diese 3 × 10 Minuten mit Cacodylatpuffer (0,1 M; pH 7,6) und 3 × 15 Minuten mit 70 % Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurden sie in einem Gewebefiltrationsautomaten (TP 1020, Leica, Wetzlar, Deutschland) in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend mit Paraffin infiltriert. Die Proben wurden in Paraffinwachs eingebettet und die fertigen Wachsböckchen getrimmt. Anschließend wurden die Proben mit einem Schlittenmikrotom (SM2000 R, Leica, Wetzlar, Deutschland) auf eine Dicke von 3 µm geschnitten und je Probe drei Objektträger mit je acht Schnitten versehen. Ein Objektträger war für die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung, ein weiterer für die Alcianblau-Perjosaure-Schiffsreagenzfärbung (Alcianblau-PAS) und der Dritte als Reserve vorgesehen.

Die Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung ist eine physikalisch-chemische Färbemethode, bei der das Hämatoxylin saure Zellbestandteile, wie DNA im Zellkern, blau und das Eosin basische Zellbestandteile, wie das Zytoplasma, rosa bis rot anfärbt (Schmitz *et al.*, 2010). Durch die ebenfalls chemisch-physikalische Alcianblau und die chemische PAS Färbung werden saure Mukopolysaccharide blau und Polysaccharide wie Glykogen rot-violett angefärbt (Yamabayashi, 1987). Die Färbungen wurden mit einem Färbeautomaten (Varistain 24–4, Thermo Scientific, Deutschland) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Objektträger mit den angefärbten Proben mit Roti®-Histokitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und einem Deckglas eingedeckt. Anschließend wurden die Proben unter einem Lichtmikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet. Die Auswertung fand, um einen *Observer-Bias* zu vermeiden, im zweiten Schritt verblindet statt. Zunächst wurde die Histopathologie qualitativ beschrieben und danach fand eine semi-quantitative Bewertung mit einer Einstufung in fünf Kategorien (1: Kontrollzustand, 2: leichte Reaktion, 3: Reaktionszustand, 4: starke Reaktion, 5: Destruktionszustand) nach Triebskorn *et al.* (2008) statt.

### 5.4.3 Cortisolgehalt

Cortisol ist ein Stresshormon, das in Fischen wichtige Aufgaben bei der Osmoregulation sowie der Regulation des Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidmetabolismus übernimmt (Mommsen *et al.*, 1999; Wendelaar Bonga, 1997). Weiterhin spielt Cortisol eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Reproduktion von Fischen (Mommsen *et al.*, 1999). Die Sekretion von Cortisol wird in Fischen durch die Hypothalamus-Hypophyse-Interrenal(HPI)-Achse kontrolliert, die homolog zur Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden(HPA)-Achse der Säugetiere ist (Keysomi *et al.*, 2013). In der Kopfnierenregion von Fischen befindet sich das Interrenalorgan sowie das Adrenalorgan, welche homolog zur Nebennierenrinde bei Säugetieren sind (Westheide & Rieger, 2011). Das Interrenalorgan besteht aus Interrenalzellen und ist bei Fischen entlang der dorsalen Aorta gelegen (McDonald, 2017; Westheide & Rieger, 2011). In der Hypophyse wird das Corticotropin-releasing Hormon (CRH) freigesetzt, welches an Rezeptoren in der Hypophyse bindet und dort zur Freisetzung des Adrenocorticotropen Hormon (ACTH) führt (McDonald, 2017). Das ACTH führt dazu, dass Cortisol im Interrenalorgan gebildet und von dort ins Blut abgegeben wird (Wendelaar Bonga, 1997; Westheide & Rieger, 2011). Die Erhöhung des Cortisollevels im Plasma ist eine der ersten Antworten auf Stress in Fischen, weshalb die Messung des Cortisolgehalts als guter Indikator für Stress gilt (Keysomi *et al.*, 2013; Wendelaar Bonga, 1997). Da bei den hier verwendeten Fischen aufgrund ihrer geringen Größe eine Blutentnahme nicht durchführbar war, wurde das Rückenstück mit enthaltener Niere zur Auswertung des Cortisollevels verwendet.

#### 5.4.3.1 Methode

Die Analyse des Cortisolgehalts wurde mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit durchgeführt (Katalognummer: CSB-E08487f, Cusabio Technology LCC, Houston, TX, USA). Die Proben wurden mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) im Verhältnis 1:11 verdünnt und homogenisiert. Nach zwei Zyklen des Einfrierens bei -20 °C und Wiederauftauens bei Raumtemperatur wurden die Proben bei  $5000 \times \vec{g}$  und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Bevor der Assay durchgeführt wurde, wurden die Überstände 1:10 mit Proben-Puffer verdünnt. Der Standard (0; 0,0023; 0,01; 0,039; 0,156; 0,625; 2,5; 10 ng/mL Cortisol) und die Proben wurden in Duplikaten auf eine vorbeschichtete 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurde pro Well je 50 µL Antikörperlösung hinzugegeben. Die Platte wurde mit Klebefolie verschlossen, für 60 Sekunden leicht geschüttelt und für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit 200 µL pro Well bereitgestelltem Waschpuffer gewaschen und 100 µL HRP-Konjugat hinzugefügt. Nach weiterer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wurde die Platte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 90 µL TMB-Substrat hinzugefügt. Die Platte wurde mit Alufolie lichtdicht verschlossen und wiederum für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert.



Schließlich wurde pro Well 50  $\mu\text{L}$  Stopplösung hinzu pipettiert und die Platte direkt bei 450 nm und anschließend die Absorption bei 570 nm in einem Mikrotiterplattenleser (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) photometrisch gemessen. Die Konzentrationen sind in ng/ml Cortisol angegeben.

#### 5.4.4 *Stressproteinlevel*

Stressproteine, auch Hitzeschockproteine genannt, sind hochkonservierte molekulare Chaperone, die für die korrekte Faltung und den Membrantransport von Proteinen unabdingbar sind (Feder & Hofmann, 1999). Diese Stressproteine werden durch erhöhte Anteile an falsch gefalteten Proteinen induziert, die durch unterschiedliche physikalische, chemische oder biologische Stressoren, wie Temperatur, Strahlung, Wachstum oder Xenobiotika verursacht werden können (Feder & Hofmann, 1999; Köhler & Triebkorn, 2004). Diese fehlgefalteten Proteine binden an die Stressproteine und verdrängen somit den zuvor an die Stressproteine gebundenen Hitzeschockfaktor. Anschließend kann der nun ungebundene Hitzeschockfaktor trimerisieren und an das Hitzeschockelement der DNA binden. Dies führt zu einer erhöhten Transkription und Translation der Stressprotein-Gene und erhöht somit die gesamte Stressproteinmenge (Sanders, 1993). Aufgrund dessen wird das Stressproteinlevel als geeigneter Biomarker für Proteotoxizität betrachtet (Köhler & Triebkorn, 2004). Die Biomarkerantwort von Stressproteinen verläuft mit steigender Stressintensität in einer Optimumskurve. Das bedeutet, dass mit steigender Stressintensität die Biomarkerantwort solange ansteigt, bis ein Optimum erreicht wird. Danach sinkt die Kurve wieder aufgrund von destruktiven Prozessen. Hieraus folgt, dass das Level an Stressproteinen alleine keine eindeutige Aussage über die Schädigung gibt, sondern auch andere Biomarker, wie die Histopathologie, zur korrekten Interpretation herangezogen werden müssen (Köhler & Triebkorn, 2004). Stressproteine werden aufgrund ihres molekularen Gewichts in verschiedenen Familien aufgeteilt, zu denen auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten 70 kDa schweren Hsp70 zählen (Feder & Hofmann, 1999). Zur Auswertung des Stressproteinlevels wurden Kiemenproben verwendet, da sich diese bereits in der Vergangenheit als geeignetes Gewebe für die Auswertung des Hsp70-Levels herausstellten.

##### 5.4.4.1 Methode

Die Bestimmung des Hsp70-Levels wurde mittels einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließendem Immunoblottingverfahren (Westernblot) durchgeführt. Die Proben wurden zunächst mit einem Extraktionsgemisch aus 98 % konzentriertem Extraktionspuffer und 2 % Proteasehemmer 1:4 verdünnt und danach homogenisiert. Anschließend wurden die Proben bei  $20000 \times g$  bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand auf zwei Eppendorfgefäße verteilt. Für die Quantifizierung des Proteingehalts wurden 5  $\mu\text{L}$  des Überstands mit 245  $\mu\text{L}$  des 1:10 verdünnten konzentrierten Extraktionspuffers gemischt und bei -

20 °C gelagert. Zur Bestimmung des Hsp70-Levels wurde der restliche Überstand im Verhältnis 2:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt, 5 Minuten auf 97 °C erhitzt und bei -20 °C gelagert.

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde nach Bradford (1976) durchgeführt. Dadurch wird die Menge an Volumen berechnet, die benötigt wird, um eine definierte Menge von 40 µg Protein auf das Polyacrylamidgel aufzutragen. Hierfür wurden je 25 µL der Proben in Triplikaten sowie eine Standardreihe mit Rinderserumalbumin (0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 mg/mL BSA) auf eine 96-well Platte pipettiert. Anschließend wurde 250 µL Bradford-Reagenz pro Well dazugegeben und die Absorption bei 595 nm mit einem Mikrotiterplattenleser (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) gemessen.

Für die Bestimmung des Hsp70-Levels wurden von den Proben sowie von zwei internen Standards (Ganzkörperhomogenat Bachforelle) Probenäquivalente mit jeweils 40 µg Protein auf zuvor angefertigte Polyacrylamidgele aufgetragen. Die Proteine wurden im Gel bei 120 V für eine Stunde nach ihrer Größe aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Proteine bei einer Spannung von 90 mA pro Gel von den Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Die Membranen wurden anschließend für 1,5 h bei Raumtemperatur in Absättigungslösung (Pferdeserum und TBS 1:2) inkubiert und mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen. Über Nacht folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (mouse anti-human Hsp70, Dianova, Hamburg, Deutschland), der spezifisch an Hsp70 bindet. Nach einem Spülschritt mit TBS wurden die Membranen für weitere zwei Stunden mit dem zweiten Antikörper (goat anti-mouse IgG conjugated to peroxidase, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) inkubiert. Dieser bindet an den ersten Antikörper und ist mit einer Peroxidase gekoppelt. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Membranen so lange in 4-Chlor(1)naphtol Färbelösung gelegt, bis die Proteinbanden durch die von der Peroxidase katalysierte Färbereaktion sichtbar wurden. Nach einer dreißigminütigen Trocknungsphase wurde die Nitrocellulosemembranen eingescannt (CanoScan 900F MarkII, Canon, Tokio, Japan) und die optische Dichte der Proteinbanden mit Hilfe des Programms Image Studio Lite (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in Relation zum Standard gesetzt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus verschiedenen Tests zu gewährleisten. Die Ergebnisse sind deshalb als „relative Grauwerte“ dargestellt.

#### 5.4.5 B-Esterasen-Aktivität

Acetylcholinesterase und Carboxylesterasen sind Enzyme, die aufgrund der Inhibitionswirkung des aktiven Metaboliten des Pestizids Parathion, Paraxon, zu den B-Esterasen gezählt werden (Aldridge, 1952; Laguerre *et al.*, 2009). Acetylcholinesterase katalysiert die Hydrolyse des Neurotransmitters Acetylcholin in seine Bestandteile Essigsäure und Cholin (Rosenberry, 1975). Das Enzym kann von verschiedenen Xenobiotika unter anderem Carbamaten oder Organophosphaten wie auch Pharmazeutika, wie dem Alzheimermedikament Donepezil, gehemmt werden (Rault *et al.*, 2008; Sugimoto *et al.*, 2000). Aufgrund dessen ist eine Aktivitätsänderung der Acetylcholinesterase ein guter Biomarker für Neurotoxizität (Küster, 2005; Xie *et al.*, 2015). Carboxylesterasen sind Enzyme, die Insektizide wie Carbamate und synthetische Pyrethroide hydrolysieren oder Organophosphate binden können, und dadurch entgiftend wirken (Sanchez-Hernandez *et al.*, 2009). Aufgrund dessen können diese Enzyme protektiv gegenüber der Acetylcholinesterase wirken (Carr & Chambers, 1991; Küster, 2005). Zum Nachweis der B-esterasen wurden in der vorliegenden Arbeit Kopfproben der Tiere verwendet, da in Nervengewebe viele B-Esterasen enthalten sind.

##### 5.4.5.1 Methode

Die Kopfproben der Fische wurden mit der fünffachen Menge an Extraktionslösung mittels eines Stößels homogenisiert und anschließend bei  $5000 \times g$  für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 25 % des Probevolumens mit einer 50 % Glycerinlösung versetzt. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Der Gesamtproteingehalt der Proben wurde mit der Methode nach Lowry *et al.* (1951), modifiziert nach Markwell *et al.* (1978), durchgeführt. Hierfür wurde auf einer 96-Well Platte eine Standard-Reihe mit Rinderserumalbumin (0; 2; 5; 10; 15; 20; 30; 40 µL BSA 1 mg/mL) pipettiert. In die übrigen Wells wurde in Triplikaten je 2 µL Probe pipettiert. Die Menge in den Wells wurde mit bidestilliertem Wasser auf 50 µL aufgefüllt. Anschließend wurden in jedes Well 200 µL der Lösung C und 20 µL Folin-Ciocalteu-Reagenz, gemischt mit bidestilliertem Wasser (1:2), hinzugegeben. Die Platte wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei 650 nm in einem Mikrotiterplattenleser (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) gemessen.

Zur Bestimmung der Acetylcholinesterase-Aktivität wurde die Methode nach Ellman *et al.* (1961), modifiziert nach Rault *et al.* (2008), angewandt. Es wurden 2 µL der Proben sowie 2 µL bidestilliertes Wasser (Blank) in Triplikaten in jedes Well gegeben. Anschließend wurde 178 µL Ellman-Puffer sowie 20 µL AcSCh Substratlösung hinzu pipettiert und direkt die Absorption über 5 Minuten bei 405 nm in einem Mikrotiterplattenleser (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) gemessen.

Die Bestimmung der Aktivität der Carboxylesterasen wurde nach der Methode von Chanda *et al.* (1997) mit dem Substrat 4-Nitrophenylacetat (NPA) und nach der Methode von Carr & Chambers (1991) mit dem Substrat 4-Nitrophenylvalerat (NPV), optimiert durch Sanchez-Hernandez *et al.* (2009) durchgeführt. Hierfür wurde in Triplikaten jeweils 4 µL Probe und zusätzlich ein Blank (4 µL bidestilliertes Wasser) auf eine 96-Well Platte aufgetragen. Anschließend wurde für die Methode mit NPA-Substrat 23,75 mL Tris-EDTA Puffer mit 1,25 mL NPA Substratlösung versetzt und 246 µL dieser Lösung in jedes Well pipettiert. Für die Methode mit NPV-Substrat wurde 24,75 mL Tris-HCl Puffer mit 250 µL NPV Substratlösung gemischt und ebenfalls 246 µL der Mischung in alle Wells gegeben. Bei beiden Platten wurde die Absorption direkt bei 405 nm für 5 Minuten in einem Mikrotiterplattenleser (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) ausgelesen. Die Aktivität der B-Esterasen wurde in Milliunits/mg Protein angegeben, wobei ein Unit Enzymaktivität definiert ist als ein Mikromol des Substrates, das pro Minute hydrolysiert wird.

#### 5.4.6 Superoxiddismutase-Aktivität

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), entstehen bei vielen biologischen Prozessen (Pedrajas *et al.*, 1995). Dennoch führen diese Reaktionen unter Normalbedingungen oft nicht zu oxidativem Stress, da sie in einem Gleichgewicht mit dem antioxidativen System stehen. Xenobiotika, wie aromatische Kohlenwasserstoffe, Pestizide, aber auch Pharmazeutika können dieses Gleichgewicht stören und oxidativen Stress auslösen (Nunes *et al.*, 2008; Pedrajas *et al.*, 1995; Valavanidis *et al.*, 2006). Oxidativer Stress, verursacht durch eine erhöhte Menge an ROS, kann Lipide, DNA oder Proteine schädigen (Valavanidis *et al.*, 2006). Antioxidantien und antioxidative Enzyme reduzieren diese ROS und wirken somit oxidativem Stress entgegen. Zum antioxidativen System gehören unter anderem die Enzyme Superoxiddismutase (SOD) oder Katalase (CAT) sowie das Tripeptid Glutathion, oder Ascorbinsäure (Vitamin C) (Regoli & Giuliani, 2014). Superoxiddismutase ist ein Enzym der ersten Verteidigungslinie des antioxidanten Systems und katalysiert die Disproportionierung von Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid wird durch Katalase zu Wasser abgebaut (Regoli & Giuliani, 2014; Xie *et al.*, 2015). Somit stellt die Messung der SOD-Aktivität einen guten Marker für oxidativen Stress dar (Valavanidis *et al.*, 2006). Zur Auswertung der Superoxiddismutase-Aktivität wurden Rückenproben verwendet, da sich herausgestellt hatte, dass Gewebe, wie die Leber, eine zu hohe SOD-Aktivität aufwiesen und auch nach Verdünnungen nicht in den Anwendungsbereich des verwendeten internen Standards fielen.

#### 5.4.6.1 Methode

Die Analyse der Aktivität der Superoxiddismutase wurde mit dem kommerziell erhältlichen Assay-Kit von Cayman Chemicals durchgeführt (Item No. 706002, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Die Proben wurden 1:5 mit HEPES-Puffer verdünnt, homogenisiert und bei  $1500 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, mit Proben-Puffer im Verhältnis 1:150 gemischt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis maximal einen Monat zur Weiterverarbeitung eingefroren. Der Assay wurde in einer 96-Well Platte durchgeführt. Es wurden  $19,95\text{ mL}$  Assay-Puffer mit  $50\text{ }\mu\text{L}$  Tetrazoliumsalzlösung (Item No. 706004, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) gemischt und  $200\text{ }\mu\text{L}$  dieser Mischung in jedes Well pipettiert. Anschließend wurde eine Standardreihe (0; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 SOD-Aktivität (U/mL)) aus Rindererythrozyten-Superoxiddismutase (Item No. 706005, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) sowie  $10\text{ }\mu\text{L}$  Probe in Duplikaten in die Wells pipettiert.  $50\text{ }\mu\text{L}$  Xanthinoxidaselösung (Item No. 706006, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) wurde mit  $1,95\text{ mL}$  Assay-Puffer gemischt und  $20\text{ }\mu\text{L}$  dieser Lösung in alle Wells gegeben. Anschließend wurde die Platte mit Klebefolie verschlossen, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei  $450\text{ nm}$  mit einem Mikrotiterplattenleser (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) gemessen. Die SOD-Aktivität ist in Units/mL angegeben, wobei eine Unit als die Menge an Enzym definiert wird, die benötigt wird  $50\%$  der Superoxidradikale umzusetzen.

## 5.5 Chemische Analytik

Während der Versuche wurden Wasserproben und am Ende der Versuche Gewebeproben der Tiere entnommen, um den Citalopram- bzw. Venlafaxingehalt der Proben zu bestimmen. Die Wasserproben wurden jeweils zu Versuchsbeginn und Versuchsende und in regelmäßigen Abständen während der Versuche vor und nach Wasserwechseln entnommen. Je drei Replikate an Testmedium aus den jeweiligen Treatments wurden zu 900 µL gepoolt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Bei den Gewebeproben der Tiere zur Bestimmung der Antidepressivakonzentration handelte es sich um Schwanzproben, die hauptsächlich Muskel enthielten. Diese Gewebeproben wurden ebenfalls bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 5.5.1 Wasseranalytik

Die chemische Analytik der Wasserproben wurde von den Projektpartnern Selina Tisler und Rebecca Bauer unter Betreuung von Prof. Dr. Christian Zwiener (Arbeitsgruppe Umweltanalytik, Zentrum für Angewandte Geowissenschaften, Universität Tübingen) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten auf der Basis einer Flüssigchromatographie Massenspektrometrie-Kopplung (Liquid chromatography – mass spectrometry = LC-MS). Die Auftrennung erfolgte mit einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-System (1290 infinity HPLC system, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) und die anschließende Analyse mit einem Triple Quadrupol-Massenspektrometer (6490 iFunnel Triple Quadrupole LC/MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mit Electrospray-Ionisation. Die Nachweisgrenze lag bei 10 ng/L Citalopram bzw. Venlafaxin.

### 5.5.2 Gewebeanalytik

Die chemische Analytik der Muskelgewebeproben wurde von den Projektpartnern Michel Banet und Sarah Knoll unter Betreuung von Prof. Dr. Carolin Huhn (Arbeitsgruppe Effektbasierte Umweltanalytik, Universität Tübingen) durchgeführt. Zur Extraktion wurde eine miniaturisierte und optimierte QuEChERS-Methode (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**fficient, **R**ugged, **S**afe) angewandt. Die Gewebeproben wurden gepoolt (jeweils 10 Proben desselben Replikats), auf Stickstoff homogenisiert und Acetonitril und Wasser hinzugefügt. Zur Extraktion wurde Natriumchlorid und wasserfreies Magnesiumsulfat hinzugegeben und für 30 Sekunden geschüttelt. Nachdem die Proben 15 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert wurden, wurde 100 µL der Acetonitrilphase entnommen, unter einem kontinuierlichen Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand in 300 µL Methanol gelöst. Die analytischen Messungen erfolgten auf der Basis einer Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS). Die Auftrennung erfolgte mit einem Flüssigkeitschromatographie-System (1260 Infinity LC system, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) gekoppelt an ein Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer (6550 iFunnel QTOF mass spectrometer, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany and Santa Clara, CA, USA) mit Electrospray-Ionisation. Die Nachweisgrenze lag bei 0,06 ng/g Citalopram bzw. Venlafaxin.

## 5.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit den Programmen JMP 14 (SAS Institute, Cary, NC, USA) und R 3.5.0 (R, The R Foundation, Wien, Österreich) (packages: lme4, survival, multcomp, ggplot2) durchgeführt. Mortalität sowie Zeit bis zum Schlupf wurden mit einem Cox-proportional-hazards Model (Aquarium-ID als Zufallsfaktor) ausgewertet. Länge und Gewicht der Tiere, die Ergebnisse der biochemischen Biomarker Hsp70-Level, B-Esterasen-Aktivität, Superoxiddismutase-Aktivität sowie die zurückgelegte Distanz aus dem Versuch zum Schwimmverhalten unter Stressbedingungen wurden mit einer nested ANOVA mit anschließendem post-hoc Dunnett's Test ausgewertet. Falls keine Normalverteilung oder Varianzhomogenität gegeben waren, wurden die Daten transformiert. Wurde durch die Transformation keine Normalverteilung erreicht, wurden die Daten mit einem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Test und anschließender post-hoc Steelmethode mit Kontrolle analysiert. Ergab eine Transformation keine Varianzhomogenität, wurde eine Welch-ANOVA mit anschließendem post-hoc Dunnett's Test durchgeführt. Die Daten zum Cortisolgehalt, der mittleren Geschwindigkeit über die Zeit, sowie Bewegungen über die Zeit aus dem Versuch zum Schwimmverhalten unter Stressbedingungen wurden mittels eines linearen Modells (Aquarium-ID als Zufallsfaktor) und anschließendem post-hoc Dunnett's Test ausgewertet. Die Daten zum Schwimmverhalten während der Exposition (Aquariumsposition) wurden mit einem generalisierten linearen Model (Binomialverteilung, Aquarium-ID als Zufallsfaktor) und anschließendem post-hoc Dunnett's Test analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse der histologischen Untersuchungen, Kategorie und Glykogengehalt, wurden mit einem Likelihood-Verhältnis- $\chi^2$ -Test mit anschließenden Einzelvergleichen zur Kontrolle durchgeführt. Zur Korrektur auf multiples Testen wurde die Benjamini-Hochberg-Methode angewandt (Benjamini & Hochberg, 1995). Das  $\alpha$ -Level wurde auf 0,05 gesetzt. Vergleiche zwischen den Versuchen und den Temperaturen fanden nur deskriptiv statt.



## 6 Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Kapitel I

#### **Impact of the antidepressant citalopram on the behaviour of two different life stages of brown trout**

M. Ziegler, S. Knoll, H.-R. Köhler, S. Tisler, C. Huhn, C. Zwiener, R. Triebkorn, 2020

*PeerJ* 8(e8765), DOI: [10.7717/peerj.8765](https://doi.org/10.7717/peerj.8765)

Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, welche Auswirkungen Citalopram auf die Entwicklung und das Verhalten von Bachforellen in zwei unterschiedlichen Lebensstadien hat. Hierfür wurden Bachforelleneier im Augenpunktstadium für etwa fünf Monate bei 7 °C und 11 °C gegenüber 0, 1, 10, 100, 1000 µg/L des Antidepressivum Citalopram exponiert. Während des Versuchs wurden die Entwicklungsendpunkte Schlupfrate und Herzschlagrate erfasst. In einem weiteren Versuch wurden juvenile Bachforellen bei 7 °C für 28 Tage gegenüber denselben Citalopramkonzentrationen exponiert. In beiden Versuchen wurden die apikalen Endpunkte Mortalität, Länge und Gewicht erfasst. Während der Versuche wurden zusätzlich Fotos der Aquarien angefertigt, um Verhaltensveränderungen der Tiere während der Versuche aufzuzeichnen. Am Ende der Versuche wurde ein Teil der Tiere in einer selbst gebauten Apparatur zur automatisierten Aufnahme gefilmt. Dadurch wurde das Schwimmverhalten der Tiere unter Stressbedingungen ermittelt. Bei den juvenilen Bachforellen wurde zusätzlich der Cortisolgehalt im Rückenmuskel- und Nierengewebe analysiert. In beiden Versuchen wurde begleitend eine Analyse der Wasserkonzentrationen sowie der Muskelgewebekonzentrationen von Citalopram durchgeführt. Die Wasserkonzentrationen wurde mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Triple Quadrupol Massenspektrometer von Selina Tisler (Umweltanalytik, ZAG, Universität Tübingen) analysiert. Die Citalopram-Gewebekonzentrationen wurden mit einem Flüssigkeitschromatographie-System gekoppelt mit einem Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometrer von Sarah Knoll (Effektbasierte Umweltanalytik, Universität Tübingen) analysiert.

Die Wasserwerte während der Versuche lagen im akzeptablen Bereich (Bachforellenlarven 7 °C: Temperatur:  $7,1 \pm 0,32$  °C; Leitfähigkeit:  $472,6 \pm 9,9$  µS/cm; pH:  $8,08 \pm 0,41$ ; Sauerstoffgehalt:  $10,77 \pm 0,3$  mg/L; Bachforellenlarven 11 °C: Temperatur:  $10,47 \pm 0,24$  °C; Leitfähigkeit:  $478,3 \pm 7,2$  µS/cm; pH:  $7,69 \pm 0,46$ ; Sauerstoffgehalt:  $9,94 \pm 0,5$  mg/L; Juvenile Bachforellen: Temperatur:  $7,15 \pm 0,41$  °C; Leitfähigkeit:  $493,7 \pm 17,5$  µS/cm; pH:  $8,09 \pm 0,01$ ; Sauerstoffgehalt:  $11,22 \pm 0,1$  mg/L). Bei der Untersuchung der Citalopramkonzentrationen im Testmedium zeigte sich, dass die Realkonzentrationen im Mittel etwa 90 % der Nominalkonzentrationen betragen und zwischen den Versuchen vergleichbar waren.

Die gemessenen Citalopram-Gewebekonzentrationen korrelierten mit den jeweiligen realen Wasserkonzentrationen. Die Bachforellenlarven, die bei 7 °C exponiert waren, hatten dreifach höhere Gewebekonzentrationen verglichen mit den Bachforellenlarven bei 11 °C. Eine Begründung hierfür könnte die 28 Tage längere Expositionszeit der Bachforellenlarven bei 7 °C darstellen. Aber auch ein erhöhter Metabolismus der Bachforellenlarven bei 11 °C könnte zu geringeren Gewebekonzentrationen von Citalopram geführt haben. Die juvenilen Bachforellen, die ausschließlich bei 7 °C gehalten wurden, wiesen hingegen eine etwa zehnfach höhere Citalopramkonzentration im Gewebe auf als die Bachforellenlarven, die ebenfalls bei 7 °C gehalten wurden. Dies könnte mit dem unterschiedlichen Alter der Tiere und dem weiter entwickelten Gastrointestinaltrakt sowie der weiter ausgebildeten Kiemen der juvenilen Bachforellen zusammenhängen (Killeen *et al.*, 1999a; Wells & Pinder, 1996), was eine stärkere Aufnahme und Akkumulation des Stoffes bedingen kann. Auch bei Zebrabärblingen, die gegenüber niedrigen Konzentrationen von Citalopram ausgesetzt waren, und bei Regen- bzw. Bachforellen, die gegenüber Abwasser mit Citalopramkonzentrationen im zweistelligen ng/L Bereich exponiert waren, zeigte sich, dass das Antidepressivum im Gewebe der Tiere angereichert werden kann. Jedoch waren die Gewebekonzentrationen im Gehirn, der Leber und der Niere deutlich höher als im Muskelgewebe, in dem in 2 von 3 Fällen kein Citalopram nachgewiesen werden konnte (Grabicova *et al.*, 2014; Grabicova *et al.*, 2017; Sackerman *et al.*, 2010). Die höchsten Gewebekonzentrationen ( $115 \pm 37$  ng/g) wurden im Hirn von Zebrabärblingen nachgewiesen, die gegenüber 24,3 µg/L Citalopram für 3 Minuten exponiert waren (Sackerman *et al.*, 2010). Die im vorliegenden Versuch nachgewiesenen und im Vergleich zu Daten in der Literatur relativ hohen Gewebekonzentrationen sind durch die deutlich höheren Wasserkonzentrationen und die längere Expositionszeit zu erklären.

Zwischen den Treatments traten bezüglich der Mortalität in keinem der Versuche signifikante Unterschiede auf. Dennoch wiesen die Bachforellenlarven, die bei 11 °C exponiert waren, eine höhere Mortalität (29 %) auf als die Bachforellenlarven bei 7 °C (5 %). Die Zeit kurz nach Aufzehrung des Dottersacks, in der die erhöhte Mortalität der Fische bei 11 °C auftrat, ist eine kritischen Lebensphase bei Bachforellen (Klemetsen *et al.*, 2003). Diese erhöhte Mortalität könnte aufgrund des erhöhten Metabolismus bei 11 °C und des erhöhten Energiebedarfs sowie dem daraus resultierenden höheren Stress, in dieser kritischen Lebensphase aufgetreten sein. Im Versuch mit juvenilen Bachforellen und Citalopram starb hingegen kein Tier. Ebenso hatte Citalopram keinen Einfluss auf die Entwicklungsparameter Schlupf- und Hezschlagrate der Bachforellenlarven.

Allerdings zeigte sich in allen Versuchen, dass die Tiere, die gegenüber 1000 µg/L Citalopram exponiert waren, signifikant kleiner und leichter waren als die Kontrolltiere. Dies könnte unter

anderem mit einem erhöhten Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte der Tiere während des Versuchs zusammenhängen. Im Gegensatz dazu, hielten sich die Tiere der anderen Expositionsgruppen v.a. in Bodennähe auf. Durch die erhöhte Schwimmaktivität in der oberen Aquarienhälfte hatten die Tiere der 1000 µg/L Expositionsgruppe einen gesteigerten Energieverbrauch. Zudem wurde während der Versuche eine verringerte Futtermittelaufnahme der Tiere, die gegenüber der höchsten Konzentration exponiert wurden, beobachtet. Allerdings war die Quantifizierung der Futtermittelaufnahme nicht möglich. Appetitlosigkeit ist nachgewiesenermaßen eine häufige Nebenwirkung des Antidepressivums Citalopram, und bereits in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass es die Nahrungsaufnahme von Fischen verringert (Hexal AG, 2019a; Kellner *et al.*, 2015). Weiterhin konnte in Versuchen mit dem SSRI Fluoxetin eine Verringerung des Gewichts von Goldfischen und Zebraäbrblingen nachgewiesen werden (Mennigen *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2017).

Wie bereits zuvor beschrieben hielten sich in der höchsten Expositionsgruppe signifikant mehr Fische in der oberen Aquarienhälfte auf als in der Kontrollgruppe. Dieser Effekt trat sowohl bei den Bachforellenlarven bei beiden Temperaturen als auch bei den juvenilen Bachforellen auf – hier jedoch weniger stark ausgeprägt. Ein geringer Unterschied bezüglich des Aufenthalts in der oberen Aquarienhälfte zwischen den Larven, die gegenüber 1000 µg/L bei 7 °C (80 %) bzw. 11 °C (65 %) exponiert waren, könnte mit einer längeren Expositionszeit der Tiere bei 7 °C erklärt werden. Zudem kann sich, durch die langsamere Entwicklung der Tiere bei 7 °C, das Entwicklungsstadium dieser vom Entwicklungsstadium der 11 °C Tiere unterscheiden haben, wodurch ebenfalls Unterschiede zustande gekommen sein könnten. Im Versuch mit den juvenilen Bachforellen hielten sich dagegen etwa 25 % der Tiere, die gegenüber 1000 µg/L Citalopram exponiert waren, in der oberen Aquarienhälfte auf. Dieser Unterschied zwischen den larvalen und juvenilen Bachforellen könnte ebenfalls aufgrund der längeren Exposition der Bachforellenlarven, aber auch durch die unterschiedliche Sensitivität der zwei Lebensstadien erklärt werden. Das Aufnahmedesign des Verhaltens während der Exposition berücksichtigt verschiedene Aspekte, die auch mit anderen Versuchsdesigns analysiert werden: der Aufenthalt im oberen bzw. unteren Bereich der Aquarien kann mit dem Novel Tank Test untersucht werden, die Hell-/Dunkelpräferenz lässt sich mit dem Scototaxis Test analysieren (Maximino *et al.*, 2010a; Maximino *et al.*, 2010b; Stewart *et al.*, 2012). Hierbei deutet eine erhöhte Präferenz zum Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte bzw. im helleren Aquarienbereich auf ein verringertes Angstverhalten der Fische hin (Maximino *et al.*, 2010b; Stewart *et al.*, 2012). Da die Tiere sich normalerweise in der unteren Hälfte des Aquariums und am dunkleren Aquariumboden aufhalten, wie in der Kontrollgruppe ersichtlich, zeigen die Citalopram-exponierten Fische ein Verhalten, durch das die angstlösende Wirkung des Antidepressivums zum Ausdruck kommt. Zu ähnlichen Effekten führte die Belastung mit Citalopram bei Endlers Guppys, Dreistachlichen Stichlingen oder Zebrafischen im Novel Tank Test (Kellner *et al.*, 2016; Olsén *et al.*, 2014; Sackerman *et al.*, 2010). Die

niedrigsten Effektkonzentrationen lagen hierbei jedoch mit 1,5 µg/L tiefer als bei den Bachforellen was sowohl an einer höheren Sensitivität des Novel Tank Test als auch an einer höheren Sensitivität der Testorganismen liegen könnte. Zudem zeigten auch andere Antidepressiva wie Fluoxetin oder Amitriptylin bei Fischen eine Verringerung der Angst und einen vermehrten Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte (Demin *et al.*, 2017; Henry & Black, 2008; Meshalkina *et al.*, 2018). Jedoch konnte in der vorliegenden Studie dieser durch Citalopram ausgelöste Effekt bei der einheimischen Fischart Bachforelle nach einer chronisch Exposition bei zwei unterschiedlichen Lebensstadien über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden.

Citalopram hatte keinen Einfluss auf den Cortisolgehalts im Muskel und Nierengewebe der juvenilen Bachforellen. Jedoch zeigte sich, dass die Tiere, die in der Aufnahme-Apparatur auf ihr Schwimmverhalten hin untersucht wurden, ein signifikant höheres Cortisollevel aufwiesen als die Tiere, deren Schwimmverhalten nicht aufgezeichnet wurde. Dies zeigt, dass die Aufnahme-Apparatur einer stressvollen Umgebung für Fische entspricht.

Die Analyse des Schwimmverhaltens in unbekannter, stressvoller Umgebung zeigte, dass die Aktivität von Bachforellenlarven, die bei 7 °C gegenüber 100 und 1000 µg/L Citalopram exponiert waren, im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert war. Die gesamte zurückgelegte Distanz der exponierten Tiere sowie die mittlere Geschwindigkeit über die Zeit waren signifikant geringer als bei Kontrollfischen. Die Zeit, in der sich die Tiere nicht bewegten, war dagegen bei Citalopram-exponierten Fischen deutlich höher als bei Kontrollen. Bachforellenlarven, die bei 11 °C gegenüber 1000 µg/L Citalopram exponiert waren, legten ebenfalls eine deutlich geringere Schwimmstrecke zurück als Kontrollfische. Jedoch war bezüglich der mittleren Geschwindigkeit über die Zeit und der Bewegungsaktivität nur ein Trend zu verringerter Aktivität erkennbar. Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss von Citalopram auf die Aktivität der juvenilen Bachforellen in stressvoller Umgebung nachgewiesen werden. Dieser Unterschied im Schwimmverhalten zwischen larvalen und juvenilen Fischen könnte entweder ebenfalls an der deutlich längeren Expositionszeit der Bachforellenlarven, aber auch an einer unterschiedlichen Sensitivität der Altersstadien liegen. Die verringerte Aktivität der Bachforellenlarven könnte ein lethargisches Verhalten oder eine Angststarre der Fische repräsentieren. Wenn man allerdings das Verhalten über die Zeit betrachtet, ist wahrscheinlicher, dass Citalopram durch seine angsthemmende Wirkung die Tiere beruhigt und diese deshalb eine verringerte Fluchtreaktion und eine geringere Aktivität während der Verhaltensaufnahmen zeigten. Diese Interpretation stimmt auch mit den Ergebnissen des Verhaltens während des Versuchs überein. Ähnlich dazu führten bereits andere Antidepressiva wie Fluoxetin, Venlafaxin oder Sertralin zu einer verringerten Aktivität bei Fischen (Maulvault *et al.*, 2018; Saaristo *et al.*, 2017; Sehonova *et al.*, 2019; Zindler *et al.*, 2020a). Ebenso konnte eine Verringerung des Fluchtverhaltens von Fischen

durch die Antidepressiva Fluoxetin und Venlafaxin gezeigt werden (Martin *et al.*, 2017; Painter *et al.*, 2009).

Weiterhin wurde durch die Berechnung der Citalopramplasmakonzentration in den Fischen gezeigt werden, dass die berechneten Plasmakonzentration der Fische, die die beschriebenen Verhaltensauffälligkeiten zeigten, den Plasmakonzentrationen von Menschen, die mit dem Antidepressivum behandelt wurden entsprechen oder diese sogar über steigen.

Durch die beschriebenen Experimente mit den beiden Lebensstadien der Bachforellen konnten Effekte und Nebeneffekte von Citalopram in den Fischen nachgewiesen werden, die für den Menschen bekannt sind. Diese Effekte traten ab einer Konzentration von 100 µg/L auf, welche 100-fach höher ist, als Konzentrationen die in der Umwelt nachweisbar sind. Da mit dem Verhalten und dem Wachstum der Tiere populationsrelevante Endpunkte betroffen sind (Ågerstrand *et al.*, 2020; Sutherland, 1996; Tribskorn *et al.*, 2014), kann unter der Berücksichtigung von Sicherheitsfaktoren durch Citalopram von einem mittleren Umweltrisiko ausgegangen werden (siehe 7.3 Bewertung der Umweltrelevanz).

## 6.2 Kapitel II

### **Behavioral and Developmental Changes in Brown Trout After Exposure to the Antidepressant Venlafaxine**

M. Ziegler, M. Banet, R. Bauer, H.-R. Köhler, S. Stepinski, S. Tisler, C. Huhn, C. Zwiener, R. Triebkorn, 2021

*Frontiers in Environmental Science* 8(586584), DOI: [10.3389/fenvs.2020.586584](https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.586584)

In diesem Kapitel wurden die Entwicklungs- und Verhaltensänderungen von Bachforellen in zwei Lebensstadien durch eine Exposition gegenüber dem Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer Venlafaxin untersucht. Mit einem vergleichbaren Versuchsaufbau wie in Kapitel I, wurden Bachforelleneier ab Augenpunktstadium bis sieben Wochen nach Aufzehrung des Dottersacks der Larven (etwa 5 Monate) gegenüber 1, 10, 100 und 1000 µg/L Venlafaxin bei 7 °C und 11 °C exponiert. Juvenile Bachforellen wurden gegenüber denselben Konzentrationen bei 7 °C für 25 Tage exponiert. Es wurden apikale Endpunkte wie Mortalität, Länge und Gewicht sowie das Verhalten der Bachforellen während der Versuche und in einer stressvollen Umgebung untersucht. Zusätzlich wurde die Schlupf- und Herzschlagrate der Bachforellenlarven erfasst. Bei den juvenilen Bachforellen wurde zusätzlich der Cortisolgehalt im Muskel- und Nierengewebe analysiert. In allen Versuchen wurde die Venlafaxinkonzentration im Testmedium und im Muskel der Fische analysiert. Die Wasseranalytik wurde von Rebecca Bauer und Selina Tisler (Umweltanalytik, ZAG, Universität Tübingen) mittels eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Systems gekoppelt mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer durchgeführt. Die Venlafaxin-Gewebekonzentrationen wurden von Michel Banet (Effektbasierte Umweltanalytik, Universität Tübingen) mit einem Flüssigkeitschromatographie-System gekoppelt mit einem Quadrupol-time-of-flight Massenspektrometer analysiert.

Während der Versuche lagen die Wasserwerte in einem akzeptablen Bereich (Bachforellenlarven 7 °C: Temperatur:  $7,25 \pm 0,26$  °C; Sauerstoffgehalt:  $11,18 \pm 0,33$  mg/L; pH:  $8,26 \pm 0,23$ ; Leitfähigkeit:  $489,2 \pm 28,3$  µS/cm; Bachforellenlarven 11 °C: Temperatur:  $11,37 \pm 0,23$  °C; Sauerstoffgehalt:  $9,92 \pm 0,06$  mg/L; pH:  $7,90 \pm 0,11$ ; Leitfähigkeit:  $469,8 \pm 2,3$  µS/cm; Juvenile Bachforellen: Temperatur:  $7,01 \pm 0,26$  °C; Sauerstoffgehalt:  $11,24 \pm 0,08$  mg/L; pH:  $7,43 \pm 0,28$ ; Leitfähigkeit:  $489,6 \pm 6,75$  µS/cm). Ebenso lagen die Nitritgehalte des Versuchs mit Bachforellenlarven bei 7 °C sowie bei juvenilen Bachforellen im akzeptablen Bereich (Bachforellenlarven 7 °C: 0,0068 mg/L; Juvenile Bachforellen: 0,05 mg/L). Lediglich der Nitritgehalt im Versuch mit Bachforellenlarven bei 11 °C war am Ende des Versuchs erhöht (0,6 mg/L). Jedoch war ein Monat vor Versuchsende ein akzeptabler Nitritgehalt von unter 0,1 mg/L gemessen worden. Die realen Venlafaxin-

Wasserkonzentrationen lagen während aller Versuche bei mindestens 75 % der Nominalkonzentrationen.

Die Venlafaxin-Gewebekonzentrationen korrelierten mit den realen Wasserkonzentrationen. Die Gewebekonzentrationen der Kontrolltiere lagen sowohl bei den Bachforellenlarven bei 7 °C als auch bei den juvenilen Bachforellen unterhalb der Nachweisgrenze von 5 ng/L. Zwischen den Bachforellenlarven, die bei 7 °C gegenüber Venlafaxin exponiert waren, und den bei gleicher Temperatur exponierten juvenilen Bachforellen zeigten sich trotz der deutlich längeren Expositionszeit der Bachforellenlarven keine deutlichen Unterschiede in der Venlafaxinkonzentration im Muskelgewebe. Eine Erklärung könnte sein, dass sich die Gewebekonzentrationen abhängig von der Umgebungskonzentration auf einem konstanten Level einpendeln und es zu keiner deutlichen Bioakkumulation kommt (Meador *et al.*, 2017). Die berechneten Biokonzentrationsfaktoren (BCF) sind in der niedrigsten Konzentration mit bis zu 14 am höchsten und liegen bei den übrigen Konzentrationen in beiden Altersstadien zwischen 3,5 bis 8. Die gemessenen Gewebekonzentrationen der niedrigsten Konzentrationen stimmen mit Ergebnissen in der Literatur überein. In Geweben von *Catostomus commersonii*, sowie Regen- und Bachforellen, die gegenüber Flusswasser bzw. Kläranlagenabläufen mit Venlafaxinkonzentrationen im dreistelligen ng/L Bereich exponiert waren, konnten Konzentrationen von bis zu  $21 \pm 11$  ng/g in Leber, Gehirn und Niere nachgewiesen werden (Grabicova *et al.*, 2014; Grabicova *et al.*, 2017; Schultz *et al.*, 2010). Allerdings war kein Venlafaxin im Muskelgewebe nachzuweisen. In der Literatur beschriebene Biokonzentrationsfaktoren liegen generell zwischen 3,3 und 63 je nach Tierart, Gewebe und Expositionsszenario (Grabicova *et al.*, 2014; Grabicova *et al.*, 2017), was die Stimmigkeit der im vorliegenden Versuch gemessenen bzw. errechneten Werte stützt.

Auf die Entwicklungsparameter Schlupf- und Herzschlagrate hatte Venlafaxin keinen Einfluß. Die Mortalität wurde bei juvenilen Bachforellen nicht durch Venlafaxin beeinflusst. Bei Bachforellenlarven, die bei 11 °C exponiert waren, war die Mortalität in allen Expositionsgruppen höher als bei den Tieren, die bei 7 °C exponiert waren. Diese erhöhte Mortalität trat kurz nach Aufzehrung des Dottersacks nach 46 Tagen nach Schlupf auf, was eine kritische Lebensphase bei Bachforellen darstellt (Klemetsen *et al.*, 2003). Ein zu hoher Nitritwert konnte als Einflussfaktor ausgeschlossen werden, da die erhöhte Mortalität der Bachforellenlarven bei 11 °C zwischen Tag 95 und 105 der Exposition auftrat, die Nitritwerte aber an Tag 106 mit 0,1 mg/L in einem akzeptablen Bereich lagen (Brown & McLeay, 1975; Molony, 2001; Smith & Williams, 1974). Zudem reagieren larvale Bachforellen nicht so sensitiv auf Nitrit wie adulte Tiere (Bartlett & Neumann, 1998). Die Mortalität war bei Bachforellenlarven, die gegenüber 1000 µg/L bei 11 °C exponiert waren, war mit 29 % zwar höher als diejenige der Kontrollgruppe (20 %), allerdings war dieser Unterschied nicht

statistisch signifikant. Bei den Bachforellenlarven, die bei 7 °C exponiert waren, zeigte sich ein statistischer Trend, dass mehr Tiere in der Expositionsgruppe mit der höchsten Venlafaxinkonzentration (14 %) als in der Kontrollgruppe (3 %) starben. Dies könnte an der längeren Expositionszeit der Larven bei 7 °C liegen (128 Tage im Vergleich zu 105 Tagen bei 11°C). Zudem kann die grundsätzlich erhöhte Mortalität der Tiere bei 11 °C in allen Expositionsgruppen einen Effekt von Venlafaxin auf die Mortalität zusätzlich verschleiern haben. Eine erhöhte Mortalität bei Venlafaxin-exponierten Fischen ist bereits bei Dickkopfelritzen und Geißbrassen beschrieben (Rodrigues *et al.*, 2019; Schultz *et al.*, 2011).

Bei juvenilen Bachforellen konnte kein Einfluss von Venlafaxin auf das Gewicht und die Länge der Tiere festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch, dass Bachforellenlarven, die bei 11 °C gegenüber 100 µg/L, sowie bei 7 °C gegenüber 10 µg/L Venlafaxin exponiert waren, signifikant kleiner waren als die Kontrolltiere. Ebenso waren die Bachforellenlarven, die gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin bei 7 °C exponiert waren, signifikant leichter als die Kontrolltiere. Bei 11°C beeinflusste Venlafaxin das Gewicht der Tiere nicht. Bei den Tieren die gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin bei beiden Temperaturen exponiert waren, war zudem eine verringerte Nahrungsaufnahme festzustellen, welche jedoch nicht quantifiziert werden konnte. Bei den bei 7 °C exponierten Bachforellenlarven fielen diese Effekte am deutlichsten aus, was wiederum an der deutlich längeren Expositionszeit der Tiere liegen könnte. Dennoch können auch andere Faktoren, wie ein höherer Metabolismus der Bachforellenlarven bei 11 °C als auch unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Lebensstadien nicht ausgeschlossen werden.

Bekannt ist, dass Venlafaxin den Appetit beim Menschen verändern und das Gewicht von Ratten reduzieren kann (de Oliveira *et al.*, 2004; Hexal AG, 2019b; ratiopharm GmbH, 2019a; Stahl, 1998). Ebenso konnte bereits für andere Antidepressiva gezeigt werden, dass die Futtermittel- und die Futteraufnahme von Fischen verringert werden kann (Kellner *et al.*, 2015; Mennigen *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2017).

Das Verhalten der gegenüber Venlafaxin exponierten Bachforellen war während aller Versuche verändert. Sowohl juvenile Bachforellen als auch Bachforellenlarven, die gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin exponiert waren, hielten sich häufiger in der oberen Aquarienhälfte auf als die Kontrolltiere. Einen zeitlich verzögerten Effekt konnte für die Bachforellenlarven gezeigt werden, die gegenüber 100 µg/L Venlafaxin bei 7 °C exponiert waren. Diese wiesen erst nach einer Expositionszeit von 114 Tagen einen erhöhten Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte auf. Bei Bachforellenlarven, die gegenüber 100 µg/L bei 11 °C exponiert waren, zeigte sich dieser Effekt nicht. Dies liegt vermutlich an der kürzeren Exposition von insgesamt 105 Tagen. Da im Versuch mit juvenilen Bachforellen bereits ab Tag eins der Aufenthalt im Aquarium dokumentiert wurde, konnte



gezeigt werden, dass die Fische erst ab einer Expositionszeit von 4 Tagen einen erhöhten Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte aufwiesen. Ähnlich hierzu tritt die Wirkung von Antidepressiva im Menschen erst nach einer Latenzzeit von mehreren Tagen bis Wochen auf (Rupprecht *et al.*, 2004). Maulvault *et al.* (2018) zeigten bei juvenilen Adlerfische einen erhöhten Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte im Novel Tank Test nach Venlafaxinexposition. Ebenso konnte für andere Antidepressiva gezeigt werden, dass diese den Aufenthalt von Fischen in der oberen Aquarienhälfte erhöhen (Demin *et al.*, 2017; Kellner *et al.*, 2016; Olsén *et al.*, 2014; Sackerman *et al.*, 2010).

Venlafaxin hatte keinen Einfluss auf den Cortisolgehalt bei den juvenilen Bachforellen. Dennoch zeigte sich, dass der Cortisolgehalt im Muskel- und Nierengewebe derjenigen Tiere, die in der automatisierten Aufnahme-Apparatur „unter Stress“ aufgezeichnet wurden, signifikant erhöht war. Dies bestätigt die Ergebnisse, die bereits in Kapitel I geschildert wurden.

In stressvoller Umgebung konnten ebenfalls Verhaltensveränderungen der gegenüber Venlafaxin exponierten Bachforellen festgestellt werden. Die gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin exponierten Fische zeigten eine verminderte Aktivität verglichen mit den Kontrolltieren. Bachforellenlarven, die gegenüber 10 und 1000 µg/L bei 11 °C, Bachforellenlarven, die gegenüber mindestens 100 µg/L bei 7 °C, und juvenile Bachforellen, die gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin, exponiert waren wiesen eine verringerte zurückgelegte Distanz auf. Zudem zeigten Bachforellenlarven, die gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin bei beiden Temperaturen exponiert waren, eine verringerte Geschwindigkeit über die Aufnahmezeit, sowie eine längere Zeit, in der sich die Tiere nicht bewegten. Für juvenile Bachforellen ergaben sich hinsichtlich Schwimmggeschwindigkeit sowie Bewegungsaktivität keine Unterschiede zur Kontrolle. Die stärkeren Effekte für Bachforellenlarven verglichen mit den juvenilen Bachforellen könnten ebenfalls mit der deutlich längeren Expositionszeit als auch unterschiedlicher Sensitivität der Altersstadien zusammenhängen. Insgesamt ist eine verringerte Aktivität und verringertes Fluchtverhalten der Fische in diesem Verhaltensaufnahmedesign ein Indiz für eine gehemmte Angstreaktion. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Venlafaxin die Fluchtreaktion von Dickkopfritzen verringert (Painter *et al.*, 2009). Ebenso zeigte Venlafaxin eine reduzierte Aktivität bei Adlerfischen (Maulvault *et al.*, 2018).

Die oben beschriebenen Effekte waren bei den exponierten Bachforellenlarven deutlich stärker als bei den juvenilen Fischen. Da die Larven jedoch länger exponiert waren, kann keine Aussage über unterschiedliche Sensitivitäten der beiden Altersstadien gemacht werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Venlafaxin Effekte auf Mortalität und Wachstum von Bachforellenlarven sowie deutliche Effekte auf das Verhalten der Fische, unabhängig vom Lebensstadium, hat. Die Effekte traten ab 10 µg/L auf, welche zehnfach höher ist als bereits in der

Umwelt nachgewiesene Konzentrationen. Aufgrund dessen und mit der Berücksichtigung von Sicherheitsfaktoren kann von einem Umweltrisiko durch Venlafaxin ausgegangen werden (siehe 7.3 Bewertung der Umweltrelevanz).

### 6.3 Kapitel III

#### **Biochemical and cellular biomarkers in brown trout (*Salmo trutta f. fario*) in response to the antidepressants citalopram and venlafaxine**

M. Ziegler, H. Eckstein, H.-R. Köhler, S. Ottmann, L. Reinelt, S. Stepinski, R. Triebkorn, 2020

*Environmental Sciences Europe* 32(158), DOI: [10.1186/s12302-020-00437-z](https://doi.org/10.1186/s12302-020-00437-z)

In dieser Studie wurden die Effekte der Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin auf biochemische Biomarker sowie auf die Leberhistologie von Bachforellen untersucht. Es wurden Bachforelleneier im Augenpunktstadium gegenüber 0, 1, 10, 100 und 1000 µg/L Citalopram oder Venlafaxin für fünf Monate exponiert. Ebenso wurden juvenile Bachforellen gegenüber denselben Konzentrationen dieser Antidepressiva für etwa vier Wochen exponiert. Anschließend wurden für die Analyse der strukturellen und biochemischen Biomarker Gewebeproben der Fische entnommen. Es wurden die B-Esterasen-Aktivität, das Stressproteinlevel, und die Superoxiddismutase-Aktivität sowie die Leberhistologie betrachtet. Die Analyse der Aktivität der B-Esterasen sowie der Leberhistologie wurde in allen Versuchen durchgeführt. Das Stressproteinlevel wurde nur von juvenilen Bachforellen bestimmt und die Superoxiddismutase-Aktivität nur in den Versuchen mit Venlafaxin.

Nach Exposition gegenüber den beiden höchsten Citalopramkonzentrationen zeigten die exponierten Tiere einen schlechteren Gewebezustand der Leber als die Kontrolltiere. Dies war sowohl bei den Bachforellenlarven bei 11 °C als auch bei den juvenilen Bachforellen in der Expositionsgruppe mit 1000 µg/L Citalopram und bei Bachforellenlarven, die bei 7 °C gegenüber 100 µg/L Citalopram exponiert waren im Vergleich zur Kontrolle signifikant schlechter. Zusätzlich war in allen Versuchen zu erkennen, dass die Bachforellen, die gegenüber der höheren Citalopramkonzentrationen exponiert waren, einen geringeren Glykogengehalt aufwiesen als die Kontrolltiere. Dieser Unterschied war jedoch nur bei Bachforellenlarven, die gegenüber 1000 µg/L Citalopram bei 11 °C exponiert waren, signifikant. Die gefundenen Schadbilder in der Leber, wie Hyperplasie der Hepatozyten, vermehrte Entzündungen und vermehrte Vakuolisierung, waren konsistent zwischen den Versuchen mit Citalopram. Diese Schadbilder könnten aufgrund einer erhöhten Metabolismusrate durch den Abbau von Citalopram hervorgerufen worden sein. Ähnliche Schadbilder konnten bereits für Citalopram und Fluoxetin in Studien mit Ratten nachgewiesen werden (Ahmadian *et al.*, 2017; Mohammadi *et al.*, 2013; Zlatković *et al.*, 2014). Zusätzlich konnte in Fallstudien mit Menschen der Zusammenhang zwischen einer Citalopramgabe und Leberschäden wie Hepatitis nachgewiesen werden (Hunfeld *et al.*, 2010; Neumann *et al.*, 2008). Der verringerte Glykogengehalt der Tiere der höchsten Expositionsgruppe steht zudem in Zusammenhang mit einer verringerten Nahrungsaufnahme und infolgedessen auch eines geringeren Gewichts, was während den Versuchen ebenfalls beobachtet werden konnten.

Venlafaxin hatte im Gegensatz dazu keine Auswirkungen auf den histologischen Zustand der Lebern der exponierten Bachforellen. In allen Versuchen waren die Schadbilder gleichmäßig über die Versuchsgruppen verteilt. Auch der Glykogengehalt in den Lebern der Tiere unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Auch Schultz *et al.* (2011) fanden keine histologischen Effekte von Venlafaxin auf Dickkopfelritzen.

Die im Vergleich zu Venlafaxin stärkere Wirkung von Citalopram auf die Fischleber lässt sich auch sehr gut mit der deutlich stärkeren Anreicherung von Citalopram im Muskelgewebe der Fische in Zusammenhang bringen. Studien mit Bach- und Regenbogenforellen zeigten, dass sich beide Antidepressiva deutlich stärker in der Leber als im Muskelgewebe von Fischen anreichern, weshalb auch im vorliegenden Versuch von höheren Konzentrationen in der Leber ausgegangen werden kann (Grabicova *et al.*, 2014; Grabicova *et al.*, 2017). Da Citalopram in deutlich höheren Konzentrationen im Gewebe nachgewiesen werden konnte als Venlafaxin, und Venlafaxin mit einer Halbwertszeit von 4 h deutlich besser abbaubar ist als Citalopram (Holliday & Benfield, 1995; Noble & Benfield, 1997), kann von einer höheren Biotransformationsrate von Citalopram ausgegangen werden, was folglich den Lebermetabolismus erhöht. Dieser erhöhte Metabolismus könnte für die Reaktionen im Lebergewebe der gegenüber Citalopram exponierten Tiere ursächlich sein und eine Erklärung bieten, weshalb der Gesundheitszustand, der gegenüber Citalopram exponierten Bachforellen, schlechter war, als der der gegenüber Venlafaxin exponierten Fische.

Allgemein waren die Lebern der Bachforellenlarven, die bei 7 °C exponiert waren, in einem besseren Zustand als die der Larven bei 11 °C. Dies könnte aufgrund eines höheren Metabolismus, infolge der höheren Temperatur, der Tiere bei 11 °C aufgetreten sein.

Bei Bachforellenlarven, die gegenüber 11 °C exponiert waren, unterschied sich die SOD-Aktivität zwischen den Venlafaxin-Expositionsgruppen und der Kontrolle nicht signifikant. Jedoch war in allen Gruppen das SOD-Aktivitätslevel bereits auf einem hohen Niveau, das vergleichbar zu den höchsten Werten der exponierten Bachforellenlarven bei 7 °C war. Diese erhöhte SOD-Aktivität könnte aufgrund des erhöhten Metabolismus bei 11°C aufgetreten sein (Bagnyukova *et al.*, 2007; Madeira *et al.*, 2013). Weiterhin könnte dieses generell hohe Aktivitätsniveau der Larven bei 11 °C ein Grund sein, weshalb bei diesen Tieren kein Unterschied zwischen der SOD-Aktivität der Venlafaxin exponierten Tiere zur Kontrolle erkennbar war, da dieser möglicherweise maskiert wurde.

Anders als bei 11 °C, war bei 7 °C die SOD-Aktivität bei gegenüber 10 – 1000 µg/L Venlafaxin exponierten Fischen im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Diese erhöhte SOD-Aktivität stellt eine antioxidative Abwehr gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies dar, die durch die Exposition gegenüber Venlafaxin induziert wurde. Auch bei juvenilen Fischen führte die Exposition gegenüber Venlafaxin zu einer Erhöhung der SOD-Aktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren, die allerdings nicht signifikant war. Dennoch war diese Erhöhung der SOD-Aktivität von bis zu 22 % in gegenüber

Venlafaxin exponierten juvenilen Bachforellen und bis zu 24 % in Venlafaxin exponierten Bachforellenlarven bei 7 °C zu sehen. Erhöhter oxidativer Stress, durch erhöhte Lipidperoxidation und SOD-Aktivität konnte bereits bei gegenüber Venlafaxin exponierten Adlerfischen gezeigt werden (Maulvault *et al.*, 2019). Mehdi *et al.* (2019) bewies mit einem multiplen Stressorenexperiment, dass Venlafaxin einen schädlichen Effekt auf das antioxidative Schutzsystem von Zebrabärblingen ausübte. Zudem bildeten sich in einer Studie mit Rattenhepatozyten vermehrt reaktive Sauerstoffspezies nach Venlafaxin-Applikation (Ahmadian *et al.*, 2016). Weiterhin konnte bereits in Ratten, Fischen und Crustaceaen nachgewiesen werden, dass weitere Antidepressiva wie Citalopram, Fluoxetin oder Amitriptylin die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies induzieren können und somit zu oxidativem Stress führen (Ahmadian *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014; Zlatković *et al.*, 2014).

Für die Aktivität der B-Esterasen nach Exposition gegenüber Citalopram oder Venlafaxin konnten keine Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden. Dennoch konnten bereits Effekte von Antidepressiva wie Fluoxetin oder Sertralin auf die Acetylcholinesterase-Aktivität von Muscheln, Goldfischen oder Sandgrundeln nachgewiesen werden (Duarte *et al.*, 2019; Munari *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2015).

Ebenso zeigten sich keinerlei Unterschiede bezüglich des Stressproteinlevels der gegenüber Antidepressiva exponierten juvenilen Bachforellen. Es kann somit aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass Citalopram und Venlafaxin für Bachforellenlarven und juvenile Bachforellen kein proteotoxisches Potential bergen. Maulvault *et al.* (2019) konnten jedoch eine erhöhte Hitzeschock-Antwort in gegenüber Venlafaxin exponierten Adlerfischen nachweisen. Da das Stressproteinlevel jedoch einen sehr unspezifischen Biomarker darstellt, können durch verschiedene Faktoren wie Spezies oder Expositionsszenario unterschiedliche Ergebnisse zustande kommen.

In diesen Versuchen konnten keine durch Venlafaxin oder Citalopram verursachten proteotoxischen oder neurotoxischen Effekte bei Bachforellen nachgewiesen werden. Jedoch zeigte Citalopram ab einer Konzentration von 100 µg/L deutliche negative Effekte auf die Leberintegrität. Venlafaxin hingegen erhöhte die SOD-Aktivität, ein Marker für oxidativen Stress, ab einer Konzentration von 10 µg/L. Diese Effekte traten in ähnlichen Konzentrationen auf wie die in Kapitel I und Kapitel II dargestellten Effekte, was eine nähere Betrachtung der Umweltrelevanz der beiden Antidepressiva notwendig macht.

## 6.4 Kapitel IV

### **The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection**

A. T. Ford, M. Ågerstrand, B. W. Brooks, J. Allen, M. G. Bertram, T. Brodin, Z. Dang, S. Duquesne, R. Sahm, F. Hoffmann, H. Hollert, S. Jacob, N. Klüver, J. Lazorchak, M. Ledesma, S. D. Melvin, S. Mohr, S. Padilla, G. Pyle, S. Scholz, M. Saaristo, E. Smit, J. A. Steevens, S. van den Berg, W. Kloas, B. B.M. Wong, M. Ziegler, G. Maack, 2021

*Environmental Science & Technology*, DOI: 10.1021/acs.est.0c06493

Grundlage für diese Publikation war ein zweitägiger Workshop mit internationalen Vertretern aus den Bereichen Verhaltensforschung, Ökotoxikologie, Regulatorische Toxikologie, Neurotoxikologie, Test Standardisierung und Risikobewertung Ende Oktober 2019. Dieser Workshop hatte zum Ziel, die Rolle von Verhaltensversuchen in der Chemikalienrisikobewertung darzustellen und dahingehend Empfehlungen abzugeben, in welcher Weise Verhaltensendpunkte in die Risikobewertung von Chemikalien integriert werden können. Zudem war eine Leitfrage, welche Rolle Verhaltensforschung in Zukunft im Umweltschutz spielen soll. Hierbei war von besonderem Interesse, ob etablierte Methoden in der Verhaltensforschung für die behördliche Praxis robust genug sind oder ob noch Verbesserungsbedarf besteht. Die 28 Teilnehmer des Workshops wurden in drei Gruppen aufgeteilt, in welchen ein allgemeiner Konsens bezüglich Verhaltensforschung und Ökotoxikologie abgeleitet werden sollte. Anschließend wurden die Resultate aller Gruppen präsentiert und sechs Konsensus-Aussagen sowie Empfehlungen für die behördliche Praxis formuliert.

#### ***Aussage 1: Die Chemikalienverschmutzung beeinflusst das Verhalten von wildlebenden Tieren und von Menschen***

Es ist bereits seit langem bekannt, dass Chemikalien sowohl bei aquatischen Vertebraten, Invertebraten und terrestrische Organismen Verhaltensveränderungen auslösen können (Boyd *et al.*, 2002; Melvin & Wilson, 2013; Saaristo *et al.*, 2018; Shelford, 1917; Sollmann, 1906). Da Menschen und Tiere viele biochemische Stoffwechselwege teilen, ist es nicht verwunderlich, dass beispielsweise neuroaktive Medikamente auch bei wildlebenden Tieren Verhaltenseffekte hervorrufen können (Brodin *et al.*, 2014). Zudem konnte in neueren Studien die Verbindung zwischen Chemikalienbelastung und einem Effekt auf Verhalten, Wahrnehmung und Hirnentwicklung nachgewiesen und der Einfluss vieler Industriechemikalien auf häufigeres Auftreten von verhaltensneurologischer Störungen beim Menschen gezeigt werden (Bennett *et al.*, 2016; Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2014; Grandjean & Landrigan, 2014; Lu *et al.*, 2018). Hierbei ist die Empfehlung, insgesamt das Verständnis von chemikalieninduzierten Verhaltensveränderungen zu verbessern. Verhaltensexperimente sollten so erstellt werden, dass sie Verallgemeinerungen hinsichtlich

Verhaltensänderungen zulassen und die ökologische Relevanz der aufgenommenen Endpunkte erfassen.

***Aussage 2: Das Verhalten ist mit grundlegenden ökologischen Prozessen verbunden (z.B. Populationsgesundheit und Fitness)***

Individualverhalten kann auf unterschiedliche Wege populationsrelevante Konsequenzen nach sich ziehen. Beispielsweise kann Paarungsverhalten direkten Einfluss auf die Qualität und Quantität des Nachwuchses haben, aber auch Verhaltensantworten auf Prädatoren können Auswirkungen auf eine erfolgreiche Flucht oder den Tod haben (Jennions & Petrie, 1997; Saaristo *et al.*, 2018; Sih, 1984). Im Umkehrschluss können diese Verhaltensweisen Einfluss auf die Populationsebene nehmen, wodurch sich beispielsweise Geburten-, Todes-, oder Migrationsraten ändern (Jennions & Petrie, 1997; Sih *et al.*, 1998). Durch die Komplexität von Populationsdynamiken können auch Verhaltensweisen einer Art negative Auswirkungen auf eine andere Art haben und dadurch Effekte auf Gemeinschafts- und Ökosystemebene hervorrufen (Hoover & Tylianakis, 2012; Sih, 2013; Wong & Candolin, 2014). Daraus lässt sich schließen, dass Verhalten direkte Auswirkungen auf Populationsebene und Fitness haben kann. Es wird empfohlen, neue und standardisierte Toxizitätstests zu entwickeln und bereits vorhandene anzupassen, um Verhaltensforschung in die behördliche Regulierung einbeziehen zu können. Die bereits vorhandenen Testsysteme können verwendet werden, um eine repräsentative, sensitive und zuverlässige Kombination aus Testorganismus und untersuchten Verhaltensendpunkt zu finden. Dabei ist es wichtig, Verhaltensendpunkte auszuwählen, die einen spezifischen Wirkmechanismus haben, um die Etablierung des Tests zu erleichtern und Referenzdaten zu erhalten (Legradi *et al.*, 2018).

***Aussage 3: Verhaltensdaten aus Laborversuchen können mit individuellen, Populations- und/oder Ökosystemprozessen im Freiland in Verbindung gebracht werden.***

Es gibt Belege, dass Ergebnisse aus Laborversuchen die Veränderung umweltrelevanter Verhaltensweisen im Freiland vorhersagen können, wie Aktivität (Boon *et al.*, 2008; Fisher *et al.*, 2015; Hellström *et al.*, 2016), Wagemut (Fisher *et al.*, 2015; Herborn *et al.*, 2010; Klaminder *et al.*, 2016), und Aggression (Boon *et al.*, 2008; Yuen *et al.*, 2016). Ergebnisse aus Verhaltensversuchen können somit mit grundlegenden Prozessen auf Populationsebene in Zusammenhang gebracht werden (Dingemanse *et al.*, 2004; Wong & Candolin, 2014). Da jedoch Ergebnisse aus Laborversuchen nicht immer mit Ergebnissen im Freiland zusammenhängen, wird empfohlen, einen integrativen Ansatz im Bereich der Umweltrisikobewertung zu entwickeln, der Verhaltensendpunkte miteinschließt. Dies bedeutet, dass standardisierte ökotoxikologische Tests mit Verhaltensendpunkten entwickelt werden müssen, und sowohl Ergebnisse aus Labor-, Mesokosmos- und Freilandstudien verwendet werden sollen, um realistische Entscheidungen fällen zu können.

***Aussage 4: Die Daten aus Verhaltensversuchen können umweltrelevant sein, werden aber selten in einem regulatorischen Kontext genutzt.***

Derzeit werden Daten aus Verhaltensversuchen meist mit geringer Relevanz eingeschätzt. In der EU sind nur sechs Beispiele vorhanden, in denen ökotoxikologische Verhaltensergebnisse in der Umweltrisikobewertung integriert sind (Ågerstrand *et al.*, 2020). Gründe hierfür können sein, dass Verhaltensforschung im Bereich Chemikalienregulation nicht genug beworben wird, dass nicht standardisierte Verfahren nicht in die Rahmenkonzepte aufgenommen werden dürfen, wobei Verhaltensexperimente oft nicht standardisiert sind, oder dass Verhaltensforschung nicht einheitlich als populationsrelevant angesehen wird (Ågerstrand *et al.*, 2020). Um dies zu verbessern, wird empfohlen, die Verlässlichkeit und Wiederholbarkeit von Verhaltensendpunkten zu optimieren. Dies kann mit der Validierung der Tests in unterschiedlichen Laboren durch Ringtests erreicht werden, um die Versuchsvariabilität zu verringern. Hierbei empfiehlt sich mit Substanzen zu beginnen, die eine große Datengrundlage haben. Zudem muss ein Berichtsstandard entwickelt werden, der besagt, welche Daten vorzulegen sind. Weiterhin können Computertechnologien, wie Künstliche Intelligenz dafür genutzt werden, die großen Mengen an Daten zu interpretieren. Unerlässlich ist auch das Verständnis des Modelorganismus, das Bewusstsein über die Limitierungen des experimentellen Designs und die Verbesserung der statistischen Herangehensweisen.

***Aussage 5: Für die Verwendung im regulatorischen Kontext sollten Verhaltensstudien Elemente standardisierter Studien umfassen.***

Häufig werden ökotoxikologische Verhaltensexperimente als nicht standardisierte Versuche von akademischen Wissenschaftlern durchgeführt (Ågerstrand *et al.*, 2020). Dies resultiert, aufgrund von fehlender chemischer Analytik, mit zu wenigen Replikaten oder fehlenden Informationen zur Nichtberücksichtigung im regulatorischen Kontext. Da Verhaltensexperimente oft nicht mit dem Ziel zur Verwendung in der Risikobewertung durchgeführt werden, sondern grundlegende Machbarkeitsbeweise anstreben, liegt hier die Diskrepanz, die mit einer effektiveren Kommunikation zwischen Behörden und Forschern behoben werden könnte (Ågerstrand *et al.*, 2020). Es wird empfohlen, Beratung und Training bezüglich der Auswertung und Aufzeichnung von Verhaltensstudien im regulatorischen Kontext anzubieten. In Moermond *et al.* (2016) sind bereits Empfehlungen für ökotoxikologische Studien bereitgestellt, welche für Verhaltensversuche angepasst und angewendet werden können.



***Aussage 6: Standardisierte ökotoxikologische Studien können Verhaltensendpunkte einbeziehen und quantifizieren.***

Im Großteil der OECD Testrichtlinien werden derzeit Mortalität, Wachstum oder Reproduktion als Endpunkte betrachtet. Zusätzlich wird in den meisten Richtlinien die Aufzeichnung von Verhaltensänderungen vorgegeben, jedoch sind keine Aussagen enthalten, welche Verhaltensänderungen als relevant angesehen werden. Allerdings gibt es auch Ausnahmen: In den Richtlinien für Versuche mit Fischen und Amphibien sind beispielsweise Verhaltensbeschreibungen implementiert, welche die Interpretation von Verhaltensänderungen erleichtern (OECD, 2009, 2019a). In vielen Testrichtlinien kann Verhalten zusätzlich hilfreich bei der Interpretation der Ergebnisse sein, weshalb in den meisten Testrichtlinien Verhaltensänderungen aufgenommen werden sollten. Jedoch wäre eine quantitative Erfassung von Verhaltensdaten für viele Testrichtlinien bezüglich der Optimierung des Testdesigns und als Marker für Tierwohl von Vorteil. Eine Empfehlung hierfür ist, die Forschung zu menschlichem Verhalten und Verhalten wildlebender Tiere besser in die Ökotoxikologie zu integrieren. Dies beruht darauf, dass viele Aspekte der Ökotoxikologie ihre Grundlagen in der Humantoxikologie und Medizin haben. Hierbei hilft es das Konzept der „One Health Initiative“ (OHITF, 2008) anzuwenden, und die Kommunikation zwischen verschiedenen Arbeitsbereichen, wie der Verhaltensökologie, der vergleichenden Physiologie, der Umweltchemie, der Toxikologie und der Ökotoxikologie zu verbessern

## 7 Synthese

### 7.1 Tabellarische Zusammenfassung

Tabelle 3: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aller Versuche, die in dieser Arbeit erfasst wurden. Rot hinterlegte Felder geben einen Effekt wieder, orange hinterlegte Felder deuten einen Trend an, grün hinterlegte Felder bilden „keinen Effekt“ ab und grau hinterlegte Felder zeigen, dass dieser Endpunkt nicht erfasst wurde. Pfeile bilden die Effektrichtung ab (↑ Erhöhung, ↓ Verringerung/Verschlechterung) und die angegebenen Konzentrationen geben den LOEC (lowest observed effect concentration) an.

Substanz		Citalopram			Venlafaxin		
Altersstadium Bachforellen		Larven	Larven	Juvenile	Larven	Larven	Juvenile
Temperatur		11 °C	7 °C	7 °C	11 °C	7 °C	7 °C
Endpunkte							
Gewicht		↓ 1000 µg/L	↓ 1000 µg/L	↓ 1000 µg/L	kein Effekt	↓ 10 µg/L	kein Effekt
Länge		↓ 1000 µg/L	↓ 1000 µg/L	↓ 1000 µg/L	↓ 100 µg/L	↓ 1000 µg/L	kein Effekt
Mortalität		kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt	Trend ↑ 1000 µg/L	kein Effekt
Schlupfrate		kein Effekt	kein Effekt	-	kein Effekt	kein Effekt	-
Herzschlagrate		kein Effekt	kein Effekt	-	kein Effekt	kein Effekt	-
Verhalten während des Versuchs (Aquarienposition)		↑ 1000 µg/L	↑ 1000 µg/L	↑ 1000 µg/L	↑ 1000 µg/L	↑ 100 µg/L	↑ 1000 µg/L
Verhalten unter Stress	zurückgelegte Distanz	↓ 1000 µg/L	↓ 100 µg/L	kein Effekt	↓ 10 µg/L	↓ 100 µg/L	↓ 1000 µg/L
	Geschwindigkeit über die Zeit	Trend ↓ 1000 µg/L	↓ 100 µg/L	kein Effekt	↓ 1000 µg/L	↓ 1000 µg/L	kein Effekt
	Zeit ohne Bewegungen	Trend ↓ 1000 µg/L	↓ 100 µg/L	kein Effekt	↓ 1000 µg/L	↓ 1000 µg/L	kein Effekt
B-Esterasen-Aktivität		kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt
Stressproteinlevel		-	-	kein Effekt	-	-	kein Effekt
Cortisolgehalt		-	-	kein Effekt	-	-	kein Effekt
Superoxiddismutase-Aktivität		-	-	-	kein Effekt	↑ 10 µg/L	kein Effekt
Histologie der Leber	Gewebezustand	↓ 1000 µg/L	↓ 100 µg/L	↓ 1000 µg/L	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt
	Glykogengehalt	↓ 1000 µg/L	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt

## 7.2 Beantwortung der übergeordneten Fragestellungen

- I. Beeinflussen die Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin das Verhalten von Bachforellen? Wie ändert sich das Verhalten in unterschiedlichen Expositionsszenarien? In welchen Konzentrationsbereichen treten Effekte auf?
- II. Wird die Mortalität und Entwicklung von Bachforellen durch die beiden Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin beeinflusst, und wenn ja, in welchen Konzentrationsbereichen?
- III. Resultiert die Exposition gegenüber Citalopram oder Venlafaxin in Veränderungen des Gewebezustands der Leber von Bachforellen? In welchen Konzentrationsbereichen treten Effekte auf?
- IV. Können die Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin Proteotoxizität, Neurotoxizität oder oxidativen Stress in Bachforellen auslösen? In welchem Konzentrationsbereich treten diese Effekte auf?
- V. Reagieren verschiedene Altersstadien der Bachforelle unterschiedlich auf die beiden Antidepressiva?
- VI. Beeinflusst die Temperatur die Wirkstärke der beiden Antidepressiva bei Bachforellen?
- VII. Unterscheiden sich die Effekte der beiden Antidepressiva in ihrer Qualität und/oder Quantität? Wenn ja, welche Unterschiede treten auf?

## 1. Effekte auf das Verhalten

Es konnte gezeigt werden, dass Citalopram und Venlafaxin starke Verhaltensänderungen bei Bachforellen auslösen können. Dies konnte sowohl während des Versuchs als auch in stressvoller Umgebung gezeigt werden. Die Verhaltensmessung während des Versuchs spiegelt Verhaltensweisen wie Geotaxis und Scototaxis wider, die auch mit anderen Versuchsdesigns, wie dem Novel Tank Test, dem Scototaxis Test oder dem Schwarmverhaltenstest untersucht werden können (Maximino *et al.*, 2010b; Maximino *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2012). Im Novel Tank Test wird das Schwimmverhalten eines Individuums in einem neuen Aquarium erfasst. Hierbei schwimmen naive, nicht exponierte Tiere zu Beginn zuerst in Richtung des Aquarienbodens und erforschen erst nach einer gewissen Zeit die obere Aquarienhälfte. Während des Versuchs können unterschiedliche Endpunkte, wie die Latenz zum Übertritt in die obere Aquarienhälfte, die Aufenthaltszeit im oberen Aquarienteil oder Anzahl an Übertritten in die obere Aquarienhälfte erfasst werden (Stewart *et al.*, 2012). Verringertes Angstverhalten der Tiere wird hierbei durch erhöhtes exploratives Verhalten und einer verringerten Geotaxis mit vermehrtem Aufenthalt nahe der Wasseroberfläche beschrieben (Maximino *et al.*, 2010a; Stewart *et al.*, 2012). Im Scototaxis Test ist ein Teil des Aquariums dunkel, der andere Teil hell und die Fische können den Aufenthaltsort frei wählen. Hierbei wird die Aufenthaltszeit der Tiere in den jeweiligen hellen bzw. dunklen Kompartimenten erfasst. Tiere, die einen Aufenthalt in der helleren, weißen Aquarienhälfte bevorzugen, werden als mutiger definiert (Maximino *et al.*, 2010b). Im Schwarmverhaltenstest wird die Distanz einzelner Tiere eines Schwarms zueinander erfasst. Hierbei haben mutigere Tiere eine höhere Tendenz sich weiter von ihren Artgenossen zu entfernen (Maximino *et al.*, 2010a; Stewart *et al.*, 2012).

All diese Faktoren spielen bei der Erfassung des Verhaltens während des Experiments zusammen, wodurch ein häufigerer Aufenthalt der Tiere in der oberen Aquarienhälfte als angstreduzierendes Verhalten gedeutet werden kann. Zusätzlich kann durch den häufigeren Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte auf eine höhere Schwimmaktivität der Tiere geschlossen werden. Jedoch kann hier keine individuenbasierte Aussage über das Verhalten getroffen werden, sondern nur pro Aquarium. Die gegenüber 1000 µg/L Citalopram oder Venlafaxin exponierten Bachforellen beider Altersstadien hielten sich während der Versuche deutlich häufiger in der oberen Aquarienhälfte auf als Tiere der Kontrollgruppe. Aufgrund des Aufenthalts an der Wasseroberfläche, der helleren Beleuchtung der oberen Aquarienhälfte im Vergleich zum schwarzen Aquarienboden und aufgrund des Entfernens von den am Boden verweilenden Artgenossen deutet dies auf angstreduziertes Verhalten der exponierten Tiere hin. Dieser Effekt war unabhängig vom Altersstadium und der Temperatur ersichtlich. Zusätzlich zeigten auch die gegenüber 100 µg/L Venlafaxin exponierten Bachforellenlarven nach 114 Tagen einen häufigeren Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte. Im

Versuch mit juvenilen Bachforellen und Venlafaxin war zudem eine Latenz von vier Tagen notwendig, um diesen Effekt ebenfalls zu sehen. Ähnlich hierzu sieht man auch beim Menschen eine Latenz bis zur Wirkungsentfaltung von Antidepressiva (Rupprecht *et al.*, 2004). Ähnliche Effekte konnten bereits für Citalopram und Venlafaxin bei Dreistachlichen Stichlingen, Adlerfischen, Endler Guppys und Zebrabärblingen gezeigt werden, wobei sich die Tiere im Novel Tank Test vermehrt in der oberen Aquarienhälfte aufhielten (Kellner *et al.*, 2016; Maulvault *et al.*, 2018; Olsén *et al.*, 2014; Porseryd *et al.*, 2017; Sackerman *et al.*, 2010) und das Angstverhalten im Scototaxis Test verringert war (Kellner *et al.*, 2017). Weitere Antidepressiva, wie Fluoxetin oder Amitriptylin führten ebenfalls bei Bachforellen, Koboldkärpflingen und Zebrabärblingen zu einem erhöhten Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte (Henry & Black, 2008; Meshalkina *et al.*, 2018; Schmiege *et al.*, 2020).

Das Verhalten der Tiere unter Stressbedingungen in der automatisierten Aufnahme-Apparatur zeigte, dass Bachforellenlarven, die gegenüber mindestens 100 µg/L Citalopram oder Venlafaxin exponiert waren, eine verringerte Schwimmaktivität aufwiesen als Tiere der Kontrollgruppe. Ebenso war die Aktivität der gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin exponierten juvenilen Bachforellen verringert. Lediglich im Versuch mit juvenilen Bachforellen und Citalopram zeigten sich keine Aktivitätsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Die reduzierte Aktivität spiegelte sich deutlich in einer verringerten Schwimmdistanz während der Aufnahmezeit wider. Zusätzlich zeichnete sich bei den Bachforellenlarven, die gegenüber Citalopram oder Venlafaxin exponiert waren, eine verringerte Geschwindigkeit über die Zeit sowie eine deutlich längere Zeit, in der sie sich nicht bewegten, ab. Betrachtet man das Verhalten über die Zeit wird ersichtlich, dass die Kontrolltiere, ebenso wie die exponierten Tiere, zu Beginn eine geringe Aktivität aufwiesen. Diese steigerte sich jedoch über die Zeit nur bei den Kontrolltieren. Zu Beginn stellt dies ein typisches Verhalten der Fische in Form von Angststarre dar, was sich mit der Zeit in Fluchtverhalten ändert. Da die exponierten Tiere keine Steigerung der Aktivität über die Zeit zeigten, ist einerseits möglich, dass sie in einer dauerhaften Angststarre verweilten. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass diese Tiere bereits von Beginn an angstreduzierter als die Kontrolltiere waren und daher auch über die Zeit kein erhöhtes Fluchtverhalten zeigten. Bezieht man zudem die Ergebnisse des Verhaltens während der Exposition mit ein, liegt der Schluss nahe, dass es durch Antidepressiva zu einer Verringerung der Aktivität und des Fluchtverhaltens der Tiere und somit des Angstverhaltens kommt. Für Citalopram, Venlafaxin und weitere Antidepressiva konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese die Aktivität von Fischen verringern (Demin *et al.*, 2017; Duarte *et al.*, 2019; Maulvault *et al.*, 2018; Meshalkina *et al.*, 2018; Saaristo *et al.*, 2019; Schmiege *et al.*, 2020; Sehonova *et al.*, 2019; Zindler *et al.*, 2019; Zindler *et al.*, 2020a). Zudem wiesen Martin *et al.* (2017) und Painter *et al.* (2009) eine Verringerung des Fluchtverhaltens von Dickkopfelritzen und Koboldkärpflingen durch Venlafaxin und das SSRI Fluoxetin nach.

Die oben beschriebenen Effekte auf das Schwimmverhalten traten sowohl bei juvenilen als auch larvalen Bachforellen auf, jedoch war die Effektstärke bei Bachforellenlarven erhöht. Dies kann unter anderem an der deutlich längeren Expositionszeit aber auch unterschiedliche Sensitivitäten der beiden Lebensstadien können nicht ausgeschlossen werden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass beide Antidepressiva, Citalopram und Venlafaxin, ihre angsthemmende Wirkung sowohl bei Bachforellenlarven als auch juvenilen Bachforellen entfalten können und dadurch starke Verhaltensveränderungen bei diesen Fischen hervorrufen. Diese und andere Verhaltensveränderungen können, wie in Kapitel IV erwähnt, populationsrelevante Veränderungen nach sich ziehen, wenn beispielsweise durch die Angsthemmung der Fische deren Scheu vor der offenen Wasserflächen und der Wasseroberfläche verringert wird, sodass das Prädationsrisiko steigt und dies zur Dezimierung der Population führen kann (Ågerstrand *et al.*, 2020; Saaristo *et al.*, 2018). Aufgrund dessen ist es wichtig, solche und ähnliche durch Chemikalienbelastung ausgelöste Verhaltensänderungen, insbesondere bei neuroaktiven Substanzen, in die Regulierung mit einfließen zu lassen.

## II. Effekte auf Mortalität und Entwicklung

Citalopram zeigte keine Effekte auf die Mortalität der exponierten Bachforellen. Dagegen war die Mortalität bei Bachforellenlarven, die gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin bei 7 °C exponiert waren, tendenziell erhöht. Ebenso war die Mortalität der Bachforellenlarven, die gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin bei 11 °C ( $28,89 \pm 3,14$  %) exponiert waren, höher als die der Kontrolltiere ( $20 \pm 7,2$  %). Allerdings war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Dennoch war zu sehen, dass die erhöhte Mortalität in einer kritischen Lebensphase, kurz nach Dottersackaufzehrung, auftrat (Klemetsen *et al.*, 2003). Dieser bereits vorhandene Stress der Larven in dieser kritischen Lebensphase könnte dazu geführt haben, dass eine Venlafaxinexposition als zusätzlicher Stressor in einer erhöhten Mortalität resultierte. Zudem zeigten die Tiere, die gegenüber 1000 µg/L exponiert waren, während des Versuchs eine verringerte Nahrungsaufnahme als die Tiere der anderen Expositionsgruppen und der Kontrolle. Bei den gegenüber Venlafaxin exponierten juvenilen Bachforellen trat bezüglich der Mortalität kein Unterschied zu den Kontrolltieren auf. Geißbrassenlarven (*Diplodus sargus*), die gegenüber 100 µg/L Venlafaxin exponiert waren, wiesen ebenfalls eine verringerte Überlebensrate auf (Rodrigues *et al.*, 2019). Ebenso konnte eine erhöhte Mortalität bei Dickkopfritzen nach 305 ng/L Venlafaxinexposition gezeigt werden (Schultz *et al.*, 2011).

Die Entwicklungsparameter Schlupf- und Herzschlagrate wurden durch die beiden Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin nicht beeinflusst. Auch Studien mit Zebraabärlingen, Dickkopfritzen oder tropischen Krallenfröschen (*Xenopus tropicalis*) konnten keinen Einfluss verschiedener Antidepressiva, u.a. Citalopram und Venlafaxin, auf Entwicklungsparameter feststellen (Bachour *et al.*, 2020; Parrott & Metcalfe, 2019; Sehonova *et al.*, 2019; Thompson & Vijayan, 2020)

Jedoch beeinflusste Citalopram ab einer Konzentration von 1000 µg/L das Wachstum sowohl von Bachforellenlarven als auch juvenilen Bachforellen sehr deutlich. Venlafaxin hingegen zeigte eine Verringerung des Gewichts nur bei Bachforellenlarven die gegenüber 1000 µg/L bei bei 7 °C exponiert waren. Eine verringerte Länge konnte mit einer LOEC von 10 µg/L bei Bachforellenlarven beider Temperaturexpositionen nachgewiesen werden. Jedoch wurde das Wachstum der juvenilen Bachforellen durch eine Exposition gegenüber Venlafaxin nicht beeinträchtigt. Zudem konnte während der Versuche beobachtet werden, dass die gegenüber 1000 µg/L Citalopram oder Venlafaxin exponierten Tiere weniger Nahrung aufnahmen als die Fische der übrigen Expositionsgruppen. Eine Verringerung der Nahrungsaufnahme durch diese und andere Antidepressiva bei teilweise deutlich geringeren Konzentrationen von u.a. 0,15 µg/L wurde bereits für andere Fischarten gezeigt (Bisesi *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2019; Gaworecki & Klaine, 2008; Hedgspeth *et al.*, 2014; Kellner *et al.*, 2015; Mennigen *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2015). Die verringerte

Nahrungsaufnahme und der vermehrte Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte und der damit einhergehende höhere Energieaufwand zum Schwimmen sind Faktoren, die das Wachstum der Fische negativ beeinflussten. Die Abnahme des Gewichts konnte bereits für das Antidepressivum Fluoxetin bei Goldfischen (Mennigen *et al.*, 2010) und eine verringerte Körperlänge für die Antidepressiva Fluoxetin, Mianserin und Amitriptylin bei Zebrabärblingen nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014). Weiterhin sind auch beim Menschen verminderter Appetit sowie Gewichtsverlust häufige Nebenwirkungen von Citalopram und Venlafaxin (Hexal AG, 2019a, b).

Es ist abschließend zu sagen, dass sowohl Citalopram als auch Venlafaxin das Wachstum von Bachforellen verringern können. Zusätzlich kann Venlafaxin in Kombination mit anderen Stressfaktoren zu erhöhter Mortalität führen. Diese Faktoren können in der Umwelt populationsrelevante Veränderungen nach sich ziehen. Eine verringerte Größe kann dazu führen, dass kleinere Tiere eher zur Beute von Prädatoren werden als größere (Cowder *et al.*, 1992). Zudem hängt bei weiblichen Fischen die Fekundität von der Größe und dem Gewicht ab (Koops *et al.*, 2004).



### III. Effekte auf die Leberintegrität

Bezüglich des Gewebeszustands der Leber zeigte Citalopram Effekte auf sowohl den Gesundheitszustand sowie den Glykogengehalt der Lebern der Bachforellen unabhängig von Altersstadium und Hälterungstemperatur. Tiere, die gegenüber 1000 µg/L Citalopram exponiert waren, zeigten in der Leber vermehrt Entzündungen, Vakuolisierungen sowie Hyperplasie von Hepatozyten. Ein Grund für diese Schadbilder könnte sein, dass der Lebermetabolismus aufgrund des Abbaus von Citalopram durch Cytochrome erhöht ist (Ahmadian *et al.*, 2017). Dies wird durch die besonders hohen Gewebekonzentrationen im Muskel gestützt, die zu erwarten lassen, dass in der Leber noch höhere Citalopramkonzentrationen nachweisbar gewesen wären (Grabicova *et al.*, 2017). Dies führt somit zu einer höheren metabolische Abbaurate von Citalopram. Zudem wird Venlafaxin mit einer Halbwertszeit von 4 h deutlich besser abgebaut als Citalopram mit einer Halbwertszeit von 30 h, was den Unterschied zwischen den Antidepressivas erklären könnte (Holliday & Benfield, 1995; Noble & Benfield, 1997). Ähnliche histopathologische Reaktionen in der Leber, die in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden, sind auch für Ratten, die gegenüber Citalopram bzw. Fluoxetin exponiert waren, beschrieben (Ahmadian *et al.*, 2017; Mohammadi *et al.*, 2013; Zlatković *et al.*, 2014). Zusätzlich konnten Leberschäden auch bei Menschen nach Citalopramgabe in Fallstudien nachgewiesen werden (Hunfeld *et al.*, 2010; Neumann *et al.*, 2008).

Weiterhin war der Glykogengehalt in der Leber der Tiere der höchsten Expositionsgruppe im Vergleich zur Kontrolle verringert. Dieser Unterschied war jedoch nur bei den Bachforellenlarven, die bei 7 °C exponiert waren, signifikant. Dies kann mit der geringeren Nahrungsaufnahme dieser Tiere zusammenhängen, da weniger Speicherstoffe in der Leber eingelagert werden können (Driedzic & Short, 2007; Vijayan & Moon, 1992). Zudem könnten bereits vorhandene Energiereserven für wahrscheinlich erhöhte Biotransformationsprozesse eingesetzt worden sein.

Venlafaxin beeinträchtigte weder bei Bachforellenlarven noch bei juvenilen Bachforellen die Integrität oder den Glykogengehalt der Leber. Hierbei sind die Venlafaxin-Gewebekonzentrationen im Muskel ebenfalls von Bedeutung, da sie im Vergleich zu den Gewebekonzentrationen der gegenüber Citalopram exponierten Tiere deutlich niedriger ausfielen, sodass auch davon ausgegangen werden kann, dass die Venlafaxinkonzentrationen in der Leber deutlich geringer waren als bei den gegenüber Citalopram exponierten Fischen. Zudem spielt, wie bereits erwähnt, die deutlich bessere Abbaubarkeit von Venlafaxin hier ebenfalls eine Rolle (Holliday & Benfield, 1995; Noble & Benfield, 1997). Ebenso konnte von Schultz *et al.* (2011) kein Effekt von Venlafaxin auf die Leber von Dickkopfelritzen nachgewiesen werden.

Allgemein war jedoch der Gesundheitszustand der Bachforellenlarven, die bei 11 °C exponiert waren, schlechter als derjenige der bei 7 °C exponierten Fischlarven. Dies könnte unter anderem mit einem erhöhten Metabolismus der Tiere bei 11 °C zusammenhängen.

Es konnte gezeigt werden dass Citalopram ab einer Konzentration von 100 µg/L negative Effekte auf die Integrität und den Glykogengehalt der Leber hat. Venlafaxin dagegen hatte keinen Einfluss auf die Leber der Bachforellen. Es kann abschließend gesagt werden, dass eine Schädigung des Lebergewebes u.a. Stoffwechselprobleme und Probleme bei der Entgiftung von Schadstoffen nach sich ziehen kann. Zudem kann ein verringerter Glykogengehalt und somit geringere Energiereserven einen negativen Einfluss auf den Umgang der Fische mit anderen Stressoren, wie Krankheiten oder Parasiten haben (Schwaiger, 2001). Hierdurch könnten ganze Populationen anfälliger für Prädatoren, Krankheiten und Parasiten sein oder ihr Fortpflanzungserfolg könnte negativ beeinflusst werden.

#### IV. Effekte auf biochemische Biomarker

Es zeigte sich, dass Bachforellenlarven, die bei 7 °C gegenüber 10 µg/L oder höheren Konzentrationen an Venlafaxin exponiert waren, eine höhere Superoxiddismutase-Aktivität aufwiesen als die Kontrolltiere. Dieser Unterschied war bei Tieren, die gegenüber 10 und 100 µg/L exponiert waren, signifikant, bei Fischen, die gegenüber 1000 µg/L exponiert waren, war nur ein Trend diesbezüglich zu beobachten. Bachforellenlarven, die bei 11 °C gegenüber Venlafaxin exponiert waren, zeigten diese Erhöhung der SOD-Aktivität nicht. Allerdings war deutlich zu erkennen, dass die SOD-Aktivität in allen Expositionsgruppen bei 11 °C, ähnlich hoch war wie von Larven nach Venlafaxinexposition bei 7 °C. Dies deutet darauf hin, dass diese Tiere aufgrund der Temperatur-bedingten Metabolismussteigerung generell einen höheren oxidativen Stresslevel aufwiesen als die bei 7 °C exponierten Tiere, sodass mögliche Effekte der Antidepressiva maskiert sein könnten.

Ähnlich wie bei den bei 7 °C exponierten Bachforellenlarven wiesen die juvenilen Bachforellen, die gegenüber Venlafaxin exponiert waren, eine bis zu 22 % höhere SOD-Aktivität als die Kontrolltiere auf, wobei der Unterschied auch hier aufgrund hoher Variabilität nicht signifikant war. Ein oxidatives Potential von Antidepressiva wurde auch in anderen Studien bestätigt. (u.a. Ahmadian *et al.*, 2016; Valavanidis *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014). So führte z.B. die Exposition gegenüber den Antidepressiva Amitriptylin, Sertralin und Venlafaxin zu einer Erhöhung der SOD-Aktivität bei verschiedenen Fischarten und Daphnien (Xie *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014). Auch bei Ratten und in Rattenhepatozyten resultierte die Exposition gegenüber den Antidepressiva Citalopram, Fluoxetin und Venlafaxin in einer Erhöhung des oxidativen Stressniveaus (Ahmadian *et al.*, 2016; Ahmadian *et al.*, 2017; Zlatković *et al.*, 2014). Um die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate zu stützen, wären weitere Analysen von Biomarkern für oxidativen Stress, wie die Aktivierung der Katalaseaktivität oder die Induktion der Lipidperoxidation sinnvoll.

Bezüglich der Aktivität der B-Esterasen, Acetylcholinesterase sowie den beiden Carboxylesterasen mit Nitrophenylvalerat bzw. Nitrophenylacetat als Substrat konnten in allen Versuchen mit Bachforellenlarven und juvenilen Tieren keinerlei Unterschiede zwischen den gegenüber beiden Antidepressiva exponierten Tiere und den Kontrolltieren nachgewiesen werden. Allerdings konnten in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Antidepressiva sowohl eine Verringerung als auch eine Erhöhung der Acetylcholinesterase-Aktivität von Muscheln, Daphnien und Fischen gezeigt werden (Duarte *et al.*, 2019; Munari *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017).

Ähnlich zu den Ergebnissen der B-Esterasen, konnte kein Unterschied bezüglich des Hsp70-Levels der exponierten juvenilen Bachforellen und der Kontrolltiere gezeigt werden. Dennoch konnte Maulvault *et al.* (2019) eine erhöhte Hitzeschock-Antwort von gegenüber Venlafaxin exponierten Adlerfischen nachweisen. Da das Hsp70-Level aber einen relativ unspezifischen Biomarker darstellt, können die

unterschiedlichen Ergebnisse auf den verschiedenen Expositionsbedingungen oder artspezifischen Unterschieden beruhen.

Der Cortisolgehalt im Gewebe der gegenüber Citalopram bzw. Venlafaxin exponierten juvenilen Bachforellen unterschied sich zu dem der Kontrolltiere nicht signifikant. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Fische, deren Schwimmverhalten in der automatisierten Aufnahme-Apparatur unter stressvollen Bedingungen aufgezeichnet wurde, einen höheren Gewebecortisolgehalt aufwiesen als die Tiere, deren Verhalten nicht aufgezeichnet wurde. Dies zeigt wiederum, dass die Aufnahme-Apparatur den Erwartungen einer stressvollen Umgebung der Tiere entsprach. Keysomi *et al.* (2013) konnten eine Verringerung des Plasmacortisollevels von Regenbogenforellen, die gegenüber Citalopram exponiert waren, zeigen. Jedoch ist hierbei zu beachten, dass in diesem Versuch Plasmakonzentrationen gemessen wurden, im Fall der exponierten juvenilen Bachforellen der vorliegenden Arbeit jedoch die Konzentrationen im Muskel- und Nierengewebe der Fische analysiert wurden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass weder Citalopram noch Venlafaxin negative Auswirkungen auf das Hsp70-Level, die B-Esterasen-Aktivität oder auf die Cortisolkonzentration im Gewebe von Bachforellen hatten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Citalopram und Venlafaxin in den hier verwendeten Konzentrationen nicht neuro- oder proteotoxisch auf Bachforellen wirken. Jedoch wurde gezeigt, dass Venlafaxin eine Erhöhung der SOD-Aktivität und somit oxidativen Stress in Bachforellen auslösen kann.

## V. Vergleich der Lebensstadien

Der Vergleich der nachgewiesenen Stoffkonzentrationen im Gewebe der Fische lässt erkennen, dass Bachforellenlarven deutlich weniger Citalopram im Muskel akkumulieren als juvenile Fische. Dies könnte unter anderem mit der Entwicklung der Tiere zusammenhängen, da der Gastrointestinaltrakt sowie die Kiemen der Bachforellenlarven noch nicht vollständig ausgebildet sind (Wells & Pinder, 1996) und Citalopram somit nicht so effektiv aufgenommen werden kann wie bei juvenilen Fischen. Venlafaxin dagegen zeigte zwischen den Gewebekonzentrationen der larvalen und juvenilen Stadien nur geringe Unterschiede. Es ist möglich, dass sich die Venlafaxingewebekonzentrationen auf einem Level einpendeln, das sowohl bei den larvalen als auch den juvenilen Tieren erreicht wurde (Meador *et al.*, 2017).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass nicht alle Effekte, die bei Bachforellenlarven auftraten, auch bei juvenilen Bachforellen zu finden waren. Die Effekte auf das Wachstum der Tiere waren bei einer Exposition gegenüber Citalopram vergleichbar zwischen beiden Altersstadien. Juvenile und larvale Fische, die gegenüber 1000 µg/L Citalopram exponiert wurden, waren signifikant kleiner und leichter als die Kontrolltiere. Jedoch traten bei Venlafaxin die Effekte auf das Wachstum nur bei Bachforellenlarven auf. Ebenso zeigte sich ein Trend zu erhöhter Mortalität nur bei einer Exposition von Bachforellenlarven gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin.

Die Position der Fische im Aquarium und somit das Schwimmverhalten während des Citalopramversuchs unterschied sich zwischen Bachforellenlarven und juvenilen Bachforellen nur geringfügig. Lediglich die Effektstärke überwog bei den exponierten Bachforellenlarven. In den Venlafaxinversuchen zeigten sich Verhaltensänderungen bei Bachforellenlarven bereits ab einer Konzentration von 100 µg/L wohingegen die juvenile Tiere erst ab 1000 µg/L Venlafaxin, einen vermehrten Aufenthalt in der oberen Aquarienhälfte aufwiesen.

Bezüglich des Schwimmverhaltens unter Stressbedingungen wiesen nur Bachforellenlarven, die gegenüber Citalopram exponiert waren, eine verringerte Aktivität ab 100 µg/L Citalopram auf, juvenile Bachforellen nicht. Für Venlafaxin zeigten Bachforellenlarven ab 10 µg/L eine geringere zurückgelegte Gesamtdistanz während der Aufnahmezeit, wohingegen juvenile Bachforellen dieses Verhalten erst ab 1000 µg/L Venlafaxin zeigten. Zudem war die mittlere Geschwindigkeit über die Zeit sowie die Zeit, in der sich die Tiere nicht bewegten, nur bei Bachforellenlarven signifikant unterschiedlich.

Eine erhöhte SOD-Aktivität konnte nur bei Bachforellenlarven, die gegenüber mindestens 10 µg/L Venlafaxin bei 7 °C exponiert waren, nachgewiesen werden. Jedoch zeigten die juvenilen Bachforellen der Venlafaxin-Expositionsgruppen ebenfalls erhöhte SOD-Aktivitäten, welche jedoch nicht statistisch signifikant war.

Die histologischen Auswertungen der Lebern ergaben, dass sowohl juvenile Bachforellen als auch Bachforellenlarven, die gegenüber Citalopram exponiert waren, einen schlechteren Gewebezustand der Leber aufwiesen als die Kontrolltiere. Bei Bachforellenlarven trat dieser Effekt bereits bei 100 µg/L Citalopram auf, bei juvenilen Bachforellen erst ab einer Konzentration von 1000 µg/L Citalopram. Ebenso war der Glykogengehalt der Bachforellen verringert, die gegenüber 1000 µg/L Citalopram exponiert waren, jedoch war dieser Unterschied nur bei Bachforellenlarven bei 11 °C zur Kontrolle signifikant unterschiedlich. Venlafaxin zeigte wiederum keine Effekte auf die Leberintegrität von Bachforellenlarven und juvenilen Fischen.

Die Effekte waren generell bei Bachforellenlarven stärker ausgeprägt als bei juvenilen Bachforellen. Zusätzlich war in einigen Fällen zu erkennen, dass Bachforellenlarven, die bei 7 °C exponiert waren, stärkere Effekte aufwiesen als Bachforellenlarven bei 11 °C. Verhaltenseffekte konnten bei den Larven bei niedrigeren Konzentrationen (Citalopram: ab 100 µg/L, Venlafaxin: ab 10 µg/L) nachgewiesen werden als bei den juvenilen Fischen (Citalopram und Venlafaxin: 1000 µg/L). Ebenso zeigten Venlafaxin Effekte auf das Wachstum sowie die SOD-Aktivität bei Larven ab 10 µg/L, diese konnten jedoch bei juvenilen Fischen nicht nachgewiesen werden. Ähnlich hierzu konnten in Bachforellenlarven bereits ab 100 µg/L Citalopram adverse Effekte in der Leber nachgewiesen werden, bei Juvenilen Fischen erst ab 1000 µg/L. Eine wichtige Erklärung ist, dass die Bachforellenlarven deutlich länger gegenüber den jeweiligen Substanzen exponiert waren als die juvenilen Tiere. Zudem waren die Bachforellenlarven bei 7 °C länger exponiert als die bei 11 °C. Die Expositionszeit der Larven bei 7 °C betrug im Versuch mit Citalopram bzw. Venlafaxin 135 bzw. 128 Tage, die der Bachforellenlarven bei 11 °C jeweils 28 bzw. 23 Tage weniger. Die juvenilen Bachforellen wurden dagegen nur 28 Tage gegenüber Citalopram und 24 Tage gegenüber Venlafaxin exponiert. Diese unterschiedlich langen Expositionszeiten könnten unter anderem zu den stärkeren Effekten bei Bachforellenlarven insgesamt sowie speziell bei 7 °C geführt haben. Zusätzlich können unterschiedliche Sensitivitäten der beiden Altersstadien nicht ausgeschlossen werden. Allgemein wird angenommen, dass jüngere Lebensstadien sensitiver auf Schadstoffe reagieren, jedoch kann dies hier aufgrund unterschiedlich langer Expositionszeiten nicht abschließend geklärt werden (Mohammed, 2013; Subathra & Karuppasamy, 2007). Schwarz *et al.* (2017) zeigte bereits, dass Bachforellenlarven und juvenile Bachforellen unterschiedlich sensitiv auf eine Exposition gegenüber Diclofenac reagieren. Unterschiede zwischen den Bachforellenlarven bei 7 °C und bei 11 °C können

ebenfalls, wie zuvor erläutert, aufgrund unterschiedlich langer Exposition aufgetreten sein. Jedoch kann auch eine höhere Temperatur und infolgedessen ein erhöhter Metabolismus der Tiere bei 11 °C Auswirkungen auf die Effekte gehabt haben (Cairns *et al.*, 1975a; Maulvault *et al.*, 2018; Mehdi *et al.*, 2019).

Abschließend kann gesagt werden, dass die beobachteten Effekte bei Bachforellenlarven stärker waren als bei juvenilen Tieren. Jedoch können diese Unterschiede nicht abschließend auf einen einzelnen Faktor zurückgeführt werden.

## VI. Vergleich der Temperaturen

In den Versuchen mit Citalopram konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Temperatur und einem verringerten Wachstum der Tiere nachgewiesen werden. In den Versuchen mit Venlafaxin dagegen zeigte sich, dass die Tiere, die gegenüber 7 °C exponiert waren, ein verringertes Gewicht ab 10 µg/L Venlafaxin aufwiesen. Da jedoch die Expositionszeit der Tiere, die gegenüber 7 °C exponiert waren, länger war, kann dieser Effekt nicht auf einen einzelnen Faktor zurückgeführt werden. Weiterhin war bei den Bachforellenlarven, die gegenüber 1000 µg/L Venlafaxin bei 7 °C exponiert waren, eine tendenziell erhöhte Mortalität zu sehen. Allerdings war die Gesamtmortalität aller Versuchsgruppen bei den gegenüber 11 °C exponierten Bachforellen im Vergleich zu den bei 7 °C exponierten Tieren deutlich erhöht. Diese verstärkte Mortalität setzte in beiden Versuchen kurz nach der Dottersackaufzehrung ein, welche eine kritische Lebensphase für Salmoniden darstellt (Klemetsen *et al.*, 2003). Hierbei könnte eine erhöhte Mortalität durch Venlafaxin bei 11 °C durch die hohe Gesamtmortalität maskiert worden sein. Aufgrund dessen kann hier der Unterschied zwischen den Temperaturen auch nicht auf einen einzelnen Faktor, wie die Temperatur, zurückgeführt werden.

Verhaltensänderungen während der Exposition waren im Versuch mit Citloopram bei beiden Temperaturen vergleichbar, jedoch zeigte sich im Versuch mit Venlafaxin ein häufigerer Aufenthalt der Tiere im oberen Teil des Aquariums bereits bei 100 µg/L, wohingegen dieser Effekt bei 11 °C erst ab einer Konzentration von 1000 µg/L auftrat. In die gleiche Richtung weisen die Effekte des Verhaltens unter Stressbedingungen bei den bei 7 °C exponierten Tieren, die in niedrigeren Konzentrationen nachzuweisen waren als bei den bei 11 °C exponierten Tieren. Als Gründe hierfür sind sowohl die deutlich längere Expositionszeit der Tiere bei 7 °C als auch der Einfluss der Temperatur selbst als Stressor zu nennen. Zudem waren die Tiere der höheren Temperatur zum gleichen Zeitpunkt bereits weiter entwickelt (Killeen *et al.*, 1999a; Killeen *et al.*, 1999b; Wells & Pinder, 1996), wodurch eine unterschiedliche Sensitivität unterschiedlicher Altersstadien nicht ausgeschlossen werden kann. Jedoch können die genannten Faktoren nachträglich nicht voneinander getrennt werden, weshalb die Temperatur nicht als einzelner Faktor angesehen werden kann.

Bezüglich der SOD-Aktivität waren signifikante Unterschiede zwischen den Testgruppen nur bei 7 °C ab 10 µg/L Venlafaxin zu beobachten. Die bei 11 °C exponierten Tiere dagegen wiesen eine sehr viel höhere SOD-Aktivität in allen Expositionsgruppen auf als die bei 7 °C exponierten Fische. Die erhöhte SOD-Aktivität der bei 11 °C exponierten Tiere kann durch den höheren Metabolismus der Tiere hervorgerufen worden sein und einen Effekt durch das Antidepressivum Venlafaxin maskiert haben. Jedoch kann eine unterschiedliche Sensitivität der Tiere aufgrund ihres unterschiedlichen Entwicklungsstadiums und der unterschiedlich langen Expositionszeit als Faktoren nicht ausgeschlossen und nicht von der Temperatur getrennt betrachtet werden. In einem Experiment mit



Adlerfischen konnte eine Erhöhung des oxidativen Stresses und der SOD-Aktivität durch Venlafaxin nach Temperaturerhöhung und pH-Ansäuerung gezeigt werden (Maulvault *et al.*, 2019).

Die Auswertung des Gewebezustands der Leber ergab, dass Bachforellenlarven die gegenüber 100 µg/L bei 7 °C exponiert waren, einen schlechteren Zustand aufwiesen, wohingegen bei den bei 11 °C exponierten Tieren dieser Effekt erst ab 1000 µg/L signifikant war. Zusätzlich war zu erkennen, dass Bachforellenlarven, die gegenüber 11 °C exponiert waren, allgemein einen schlechteren Gesundheitszustand der Leber aufwiesen als die Bachforellenlarven bei 7 °C. Weiterhin war bei den gegenüber 1000 µg/L Citalopram bei 11 °C exponierten Bachforellenlarven der Glykogengehalt im Vergleich zu den Kontrolltieren verringert. Aufgrund der höheren Temperatur und des daraus folgenden höheren Metabolismus kann der verringerte Glykogengehalt durch das Antidepressivum bei 11 °C stärker zum Tragen gekommen sein. Jedoch können hier ebenfalls die längere Expositionszeit der Tiere als auch die Entwicklung der Tiere und die Temperatur nicht voneinander getrennt werden.

In der vorliegenden Studie kann die Temperatur nicht direkt als Stressor angesehen werden, da beide Temperaturen im Optimalbereich für das Wachstum von Bachforellen liegen (Ojanguren & Braña, 2003). Jedoch kann eine erhöhte Temperatur aufgrund des gesteigerten Metabolismus eine erhöhte Toxizität von Chemikalien nach sich ziehen (Cairns *et al.*, 1975a, b; Hallare *et al.*, 2005; Maulvault *et al.*, 2019). In den Versuchen mit Bachforellenlarven kann die Temperatur allerdings nicht als alleiniger Faktor bewertet werden, da sich zum einen, aufgrund unterschiedlich schneller Entwicklung infolge unterschiedlicher Temperaturen, die Tiere zum Zeitpunkt der Probenahme unterschieden (Killeen *et al.*, 1999a; Killeen *et al.*, 1999b). Zum anderen waren die Tiere, die bei 7 °C exponiert waren, 28 bzw. 23 Tage länger exponiert als die Larven bei 11 °C, was einen Vergleich der Temperatur erschwert. Abschließend kann gesagt werden, dass die Bachforellenlarven die bei 7 °C exponiert wurden, meist stärker ausgeprägte Effekte zeigten als diejenigen die bei 11 °C exponiert wurden. Allerdings konnte kein klarer Effekt der Temperatur auf die Wirkweise und Toxizität der Antidepressiva nachgewiesen werden, da diese nicht von den anderen Faktoren getrennt betrachtet werden kann.

## VII. Vergleich der Antidepressiva

**Im Muskelgewebe akkumulierte Citalopram stärker als Venlafaxin.** Betrachtet man die Gewebekonzentrationen der beiden Substanzen, ist zu erkennen, dass deutlich höhere Citalopram-Konzentrationen im Muskel der exponierten Tiere nachgewiesen werden konnten als Venlafaxin-Konzentrationen. Citalopram akkumulierte zudem deutlich weniger in der Muskulatur von Larven als in der von juvenilen Fische, was, wie zuvor bereits diskutiert, möglicherweise mit der altertbedingten geringen Aufnahmefähigkeit der Organe der Tiere zusammenhängen kann (Wells & Pinder, 1996). Im Vergleich dazu zeigten sich bei den gegenüber Venlafaxin exponierten Fischen nur geringe Unterschiede zwischen den Gewebekonzentrationen der deutlich länger exponierten Bachforellenlarven und juvenilen Bachforellen. Hierbei ist es möglich, dass sich die Venlafaxin-Gewebekonzentrationen auf einem Level einpendeln welches bei Venlafaxin deutlich früher erreicht wird und geringer ist als bei Citalopram, da Venlafaxin mit 4 h eine kürzere Halbwertszeit im Körper aufweist als Citalopram und somit die Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustands bei Venlafaxin kürzer ist (Holliday & Benfield, 1995; Meador *et al.*, 2017; Noble & Benfield, 1997). Zudem ist es möglich, dass Venlafaxin schlechter als Citalopram aufgenommen wird. Dies beruht auf den inhärenten Eigenschaften der Substanzen, vorrangig des logP Wertes, sodass Citalopram mit einem höheren logP von 3,76 besser in Gewebe aufgenommen werden kann als Venlafaxin mit einem logP von 2,74 (DrugBank, 2020). Weiterhin spielt der pH-Wert, der in allen Versuchen vergleichbar war, eine Rolle, da sowohl Citalopram als auch Venlafaxin aufgrund ihres  $pK_a$  Wertes im basischen pH-Bereich neutral vorliegen (DrugBank, 2020; Karlsson *et al.*, 2017). Da Citalopram jedoch bei allen pH-Werten einen höheren logD als Venlafaxin aufweist, kann es dadurch leichter Zellmembranen passieren als Venlafaxin und ebenso stärker im Gewebe akkumulieren (ChemAxon, 2020; Karlsson *et al.*, 2017; Sundaram *et al.*, 2015). Ähnlich hierzu konnten Grabicova *et al.* (2017) in Bachforellen höhere Citalopram- als Venlafaxingewebekonzentrationen sowie deutlich höhere Biokonzentrationsfaktoren für Citalopram im Vergleich zu Venlafaxin nachweisen. Und auch David *et al.* (2018) errechneten einen höheren Biokonzentrationsfaktor für Citalopram im Gegensatz zu Venlafaxin. In einer Studie mit Zebrafärbungsembryonen konnte ähnlich hierzu eine höhere Bioakkumulation des Antidepressivums Fluoxetin, welches einen höheren logP von 4,05 und einen höheren  $pK_a$  Wert als Citalopram und Venlafaxine aufweist, nachgewiesen werden (Zindler *et al.*, 2020b).

Vergleicht man die Effekte der beiden Antidepressiva miteinander, ist zu erkennen, dass die meisten Effekte sowohl bei den gegenüber Citalopram als auch den gegenüber Venlafaxin exponierten Bachforellen auftraten, jedoch zeigten sich unterschiedlich starke Ausprägungen der Effekte.

**Venlafaxin führt zu einer tendentiell erhöhten Mortalität.** Gegenüber der höchsten Konzentration Venlafaxin exponierte Bachforellenlarven wiesen eine tendentiell erhöhte Mortalität auf. Im Gegensatz dazu konnte weder bei den Bachforellenlarven noch den juvenilen Bachforellen die gegenüber Citalopram exponiert waren eine erhöhte Mortalität festgestellt werden. Eine erhöhte Mortalität durch Venlafaxin konnte bereits in Versuchen mit Dickkopfritzen und Geißbrassen nachgewiesen werden (Rodrigues *et al.*, 2019; Schultz *et al.*, 2011).

**Das Wachstum wurde von beiden Antidepressiva negativ beeinflusst.** Dabei zeigte die höchste Konzentration Citalopram sowohl bei Bachforellenlarven als auch juvenile Bachforellen eine Verringerung des Gewichts und der Länge (LOEC: 1000 µg/L), wohingegen Venlafaxin nur bei Bachforellenlarven zu einer Verringerung der Länge (LOEC: 100 µg/L) und des Gewichts (LOEC: 10 µg/L) führte. In allen Versuchen war ersichtlich, jedoch nicht quantifizierbar, dass die Tiere, die gegenüber der höchsten Konzentration beider Antidepressiva exponiert waren, weniger Nahrung aufnahmen als die Tiere der anderen Expositionsgruppen. Diese Beobachtung wird durch verschiedene Studien unterstützt, die ein reduziertes Fraßverhalten gegenüber Citalopram oder Venlafaxin exponierter Tiere zeigten (Bisesi *et al.*, 2014; Kellner *et al.*, 2015). Weiterhin weisen beide Antidepressiva als häufige Nebenwirkung verminderten Appetit und Appetitlosigkeit auf (ratiopharm GmbH, 2019a, b). Bei der pharmazeutischen Verwendung durch den Menschen wird die Gewichtsabnahme bei Citalopram zudem als häufige, bei Venlafaxin als gelegentliche Nebenwirkung gelistet (Aristo Pharma GmbH, 2012, 2019). Ein Grund für diese Diskrepanz könnte die unterschiedliche Wirkkonzentration sein. Venlafaxin hat eine deutlich höhere definierte tägliche Dosis von 100 µg/L im Gegensatz zu Citalopram von 20 µg/L, was bedeutet, dass Citalopram bereits bei niedrigeren Konzentrationen wirksam ist (WHO, 2019). Zusätzlich hat Venlafaxin eine deutlich kürzere Halbwertszeit im Körper als Citalopram (Holliday & Benfield, 1995; Noble & Benfield, 1997).

**Das Schwimmverhalten während der Versuche wurde von beiden Antidepressiva beeinflusst.** Es zeigte sich, dass Venlafaxin das Schwimmverhalten während der Exposition bereits ab 100 µg/L beeinflusst, wohingegen dieser Effekt erst ab 1000 µg/L Citalopram auftrat. Da die Aufzeichnungen während des Versuchs mit Bachforellenlarven und Citalopram jedoch deutlich weniger Tage umfassten, lassen sich die Ergebnisse schwer vergleichen, da im Versuch mit Citalopram keine ebenso detaillierte Auflösung des Verhaltens wie im Versuch mit Bachforellenlarven und Venlafaxin gegeben ist. Auch die Ergebnisse anderer Studien zeigen, dass beide Antidepressiva das Verhalten

von Fischen im Novel Tank Test vergleichbar beeinflussen (Kellner *et al.*, 2016; Maulvault *et al.*, 2018; Olsén *et al.*, 2014; Porseryd *et al.*, 2017; Sackerman *et al.*, 2010).

**Das Schwimmverhalten der Fische unter Stressbedingungen wurde von Venlafaxin stärker verringert.** Venlafaxin führte sowohl bei juvenilen Bachforellen als auch Bachforellenlarven ab einer Konzentration von 10 µg/L zu einer verringerten zurückgelegten Distanz, wohingegen Citalopram diesen Effekt ab 100 µg/L nur bei Bachforellenlarven hervorrief. Eine verringerte Geschwindigkeit über die Zeit und verlängerte Zeit ohne Bewegungen konnte durch beide Antidepressiva nur bei Bachforellenlarven nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass Venlafaxin unter Stressbedingungen stärkere Effekte bereits bei niedrigeren Konzentrationen aufweist. Vergleicht man dies mit dem Wirkspektrum beim Menschen, ist zu erkennen, dass Citalopram nur gegen depressive Erkrankungen und Panikstörungen Anwendung findet (Aristo Pharma GmbH, 2012; Hexal AG, 2019a; ratiopharm GmbH, 2019b). Venlafaxin hingegen wird zusätzlich zur Behandlung von generalisierten Angststörungen verwendet (Aristo Pharma GmbH, 2019; Hexal AG, 2019b; ratiopharm GmbH, 2019a) und hat damit einen stärker angstlösenden Effekt, der vermutlich auch in den Versuchen mit den Bachforellen zum Tragen kommt.

**Histopathologische Effekte in der Leber konnten nur bei einer Exposition gegenüber Citalopram nachgewiesen werden.** Venlafaxin hingegen zeigte keine Auswirkungen auf die Leberintegrität. Hierbei könnten die Gewebekonzentrationen der beiden Substanzen eine Rolle gespielt haben. Da sich im Verhältnis deutlich mehr Citalopram im Muskelgewebe der Fische anreicherte als Venlafaxin, kann auch davon ausgegangen werden, dass sich die Leberkonzentrationen äquivalent zu den Konzentrationen im Muskelgewebe verhalten haben (Grabicova *et al.*, 2017). Da deutlich höhere Konzentrationen an Citalopram im Gewebe nachgewiesen werden konnte als Venlafaxin, ist ebenfalls zu erwarten, dass Citalopram exponierte Tiere eine höhere Biotransformationsrate in der Leber aufweisen als die gegenüber Venlafaxin exponierten Tiere. Dies wird zudem von dem Fakt gestützt, dass Citalopram mit einer Halbwertszeit von 30 h deutlich schlechter abbaubar ist als Venlafaxin (Halbwertszeit 4 h) (Holliday & Benfield, 1995; Noble & Benfield, 1997). Weiterhin ist zu erwähnen, dass beide Antidepressiva in denselben Konzentrationen verwendet wurden, Venlafaxin jedoch beim Menschen deutlich höhere Wirkkonzentrationen im Vergleich zu Citalopram benötigt (WHO, 2019). Dies könnte dazu geführt haben, dass die Lebern der gegenüber Citalopram exponierten Tiere einen deutlich schlechteren Gesundheitszustand aufwiesen als die Lebern der gegenüber Venlafaxin exponierten Fische. Ähnlich hierzu zeigte Schultz *et al.* (2011), dass Venlafaxin keine Auswirkungen auf die Leber von Dickkopfritzen hatte. Lediglich Fallstudien mit Menschen mit Vorerkrankungen bzw. Simultantherapien mit anderen Medikamenten ergaben Schädigungen der Leber (Horsmans *et al.*, 1998; Stadlmann *et al.*, 2012). Dagegen konnte in Studien mit Ratten Leberschäden durch

Citalopramgabe nachgewiesen werden (Ahmadian *et al.*, 2017; Mohammadi *et al.*, 2013). Ebenfalls konnten in Fallstudien Schäden der Leber durch Citalopram beim Menschen gezeigt werden (Hunfeld *et al.*, 2010; Neumann *et al.*, 2008). Betrachtet man zusätzlich die Nebenwirkungen der beiden Antidepressiva, ist die Häufigkeit durch Einnahme von Citalopram an einer Hepatitis zu erkranken gelegentlich bis selten gegeben, bei Venlafaxin dagegen ist eine Häufigkeit hierfür bis jetzt noch nicht bekannt (AbZ-Pharma GmbH, 2019; Hexal AG, 2019a, b). Weiterhin zeigten nur die Citalopram-exponierten Bachforellen einen verringerten Glykogengehalt, der durch eine verminderte Nahrungsaufnahme verursacht sein könnte. Allerdings könnte unter anderem die bereits oben genannte Wirkkonzentration sowie kurze Halbwertszeit von Venlafaxin eine Erklärung für die Unterschiede im Glykogengehalt darstellen.

**Venlafaxin erhöhte den oxidativen Stress in Bachforellenlarven.** Bachforellenlarven die gegenüber mindestens 10 µg/L Venlafaxin bei 7 °C exponiert waren wiesen eine höhere SOD Aktivität als Kontrolltiere auf. Jedoch können Unterschiede bezüglich der Superoxiddismutase-Aktivität beider Antidepressiva nicht festgemacht werden, da nur in den Versuchen mit Venlafaxin die SOD-Aktivität analysiert wurde. Allerdings zeigen Studien, dass andere SSRI's die Superoxiddismutase-Aktivität von Fischen erhöhen können (Xie *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). Zudem ist in Studien mit Ratten und Rattenhepatozyten bereits oxidativer Stress durch Citalopram und Venlafaxin nachgewiesen (Ahmadian *et al.*, 2016; Ahmadian *et al.*, 2017).

Die weiteren Entwicklungsendpunkte Schlupfrate und Herzschlagrate, sowie die biochemischen Biomarker B-Esterasen-Aktivität, Stressproteinlevel und Cortisolgehalt wurden weder durch Citalopram noch durch Venlafaxin beeinflusst.

Abschließend kann gesagt werden, dass Venlafaxin Verhaltenseffekte bei beiden Lebensstadien und in niedrigeren Konzentrationen ausgelöst hat als Citalopram. Zudem ist ein Trend zu erhöhter Mortalität durch Venlafaxin aufgetreten. Citalopram hat das Wachstum von juvenilen als auch larvalen Bachforellen verringert, wohingegen Venlafaxin nur Effekte bei Larven hervorruft. Die Leberintegrität wurde wiederum nur durch das Antidepressivum Citalopram beeinflusst. Hinsichtlich der SOD-Aktivität können keine Aussagen zu unterschiedlichen Wirkungen der Antidepressiva gemacht werden, da diese nur bei den Versuchen mit Venlafaxin erfasst wurde. Diese in den Versuchen mit Bachforellen beobachteten Unterschiede von Citalopram und Venlafaxin beruhen auf den inhärenten Eigenschaften der Stoffe und den Wirkungen und Nebenwirkungen die auch beim Menschen bekannt sind.

### 7.3 Bewertung der Umweltrelevanz

Die Bewertung der Umweltrelevanz von Pharmazeutika verläuft in zwei Phasen. Hierbei wird prognostiziert, welches die erwartete Umweltkonzentration (predicted environmental concentration – PEC) sowie die geringste Konzentration ist, bei der kein Effekt zu erwarten ist (predicted no-effect concentration – PNEC). In Phase I wird die PEC mit folgender Formel berechnet:

$$PEC_{SW} = \frac{(DOSE_{ai} * F_{pen})}{(WASTE_{Winhab} * DILUTION)}$$

(SW = Oberflächengewässer; DOSE<sub>ai</sub> = höchste empfohlenen Tagesdosis des Medikaments; F<sub>pen</sub> = Marktdurchdringungsfaktor, Standardwert: 0,01 (EMEA, 2006); WASTE<sub>Winhab</sub> = Abwassermenge pro Einwohner pro Tag, Standardwert: 200 L/Einwohner/d, (European Chemicals Bureau, 2003); DILUTION = Verdünnungsfaktor, Standardwert: 10 (European Chemicals Bureau, 2003)) (EMEA, 2006).

Für Citalopram berechnet sich somit ein PEC<sub>SW</sub> von 0,2 µg/L (DOSE<sub>ai</sub> = 60 mg/d/Person) und für Venlafaxin ein PEC<sub>SW</sub> von 1,125 µg/L (DOSE<sub>ai</sub> = 225 mg/d/Person) (Freissmuth *et al.*, 2020). Da sowohl für Citalopram als auch Venlafaxin der Schwellenwert von 10 ng/L überschritten wird, erfolgt eine weitere Bewertung beider Substanzen in Phase II. Hierbei wird mit den niedrigsten Effektwerten aus den Studien mit Spezies unterschiedlicher trophischer Ebenen und einem Sicherheitsfaktor die PNEC ermittelt (EMEA, 2006). Aus dem ermittelten PNEC und dem PEC kann somit ein Risikoquotient (RQ) errechnet werden ( $RQ = \frac{PEC}{PNEC}$ ). Ein Risikoquotient zwischen 0,01 und 0,1 stellt ein geringes Umweltrisiko, zwischen 0,1 und 1 ein mittleres Umweltrisiko und ein Risikoquotienten von über 1 ein hohes Umweltrisiko dar (Minguez *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2019).

#### 7.3.1 Citalopram

Umweltrisikobewertungen verschiedener Autoren deuten auf ein Umweltrisiko durch Citalopram hin. Minguez *et al.* (2016) bewerteten 46 Pharmazeutika bezüglich ihres Umweltrisikos für Süßgewässer und marine Ökosysteme und schlussfolgerte, dass kein Umweltrisiko durch Citalopram in Süßgewässern, jedoch ein geringes ökologisches Risiko in marinen Gewässern besteht. Escher *et al.* (2011) bewerteten das Risiko von 100 Medikamenten in einem Schweizer Krankenhausablauf und berechneten einen Risikoquotienten von 0,031 für Citalopram ohne Degradationsprozess oder Verdünnungen. Werden jedoch realistische Degradationsprozesse und eine Verdünnung des Abwassers mit berücksichtigt, berechnete sich ein RQ von 0,0004, welcher auf ein nicht vorhandenes Umweltrisiko durch Citalopram hindeutet (Escher *et al.*, 2011). Cunha *et al.* (2019) führten eine Bewertung des Umweltrisikos psychoaktiver Substanzen durch und berechneten für Citalopram in einem Worst-Case-Szenario einen Risikoquotienten über 1, was darauf hindeutet, dass Citalopram

wahrscheinlich ein Umweltrisiko darstellt. Fernández-Rubio *et al.* (2019) untersuchten psychoaktive Substanzen in Küstengewässern Spaniens hinsichtlich ihres Umweltrisikos und berechnete für Citalopram einen Risikoquotienten von 1 und folgerte somit auch, dass ein Umweltrisiko durch das Antidepressivum vorliegt. Ähnlich hierzu berechneten Zhou *et al.* (2019) die Risikoquotienten von Pharmazeutika in Europäischen Oberflächengewässern und folgerte mit einem mittleren RQ von 2,24 und einem optimiert berechneten RQ von 0,9, bei dem zusätzlich die Häufigkeit der gemessenen Umweltkonzentrationen mit einbezogen wird, ein moderates bis hohes Risiko durch Citalopram. Weiterhin wurden von Fick *et al.* (2010) für 500 Pharmazeutika die vorausgesagten kritischen Umweltkonzentrationen (predicted critical environmental concentration = CEC) berechnet. Die CEC beschreibt die Konzentration, die in Fischen zu einem Gleichgewicht der Plasmakonzentration des Medikamentes führt, die bei Menschen bereits pharmakologische Auswirkungen hat, und somit möglicherweise in Fischen ebenfalls Effekte hervorrufen kann. Hierbei errechneten Fick *et al.* (2010) eine CEC von 141 ng/L für Citalopram, welches somit zu den 25 % der Pharmazeutika mit den niedrigsten CEC in dieser Studie zählt. Da für Citalopram der CEC bereits niedriger als die hier berechnet  $PEC_{SW}$  liegt, kann von einem ökologischen Risiko ausgegangen werden. Allgemein wird vor allem in neueren Studien von einem ökologischen Risiko durch Citalopram ausgegangen, jedoch werden in der Literatur unterschiedliche Angaben hinsichtlich des Umweltrisikos von Citalopram gemacht.

Für Citalopram konnten bereits bei niedrigen Konzentrationen Effekte in aquatischen Organismen nachgewiesen werden. Verhaltensveränderungen konnten bei Endler Guppys, Dreistachlichen Stichlingen und Zebrabärblingen in Konzentrationen von 0,1 – 2,3 µg/L nachgewiesen werden (Kellner *et al.*, 2015; Kellner *et al.*, 2016; Kellner *et al.*, 2017; Olsén *et al.*, 2014; Porseryd *et al.*, 2017). Und auch Invertebraten zeigten Verhaltensänderungen, wie Verlust des Tarnverhaltens oder Ablösen der Sohle von der Oberfläche, bei Konzentrationen im ng/L Bereich bis zu sehr niedrigen Konzentrationen von 405 pg/L (Buřič *et al.*, 2018; Fong & Hoy, 2012). Unter Berücksichtigung des geringsten Sicherheitsfaktor von 10 (European Chemicals Bureau, 2003) kann mit den Ergebnissen der Studien und den berechneten  $PEC_{SW}$  ein Umweltrisiko für Citalopram nicht ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit lag die niedrigste Konzentration, bei der Effekte auftraten, bei 100 µg/L Citalopram. Diese Konzentration führte bei Bachforellenlarven zu Verhaltensänderungen unter Stressbedingungen und zu Gewebsschädigungen in der Leber der Fische. Somit liegen die niedrigsten in dieser Arbeit erreichten NOECs bei 10 µg/L Citalopram. Diese erfassten Endpunkte stellen populationsrelevante Faktoren dar, die zur Beurteilung des Umweltrisikos mit einbezogen werden sollten (Ågerstrand *et al.*, 2020; Schwaiger, 2001; Sutherland, 1996; Triebkorn *et al.*, 2014). Vor

allem Verhaltensparameter werden derzeit nicht ausreichend in der Risikobewertung von Chemikalien berücksichtigt und verlangen nach mehr Aufmerksamkeit, da für viele Verhaltensparameter die Relevanz auf populationsebene bereits gezeigt wurden (Ågerstrand *et al.*, 2020; Saaristo *et al.*, 2018; Wong & Candolin, 2014). Verrechnet man die hier erreichten NOECs mit dem Sicherheitsfaktor von 10 (European Chemicals Bureau, 2003), ergibt sich auf Grundlage dieser Daten eine PNEC von 1 µg/L. Dieser Wert liegt zwar höher als der PEC<sub>SW</sub> für Citalopram, dennoch errechnet sich somit ein Risikoquotient von 0,2, welcher als mittleres ökologisches Risiko zu bewerten ist (Minguez *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2019). Bezieht man tatsächlich gemessene Umweltkonzentrationen (measured environmental concentration – MEC) mit ein (bis zu 219 ng/L in Schultz *et al.* (2010)), ergibt sich ein ähnliches Bild, wodurch Citalopram ein mittleres Umweltrisiko darstellen kann (RQ = 0,219). Somit sind die Ergebnisse dieser Studie ähnlich einzuordnen wie Ergebnisse aus bereits zuvor genannter Literatur, in der Citalopram ein Umweltrisiko zugesprochen wird.

### 7.3.2 Venlafaxin

Studien, die sich mit der Umweltrisikobewertung von Venlafaxin befassen, sind zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen. Eine Bewertung von 46 Pharmazeutika von Minguez *et al.* (2016) bezüglich deren Umweltrisiko für Süßgewässer und marine Ökosysteme ergab für Venlafaxin einen RQ von unter 0,01, was gegen ein Umweltrisiko der Substanz für limnische und marine Ökosysteme spricht. Auch Escher *et al.* (2011) berechneten einen Risikoquotienten für Venlafaxin in einem Krankenhausablauf ohne Degradationsprozess oder Verdünnung von 0,69. Werden Degradationsprozesse und Verdünnung des Abwassers mit in Betracht gezogen, ergab sich ein RQ von 0,009, der ebenfalls kein Umweltrisiko darstellen würde. Ähnlich hierzu berechneten Fick *et al.* (2010) den CEC von 500 Pharmazeutika und zeigten für Venlafaxin ein CEC von 6,112 µg/L, der höher als der berechnete PEC<sub>SW</sub> des Antidepressivums ist, wodurch sich ebenfalls kein Umweltrisiko ergibt. Im Gegensatz dazu, zeigten Fernández-Rubio *et al.* (2019) nach Untersuchungen spanischer Küstengewässer hinsichtlich des Umweltrisikos psychoaktiver Substanzen für Venlafaxin mit einem Risikoquotienten von 30,01, dass dieses Antidepressivum ein hohes Umweltrisiko darstellt. Vergleichbar hierzu berechneten Zhou *et al.* (2019) die Risikoquotienten von verschiedenen Pharmazeutika in Europa und ermittelten ein hohes Risiko durch Venlafaxin mit einem mittleren RQ von 21,48 und einem optimiert berechneten RQ von 6,67, bei dem zusätzlich die Häufigkeit der gemessenen Umweltkonzentrationen mit einbezogen wird. Dementsprechend wurde Venlafaxin und dessen Hauptmetabolit O-Desmethylvenlafaxin im August 2020 auf die Beobachtungsliste der Wasserrahmenrichtlinie aufgenommen (Cortes *et al.*, 2020; EU, 2020). Somit zeigen ältere Studien, dass bei Venlafaxin von keinem oder nur einem geringen Umweltrisiko ausgegangen wurde, jedoch



eröffnen aktuelle Erkenntnisse, dass Venlafaxin durchaus ein hohes Risiko auf die aquatische Umwelt birgt und dieses beobachtet werden muss.

Betrachtet man die wissenschaftliche Literatur, konnten bereits Effekte in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen für Venlafaxin nachgewiesen werden. Verhaltensveränderungen und physiologische Effekte konnten bei Adlerfischen, Zebraabärblingen, Regenbogenforellen und Dickkopfelritzen im Konzentrationsbereich von 305 ng/L – 20 µg/L Venlafaxin gezeigt werden (Maulvault *et al.*, 2018; Maulvault *et al.*, 2019; Mehdi *et al.*, 2019; Melnyk-Lamont *et al.*, 2014; Painter *et al.*, 2009; Schultz *et al.*, 2011; Sehonova *et al.*, 2019). Auch bei Invertebraten konnten Effekte in Konzentrationen zwischen 313 pg/L und 100 ng/L Venlafaxin nachgewiesen werden (Bidel *et al.*, 2016; Fong & Hoy, 2012).

Bezieht man den Sicherheitsfaktor von 10 (European Chemicals Bureau, 2003) mit ein und vergleicht diese Ergebnisse mit dem berechneten  $PEC_{SW}$  von 1,125 µg/L von Venlafaxin, liegen die Effektkonzentrationen teilweise deutlich darunter und deuten auf ein Umweltrisiko durch das Antidepressivum hin.

In der vorliegenden Arbeit ist die niedrigste Konzentration, bei der Effekte auftraten, 10 µg/L Venlafaxin. Bei dieser Konzentration zeigten Bachforellenlarven Verhaltensveränderungen unter Stressbedingungen, ein verringertes Längenwachstum sowie eine erhöhte SOD-Aktivität. Die NOEC lag bei 1 µg/L Venlafaxin. Wie bereits erwähnt stellen Teile der in dieser Studie erfassten Endpunkte populationsrelevante Faktoren dar, die zur Beurteilung des Umweltrisikos mit einbezogen werden sollten (Ågerstrand *et al.*, 2020; Schwaiger, 2001; Sutherland, 1996; Triebkorn *et al.*, 2014). Hierbei sollten vor allem Verhaltensveränderungen, die derzeit in der Risikobewertung von Chemikalien noch wenig berücksichtigt werden, mehr Beachtung geschenkt werden. Verrechnet man die NOEC mit dem Sicherheitsfaktor von 10 (European Chemicals Bureau, 2003) ergibt sich ein PNEC von 0,1 µg/L welcher verrechnet mit dem  $PEC_{SW}$  für Venlafaxin einen Risikoquotienten von 11,25 ergibt. Somit stellt Venlafaxin ein Risiko für die Umwelt dar. Bezieht man statt des  $PEC_{SW}$ , tatsächlich gemessene Umweltkonzentrationen (MEC) mit ein (bis zu 690 ng/L in Schultz *et al.*, 2010), kann ebenfalls keine Entwarnung bezüglich des Umweltrisikos gegeben werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie reihen sich gut in die Ergebnisse der vorhandenen Literatur ein. Zudem stimmt die Beurteilung des Umweltrisikos mit neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen und der durch die EU erlassene Beobachtungsliste überein (Cortes *et al.*, 2020; EU, 2020; Fernández-Rubio *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019). Weiterhin ist die gesellschaftliche Entwicklung von psychischer Gesundheit und Depressionen und somit der damit einhergehende steigende Verbrauch von Antidepressiva nicht außer Acht zu lassen (Liu *et al.*, 2020; Schwabe *et al.*, 2019).

## 7.4 Empfehlungen und Ausblick

Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, zeigen deutlich, dass die Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin teils starke und relevante Effekte bei Bachforellen hervorrufen. Vor allem die beobachteten Veränderungen des Verhaltens haben sich als sensitive Endpunkte erwiesen, weshalb Verhaltensparametern bei der Risikobewertung vor allem von neuroaktiven Substanzen, wie Antidepressiva, künftig mehr Beachtung geschenkt werden sollte. Dies ist umso bedeutender, da diese Endpunkte von hoher Relevanz für mögliche negative Einflüsse auf Populationen und Ökosysteme sind. Die beobachteten Effekte, die durch beide Substanzen bei Bachforellen hervorgerufen wurden, können mit für den Menschen bekannten Wirkungen und Nebenwirkungen in Verbindung gebracht werden. Sowohl für Citalopram als auch Venlafaxin konnte gezeigt werden, dass beide Stoffe unter Einbeziehen eines Sicherheitsfaktors von 10 ein Risiko für die aquatische Umwelt darstellen. Bedenkt man zudem den oft ähnlichen Wirkmechanismus verschiedener Antidepressiva, sind additive oder sogar synergistische Effekte, die mehrere Antidepressiva hervorrufen könnten, mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Umwelt zu erwarten und deshalb wichtig zu beachten. Berücksichtigt man zudem die weltweit steigenden Zahlen an Depressionen und damit einhergehend den steigenden Konsum von Antidepressiva, sind sowohl Citalopram als auch Venlafaxin Pharmazeutika, die nach einer weitergehenden Betrachtung hinsichtlich ihres ökologischen Risikos verlangen.

## 8 Referenzen

- 1 A Pharma GmbH. 2019.** Gebrauchsinformation: Information für Patienten. Citalopram - 1 A Pharma® 20 mg Filmtabletten, *1 A Pharma GmbH*, Oberhaching, [http://www.1a-files.de/pdf/gj/2019\\_09\\_citalopram\\_20mg\\_fi-1570450791.pdf](http://www.1a-files.de/pdf/gj/2019_09_citalopram_20mg_fi-1570450791.pdf) (17.06.2020).
- AbZ-Pharma GmbH. 2019.** Gebrauchsinformation: Information für Patienten. Citalopram AbZ 20 mg Filmtabletten, *AbZ-Pharma GmbH*, Ulm, [https://www.abz.de/assets/products/de/pkg\\_insert/Citalopram%20AbZ%2020%20mg%20Filmtabletten.pdf?pzn=1419965](https://www.abz.de/assets/products/de/pkg_insert/Citalopram%20AbZ%2020%20mg%20Filmtabletten.pdf?pzn=1419965) (17.06.2020).
- Acuña, V., von Schiller, D., García-Galán, M. J., Rodríguez-Mozaz, S., Corominas, L., Petrovic, M., Poch, M., Barceló, D., Sabater, S. 2015.** Occurrence and in-stream attenuation of wastewater-derived pharmaceuticals in Iberian rivers, *Science of the Total Environment* 503-504:133-141; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.067.
- Ågerstrand, M., Arnold, K., Balshine, S., Brodin, T., Brooks, B. W., Maack, G., McCallum, E. S., Pyle, G., Saaristo, M., Ford, A. T. 2020.** Emerging investigator series: use of behavioural endpoints in the regulation of chemicals, *Environmental Science: Progress and Impacts* 22(1):49-65; DOI: 10.1039/c9em00463g.
- Agius, C., Roberts, R. 2003.** Melano-macrophage centres and their role in fish pathology, *Journal of Fish Diseases* 26(9):499-509; DOI: 10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x.
- Ahmadian, E., Babaei, H., Mohajjel Nayebi, A., Eftekhari, A., Eghbal, M. A. 2016.** Venlafaxine-Induced Cytotoxicity Towards Isolated Rat Hepatocytes Involves Oxidative Stress and Mitochondrial/Lysosomal Dysfunction, *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 6(4):521-530; DOI: 10.15171/apb.2016.066.
- Ahmadian, E., Eftekhari, A., Fard, J. K., Babaei, H., Nayebi, A. M., Mohammadnejad, D., Eghbal, M. A. 2017.** In vitro and in vivo evaluation of the mechanisms of citalopram-induced hepatotoxicity, *Archives of Pharmacal Research* 40(11):1296-1313; DOI: 10.1007/s12272-016-0766-0.
- Airhart, M. J., Lee, D. H., Wilson, T. D., Miller, B. E., Miller, M. N., Skalko, R. G. 2007.** Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC), *Neurotoxicology and Teratology* 29(6):652-664; DOI: 10.1016/j.ntt.2007.07.005.
- Akiyoshi, H., Inoue, A. 2004.** Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny, *Zoological Science (Tokyo)* 21(8):841-850; DOI: 10.2108/zsj.21.841.
- Aldridge, W. N. 1952.** Serum Esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination, *Biochemical Journal* 1:110-117; DOI: 10.1042/bj0530110.
- AMG. 1976.** Gesetz über den Verkehr mit Arzneimittel (Arzneimittelgesetz - AMG), *Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz*.
- Aristo Pharma GmbH. 2012.** Gebrauchsinformation: Information für den Anwender. Citalopram Aristo® 10 mg Filmtabletten, *Aristo Pharma GmbH*, Berlin, [https://www.medikamente-per-klick.de/images/ecommerce/05/02/05027966\\_2012-10\\_de\\_o.pdf](https://www.medikamente-per-klick.de/images/ecommerce/05/02/05027966_2012-10_de_o.pdf) (17.06.2020).

- Aristo Pharma GmbH. 2019.** Fachinformation. Venlafaxin Aristo® 37,5 mg/75 mg/150 mg Retardkapseln *Aristo Pharma GmbH, Berlin*, <http://fachinformation.srz.de/pdf/aristo/venlafaxinaristo375mg75mg150mgretardkapseln.pdf> (17.06.2020).
- Bachour, R. L., Golovko, O., Kellner, M., Pohl, J. 2020.** Behavioral effects of citalopram, tramadol, and binary mixture in zebrafish (*Danio rerio*) larvae, *Chemosphere* 238:124587; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124587.
- Bagnyukova, T. V., Lushchak, O. V., Storey, K. B., Lushchak, V. I. 2007.** Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C, *Journal of Thermal Biology* 32(4):227-234; DOI: 10.1016/j.jtherbio.2007.01.004.
- Bartlett, F., Neumann, D. 1998.** Sensitivity of Brown Trout Alevins (*Salmo trutta* L.) to Nitrite at Different Chloride Concentrations, *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 60:340-346; DOI: 10.1007/s001289900632.
- Barton, M. 2007.** Bond's Biology of Fishes, *Thomson, USA*, ISBN: 978-0-12-079875-9.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. 1995.** Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing, *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* 57(1):12; DOI: 10.2307/2346101.
- Bennett, D., Bellinger, D. C., Birnbaum, L. S., Bradman, A., Chen, A., Cory-Slechta, D. A., Engel, S. M., Fallin, M. D., Halladay, A., Hauser, R., Hertz-Picciotto, I., Kwiatkowski, C. F., Lanphear, B. P., Marquez, E., Marty, M., McPartland, J., Newschaffer, C. J., Payne-Sturges, D., Patisaul, H. B., Perera, F. P., Ritz, B., Sass, J., Schantz, S. L., Webster, T. F., Whyatt, R. M., Woodruff, T. J., Zoeller, R. T., Anderko, L., Campbell, C., Conry, J. A., et al. 2016.** Project TENDR: Targeting Environmental Neuro-Developmental Risks The TENDR Consensus Statement, *Environmental Health Perspectives* 124(7):A118-122; DOI: 10.1289/EHP358.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. 1999.** Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution, *Journal of Fish Diseases* 22:25-34; DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x.
- Bezchlibnyk-Butler, K., Aleksic, I., Kennedy, S. H. 2000.** Citalopram - a Review of Pharmacological and Clinical Effects, *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 25(3):241-254; PMCID: PMC1407724.
- Bick, H. 1963.** A Review of Central European Methods for Biological Estimation of Water Pollution Levels, *Bulletin of the World Health Organization* 29:401-413; PMCID: PMC2554969.
- Bidel, F., Di Poi, C., Budzinski, H., Pardon, P., Callewaert, W., Arini, A., Basu, N., Dickel, L., Bellanger, C., Jozet-Alves, C. 2016.** The antidepressant venlafaxine may act as a neurodevelopmental toxicant in cuttlefish (*Sepia officinalis*), *Neurotoxicology* 55:142-153; DOI: 10.1016/j.neuro.2016.05.023.
- Bisesi, J. H., Jr., Bridges, W., Klaine, S. J. 2014.** Effects of the antidepressant venlafaxine on fish brain serotonin and predation behavior, *Aquatic Toxicology* 148:130-138; DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.12.033.
- Boon, A., Réale, D., Boutin, S. 2008.** Personality, habitat use, and their consequences for survival in North American red squirrels *Tamiasciurus hudsonicus*, *Oikos* 117(9):1321-1328; DOI: 10.1111/j.0030-1299.2008.16567.x.

- Boyd, W. A., Brewer, S. K., Williams, P. L. 2002.** Altered Behaviour of Invertebrates Living in Polluted Environments, In: **Dell'Omo, G.**, Behavioural ecotoxicology, *John Wiley & Sons, LTD*, pp. 293-336; ISSN: 0471968528.
- Bradford, M. M. 1976.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* 72:248-254; DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brandão, F. P., Rodrigues, S., Castro, B. B., Gonçalves, F., Antunes, S. C., Nunes, B. 2013.** Short-term effects of neuroactive pharmaceutical drugs on a fish species: biochemical and behavioural effects, *Aquatic Toxicology* 144-145:218-229; DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.10.005.
- Braunbeck, T., Storch, V., Bresch, H. 1990.** Species-Specific Reaction of Liver Ultrastructure in Zebrafish (*Brachydanio rerio*) and Trout (*Salmo gairdneri*) after Prolonged Exposure to 4-Chloroaniline, *Archives of Environment Contamination and Toxicology* 19:405-418; DOI: 10.1007/BF01054986.
- Braunbeck, T. 2020.** Effect-Net, <http://www.effect-net-wasser.de> (17.06.2020).
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J. 2013.** Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations, *Science* 339(6121):814-815; DOI: 10.1126/science.1226850.
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Jonsson, M. 2014.** Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems impacts—through behavioural alterations, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 369(1656); DOI: 10.1098/rstb.2013.0580.
- Brown, D. A., McLeay, D. J. 1975.** Effect of Nitrite on Methemoglobin and Total Hemoglobin of Juvenile Rainbow Trout, *Progressive Fish-Culturist* 37(1):36-38; DOI: 10.1577/1548-8659(1975)37[36:Eonoma]2.0.Co;2.
- Bruslé, J., Anadon, G. G. I. 1996.** The Structure and Function of Fish Liver, In: **Munshi, J. S. D. und Dutta, H. M.**, Fish Morphology, *Taylor & Francis Group*, London, pp. 77-93; DOI: 10.1201/9780203755990-6.
- Buřič, M., Grabicová, K., Kubec, J., Kouba, A., Kuklina, I., Kozak, P., Grabic, R., Randák, T. 2018.** Environmentally relevant concentrations of tramadol and citalopram alter behaviour of an aquatic invertebrate, *Aquatic Toxicology* 200:226-232; DOI: 10.1016/j.aquatox.2018.05.008.
- Burnett, F., Dinan, T. G. 1998.** Venlafaxine. Pharmacology and Therapeutic Potential in the Treatment of Depression, *Human Psychopharmacology* 13:153-162; DOI: 10.1002/(SICI)1099-1077(199804)13:3<153::AID-HUP973>3.0.CO;2-S.
- Cairns, J. J., Heath, A. G., Parker, B. C. 1975a.** The Effect of Temperature Upon the Toxicity of Chemicals to Aquatic Organisms, *Hydrobiologia* 47(1):135-171; DOI: 10.1007/BF00036747.
- Cairns, J. J., Heath, A. G., Parker, B. C. 1975b.** Temperature Influence on Chemical Toxicity to Aquatic Organisms, *Journal (Water Pollution Control Federation)* 47(2):267-280; PMID: 1094136.
- Calderón-Garcidueñas, L., Torres-Jardón, R., Kulesza, R. J., Park, S. B., D'Angiulli, A. 2014.** Air pollution and detrimental effects on children's brain. The need for a multidisciplinary approach to the issue complexity and challenges, *Frontiers in Human Neuroscience* 8:613; DOI: 10.3389/fnhum.2014.00613.

- Carr, R. L., Chambers, J. E. 1991.** Acute Effects of the Organophosphate Paraoxon on Schedule-Controlled Behavior and Esterase Activity in Rats: Dose-Response Relationships, *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 40:929-936; DOI: 10.1016/0091-3057(91)90108-E.
- Chanda, M. S., Mortensen, S. R., Moser, V. C., Padilla, S. 1997.** Tissue-Specific Effects of Chlorpyrifos on Carboxylesterase and Cholinesterase Activity in Adult Rats: An in Vitro and in Vivo Comparison, *Fundamental and Applied Nematology* 38(2):148-157; DOI: 10.1093/toxsci/38.2.148.
- ChemAxon. 2020.** LogD Predictor, <https://disco.chemaxon.com/calculators/demo/plugins/logd/> (25.08.2020).
- Chiffre, A., Clerandau, C., Dwoinikoff, C., Le Bihanic, F., Budzinski, H., Geret, F., Cachot, J. 2016.** Psychotropic drugs in mixture alter swimming behaviour of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) larvae above environmental concentrations, *Environmental Science and Pollution Research International* 23(6):4964-4977; DOI: 10.1007/s11356-014-3477-4.
- Corcoran, J., Winter, M. J., Tyler, C. R. 2010.** Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish, *Critical Reviews in Toxicology* 40(4):287-304; DOI: 10.3109/10408440903373590.
- Cortes, L. G., Marinov, D., Sanseverino, I., Cuenca, A. N., Niegowska, M., Rodriguez, E. P., Lettieri, T. 2020.** Selection of substances for the 3<sup>rd</sup> Watch List under the Water Framework Directive, EUR 30297 EN, JRC Technical Report, Lettieri, T., *Publication Office of the European Union*, Luxembourg; DOI: 10.2760/194067.
- Cowder, L. B., Rice, J. A., Miller, T. J., Marschall, E. A. 1992.** Empirical and Theoretical Approaches to Size-Based Interactions and Recruitment Variability in Fishes, In: **DeAngelis, D. L. und Gross, L. J.**, Individual-Based Models and Approaches in Ecology, *CRC Press*; ISSN: 978-1315894362.
- Cunha, D. L., Mendes, M. P., Marques, M. 2019.** Environmental risk assessment of psychoactive drugs in the aquatic environment, *Environ Sci Pollut Res Int* 26(1):78-90; DOI: 10.1007/s11356-018-3556-z.
- David, A., Lange, A., Tyler, C. R., Hill, E. M. 2018.** Concentrating mixtures of neuroactive pharmaceuticals and altered neurotransmitter levels in the brain of fish exposed to a wastewater effluent, *Science of the Total Environment* 621:782-790; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.265.
- de Oliveira, R. A., Cunha, G. M., Borges, K. D., de Bruin, G. S., dos Santos-Filho, E. A., Viana, G. S., de Bruin, V. M. 2004.** The effect of venlafaxine on behaviour, body weight and striatal monoamine levels on sleep-deprived female rats, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 79(3):499-506; DOI: 10.1016/j.pbb.2004.09.001.
- Demin, K. A., Kolesnikova, T. O., Khatsko, S. L., Meshalkina, D. A., Efimova, E. V., Morzherin, Y. Y., Kalueff, A. V. 2017.** Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes, *Neurotoxicology and Teratology* 62:27-33; DOI: 10.1016/j.ntt.2017.04.002.
- Dingemans, N. J., Both, C., Drent, P. J., Tinbergen, J. M. 2004.** Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment, *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* 271(1541):847-852; DOI: 10.1098/rspb.2004.2680.

- Driedzic, W. R., Short, C. E. 2007.** Relationship between food availability, glycerol and glycogen levels in low-temperature challenged rainbow smelt *Osmerus mordax*, *Journal of Experimental Biology* 210(Pt 16):2866-2872; DOI: 10.1242/jeb.003749.
- DrugBank. 2020.** DrugBank, <https://www.drugbank.ca/> (18.06.2020).
- Duarte, I. A., Pais, M. P., Reis-Santos, P., Cabral, H. N., Fonseca, V. F. 2019.** Biomarker and behavioural responses of an estuarine fish following acute exposure to fluoxetine, *Marine Environmental Research* 147:24-31; DOI: 10.1016/j.marenvres.2019.04.002.
- Dußling, U., Berg, R. 2001.** Fische in Baden-Württemberg, *Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden-Württemberg*, Stuttgart.
- Ellis, J. B. 2006.** Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters, *Environmental Pollution* 144(1):184-189; DOI: 10.1016/j.envpol.2005.12.018.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. 1961.** A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Biochemical Pharmacology* 7:88-95; DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- EMA. 2006.** Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use, *European Medicines Agency*, London.
- Escher, B. I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., McArdell, C. S. 2011.** Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater, *Water Research* 45(1):75-92; DOI: 10.1016/j.watres.2010.08.019.
- EU. 2000.** Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik, *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 327/1*, Luxemburg.
- EU. 2001a.** Richtlinie 2001/82/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Tierarzneimittel, *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 311/1*, Brüssel.
- EU. 2001b.** Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel, *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 311/67*, Brüssel.
- EU. 2006.** Richtlinie 2006/88/EG des Rates mit Gesundheits- und Hygienevorschriften für Tiere in Aquakultur und Aquakulturerzeugnissen und zur Verhütung und Bekämpfung bestimmter Wassertierkrankheiten, *Amtsblatt der Europäischen Union L 328/14*, Luxemburg.
- EU. 2013.** Richtlinie 2013/39/EU des Europäischen Parlaments und des Rates zur Änderung der Richtlinie 2000/60/EG und 2008/105/EG in Bezug auf prioritäre Stoffe im Bereich der Wasserpolitik, *Amtsblatt der Europäischen Union L 226/1*, Brüssel.
- EU. 2015.** Durchführungsbeschluss (EU) 2015/495 der Kommission zur Erstellung einer Beobachtungsliste von Stoffen für eine unionsweite Überwachung im Bereich der Wasserpolitik gemäß der Richtlinie 2008/105/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, *Amtsblatt der Europäischen Union L 78/40*, Brüssel.

- EU. 2020.** Durchführungsbeschluss 2020/1161 der Kommission zur Erstellung einer Beobachtungsliste von Stoffen für eine unionsweite Überwachung im Bereich der Wasserpolitik gemäß Richtlinie 2008/105/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, *Amtsblatt der Europäischen Union L 141/9*, Brüssel.
- European Chemicals Bureau. 2003.** Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, Part II *Gemeinschaft, E.*, Italy.
- Faust, S. D., Aly, O. M. 1964.** Water Pollution by Organic Pesticides, *Journal AWWA* 56(5):267-279; DOI: 10.1002/j.1551-8833.1964.tb01208.x.
- Feder, M. E., Hofmann, G. E. 1999.** Heat-Shock Proteins, Molecular Chaperones, and the Stress Response: Evolutionary and Ecological Physiology, *Annual Review of Physiology* 61:243-282; DOI: 10.1146/annurev.physiol.61.1.243.
- Fent, K. 2013.** Ökotoxikologie: Umweltchemie - Toxikologie - Ökologie, *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart, ISBN: 978-3-13-109994-5.
- Fernández-Rubio, J., Rodríguez-Gil, J. L., Postigo, C., Mastroianni, N., López de Alda, M., Barceló, D., Valcárcel, Y. 2019.** Psychoactive pharmaceuticals and illicit drugs in coastal waters of North-Western Spain: Environmental exposure and risk assessment, *Chemosphere* 224:379-389; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.02.041.
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, D. G. J. 2009.** Contamination of Surface, Ground, and Drinking Water from Pharmaceutical Production, *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12):2522-2527; DOI: 10.1897/09-073.S1.
- Fick, J., Lindberg, R. H., Tysklind, M., Larsson, D. G. 2010.** Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 58(3):516-523; DOI: 10.1016/j.yrtph.2010.08.025.
- Fisher, D. N., James, A., Rodríguez-Muñoz, R., Tregenza, T. 2015.** Behaviour in captivity predicts some aspects of natural behaviour, but not others, in a wild cricket population, *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* 282(1809):20150708; DOI: 10.1098/rspb.2015.0708.
- Fong, P. P., Hoy, C. M. 2012.** Antidepressants (venlafaxine and citalopram) cause foot detachment from the substrate in freshwater snails at environmentally relevant concentrations, *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 45(2):145-153; DOI: 10.1080/10236244.2012.690579.
- Foran, C. M., Weston, J., Slattery, M., Brooks, B. W., Huggett, D. B. 2004.** Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46(4):511-517; DOI: 10.1007/s00244-003-3042-5.
- Freissmuth, M., Offermanns, S., Böhm, S. 2020.** Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie, *Springer-Verlag GmbH*, Berlin, ISBN: 978-3-662-58303-6.



- Gaworecki, K. M., Klaine, S. J. 2008.** Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure, *Aquatic Toxicology* 88(4):207-213; DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.04.011.
- Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randak, T., Grabic, R. 2014.** Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant, *Chemosphere* 111:418-426; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.132.
- Grabicova, K., Lindberg, R. H., Ostman, M., Grabic, R., Randak, T., Larsson, D. G., Fick, J. 2014.** Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant, *Science of the Total Environment* 488-489:46-50; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.052.
- Grabicova, K., Grabic, R., Fedorova, G., Fick, J., Cerveny, D., Kolarova, J., Turek, J., Zlabek, V., Randak, T. 2017.** Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream, *Water Research* 124:654-662; DOI: 10.1016/j.watres.2017.08.018.
- Grandjean, P., Landrigan, P. J. 2014.** Neurobehavioural effects of developmental toxicity, *The Lancet Neurology* 13(3):330-338; DOI: 10.1016/s1474-4422(13)70278-3.
- Gunnarsson, L., Jauhainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D. G. J. 2008.** Evolutionary Conservation of Human Drug Targets in Organisms used for Environmental Risk Assessments, *Environmental Science and Technology* 42(15):5807-5813; DOI: 10.1021/es8005173.
- Hallare, A. V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H. R., Triebkorn, R. 2005.** Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos, *Journal of Thermal Biology* 30(1):7-17; DOI: 10.1016/j.jtherbio.2004.06.002.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H. C., Jørgensen, S. E. 1998.** Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment- A Review, *Chemosphere* 26(2):357-393; DOI: 10.1016/S0045-6535(97)00354-8.
- Hampton, J., McCuskey, P. A., McCuskey, R. S., Hinton, S. E. 1985.** Functional Units in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Liver: I. Arrangement and Histochemical Properties of Hepatocyte, *The Anatomical Record* 213:166-175; DOI: 10.1002/ar.1092130208.
- Hampton, J., Lantz, R. C., Goldblatt, P. J., Lauren, D. J., Hinton, D. E. 1988.** Functional Units in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) Liver: II. The Biliary System, *The Anatomical Record* 221:619-634; DOI: 10.1002/ar.1092210208
- Hedgspeth, M. L., Nilsson, P. A., Berglund, O. 2014.** Ecological implications of altered fish foraging after exposure to an antidepressant pharmaceutical, *Aquatic Toxicology* 151:84-87; DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.12.011.
- Heggenes, J., Gunnar Dokk, J. 2001.** Contrasting temperatures, waterflows, and light: seasonal habitat selection by young Atlantic salmon and brown trout in a boreonemoral river, *Regulated Rivers: Research & Management* 17(6):623-635; DOI: 10.1002/rrr.620.
- Hellström, G., Klaminder, J., Jonsson, M., Fick, J., Brodin, T. 2016.** Upscaling behavioural studies to the field using acoustic telemetry, *Aquatic Toxicology* 170:384-389; DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.11.005.

- Henry, T. B., Black, M. C. 2008.** Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54(2):325-330; DOI: 10.1007/s00244-007-9018-0.
- Herborn, K. A., Macleod, R., Miles, W. T. S., Schofield, A. N. B., Alexander, L., Arnold, K. E. 2010.** Personality in captivity reflects personality in the wild, *Animal Behaviour* 79(4):835-843; DOI: 10.1016/j.anbehav.2009.12.026.
- Herdegen, T., Böhm, R., Cimin-Bredée, N., Culman, J., Gohlke, P., Ley, L., Luippold, G., Ufer, M., Wätzig, V. 2008.** Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie, *Georg Thieme Verlag KG*, Stuttgart, ISBN: 978-3-13-142291-0.
- Hexal AG. 2019a.** Gebrauchsinformation: Information für Patienten. Citalopram HEXAL® 10 mg Filmtabletten, *Hexal AG*, [https://www.hexal.biz/praeparate/dokumente/gi/2019\\_10\\_citalopram\\_10mg\\_gi-1570717672.pdf](https://www.hexal.biz/praeparate/dokumente/gi/2019_10_citalopram_10mg_gi-1570717672.pdf) (17.06.2020).
- Hexal AG. 2019b.** Gebrauchsinformation: Information für Patienten. Venlafaxin HEXAL® 37,5 mg Hartkapseln, retardiert. Venlafaxin HEXAL® 75 mg Hartkapseln, retardiert. Venlafaxin HEXAL® 150 mg Hartkapseln, retardiert, *Hexal AG*, Holzkirchen, [https://www.hexal.biz/praeparate/dokumente/gi/46259701\\_165x620\\_If\\_it-1575531248.pdf](https://www.hexal.biz/praeparate/dokumente/gi/46259701_165x620_If_it-1575531248.pdf) (17.06.2020).
- Himmelsbach, M., Buchberger, W., Klampfl, C. W. 2006.** Determination of antidepressants in surface and waste water samples by capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection after preconcentration using off-line solid-phase extraction, *Electrophoresis* 27(5-6):1220-1226; DOI: 10.1002/elps.200500693.
- Holliday, S. M., Benfield, P. 1995.** Venlafaxine. A Review of its Pharmacology and Therapeutic Potential in Depression, *Drugs* 49(2):280-294; DOI: 10.2165/00003495-199549020-00010.
- Hoover, S. E. R., Tylianakis, J. M. 2012.** Species Interaction, In: **Candloin, U. und Wong, B. B. M.**, Behavioural responses to a changing world, mechanisms and consequences, *Oxford University Press*, Oxford, pp. 129-142; ISSN: 9780199602568.
- Horsmans, Y., De Clercq, M., Sempoux, C. 1998.** Venlafaxine-Associated Hepatitis, *Annals of Internal Medicine* 130(11):944; DOI: 10.7326/0003-4819-130-11-199906010-00014.
- Hunfeld, N. G. M., ten Berge, R. L., LeBrun, P. P. H., Smith, S. J., Melief, P. H. G. J. 2010.** Hepatotoxicity related to citalopram intake: A case report, *International Journal of Risk and Safety in Medicine* 22(1):1-5; DOI: 10.3233/jrs-2010-0486.
- Hyttel, J. 1982.** Citalopram - Pharmacological Profile of a Specific Serotonin Uptake Inhibitor with Antidepressant Activity, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 6:277-295; DOI: 10.1016/s0278-5846(82)80179-6.
- Jennions, M. D., Petrie, M. 1997.** Variation in mate choice and mating preferences: A review of causes and consequences, *Biological Reviews* 72(2):283-327; DOI: 10.1111/j.1469-185X.1997.tb00015.x.
- Jonsson, B., Jonsson, N. 2018.** Habitat as Template for Life Histories, In: **Lobon-Cervia, J. und Sanz, N.**, Brown Trout: Biology, Ecology and Management, *John Wiley & Sons Ltd*, Chichester; ISSN: 9781119268291.

- Karlsson, M. V., Carter, L. J., Agatz, A., Boxall, A. B. A. 2017.** Novel Approach for Characterizing pH-Dependent Uptake of Ionizable Chemicals in Aquatic Organisms, *Environmental Science and Technology* 51(12):6965-6971; DOI: 10.1021/acs.est.7b01265.
- Kellner, M., Porseryd, T., Porsch-Hällström, I., Hansen, S. H., Olsén, K. H. 2015.** Environmentally relevant concentrations of citalopram partially inhibit feeding in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Aquatic Toxicology* 158:165-170; DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.11.003.
- Kellner, M., Porseryd, T., Hallgren, S., Porsch-Hällström, I., Hansen, S. H., Olsén, K. H. 2016.** Waterborne citalopram has anxiolytic effects and increases locomotor activity in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Aquatic Toxicology* 173:19-28; DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.12.026.
- Kellner, M., Porseryd, T., Porsch-Hällström, I., Borg, B., Roufidou, C., Olsén, K. H. 2017.** Developmental exposure to the SSRI citalopram causes long-lasting behavioural effects in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Ecotoxicology* 27(1):12-22; DOI: 10.1007/s10646-017-1866-4.
- Key, A. 1956.** Pollution of Surface Water in Europe, *Bulletin of the World Health Organization* 14:845-948; PMID: PMC2538143.
- Keysomi, M. M. E., Sudagar, M., Nasir, A. 2013.** Effect of Citalopram on Reducing Transportation Stress in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of Aquaculture Research and Development* 04(03); DOI: 10.4172/2155-9546.1000171.
- Kidd, K. A., Paterson, M. J., Rennie, M. D., Podemski, C. L., Findlay, D. L., Blanchfield, P. J., Liber, K. 2014.** Direct and indirect responses of a freshwater food web to a potent synthetic oestrogen, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 369(1656); DOI: 10.1098/rstb.2013.0578.
- Killeen, J., McLay, H. A., Johnston, I. A. 1999a.** Development in *Salmo trutta* at different temperatures, with a quantitative scoring method for intraspecific comparisons, *Journal of Fish Biology* 55:282-404; DOI: 10.1111/j.1095-8649.1999.tb00686.x.
- Killeen, J. R., McLay, H. A., Johnston, I. A. 1999b.** Temperature and neuromuscular development in embryos of the trout (*Salmo trutta* L.), *Comparative Biochemistry and Physiology A* 122:53-64; DOI: 10.1016/S1095-6433(98)10143-5.
- Klaminder, J., Hellström, G., Fahlman, J., Jonsson, M., Fick, J., Lagesson, A., Bergman, E., Brodin, T. 2016.** Drug-Induced Behavioral Changes: Using Laboratory Observations to Predict Field Observations, *Frontiers in Environmental Science* 4; DOI: 10.3389/fenvs.2016.00081.
- Klemetsen, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J. B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M. F., Mortensen, E. 2003.** Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories, *Ecology of Freshwater Fish* 12:1-59; DOI: 10.1034/j.1600-0633.2003.00010.x.
- Köhler, H.-R., Triebkorn, R. 2004.** Stress im Boden: Früherkennungökotoxikologischer Effekte durch Biomarker, *Biologie in unserer Zeit* 34(4):240-248; DOI: 10.1002/biuz.200410256.
- Koops, M. A., Hutchings, J. A., McIntyre, T. M. 2004.** Testing hypotheses about fecundity, body size and maternal condition in fishes, *Fish and Fisheries* 5:120-130; DOI: 10.1111/j.1467-2979.2004.00149.x.

- Küster, E. 2005.** Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment, *Aquatic Toxicology* 75(1):76-85; DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.07.005.
- Laguerre, C., Sanchez-Hernandez, J. C., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C. 2009.** B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: an enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure, *Environmental Pollution* 157(1):199-207; DOI: 10.1016/j.envpol.2008.07.003.
- Lahti, M., Oikari, A. 2012.** Vertical distribution of pharmaceuticals in lake sediments-citalopram as potential chemomarker, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(8):1738-1744; DOI: 10.1002/etc.1901.
- Lajeunesse, A., Smyth, S. A., Barclay, K., Sauvé, S., Gagnon, C. 2012.** Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada, *Water Research* 46(17):5600-5612; DOI: 10.1016/j.watres.2012.07.042.
- Länge, R., Hutchinson, T. H., Croudace, C. P., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G. H., Sumpter, J. P. 2001.** Effects of the Synthetic Estrogen 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol on the Life-Cycle of the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*), *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(6):1216-1227; DOI: 10.1002/etc.5620200610.
- Larsson, D. G., de Pedro, C., Paxeus, N. 2007.** Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals, *Journal of Hazardous Materials* 148(3):751-755; DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.07.008.
- Legradi, J. B., Di Paolo, C., Kraak, M. H. S., van der Geest, H. G., Schymanski, E. L., Williams, A. J., Dingemans, M. M. L., Massei, R., Brack, W., Cousin, X., Begout, M. L., van der Oost, R., Carion, A., Suarez-Ulloa, V., Silvestre, F., Escher, B. I., Engwall, M., Nilén, G., Keiter, S. H., Pollet, D., Waldmann, P., Kienle, C., Werner, I., Haigis, A. C., Knapen, D., Vergauwen, L., Spehr, M., Schulz, W., Busch, W., Leuthold, D., et al. 2018.** An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment, *Environmental Sciences Europe* 30(1):46; DOI: 10.1186/s12302-018-0173-x.
- Liu, Q., He, H., Yang, J., Feng, X., Zhao, F., Lyu, J. 2020.** Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study, *Journal of Psychiatric Research* 126:134-140; DOI: 10.1016/j.jpsychires.2019.08.002.
- Loos, R., Gawlik, B. M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G. 2009.** EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters, *Environmental Pollution* 157(2):561-568; DOI: 10.1016/j.envpol.2008.09.020.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951.** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry*:265-275; ISSN: 0021-9258.
- Lu, J. G., Lee, J. J., Gino, F., Galinsky, A. D. 2018.** Polluted Morality: Air Pollution Predicts Criminal Activity and Unethical Behavior, *Psychological Science* 29(3):340-355; DOI: 10.1177/0956797617735807.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Vinagre, C., Diniz, M. S. 2013.** Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish, *Comparative Biochemistry and Physiology* 166(2):237-243; DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.06.008.

- Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., Tolbert, N. E. 1978.** A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples, *Analytical Biochemistry* 87:206-210; DOI: 10.1016/0003-2697(78)90586-9.
- Martin, J. M., Saaristo, M., Bertram, M. G., Lewis, P. J., Coggan, T. L., Clarke, B. O., Wong, B. B. M. 2017.** The psychoactive pollutant fluoxetine compromises antipredator behaviour in fish, *Environmental Pollution* 222:592-599; DOI: 10.1016/j.envpol.2016.10.010.
- Maulvault, A. L., Santos, L., Paula, J. R., Camacho, C., Pissarra, V., Fogaça, F., Barbosa, V., Alves, R., Ferreira, P. P., Barceló, D., Rodriguez-Mozaz, S., Marques, A., Diniz, M., Rosa, R. 2018.** Differential behavioural responses to venlafaxine exposure route, warming and acidification in juvenile fish (*Argyrosomus regius*), *Science of the Total Environment* 634:1136-1147; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.015.
- Maulvault, A. L., Camacho, C., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Pousão-Ferreira, P., Rosa, R., Marques, A., Diniz, M. S. 2019.** Living in a multi-stressors environment: An integrated biomarker approach to assess the ecotoxicological response of meagre (*Argyrosomus regius*) to venlafaxine, warming and acidification, *Environmental Research* 169:7-25; DOI: 10.1016/j.envres.2018.10.021.
- Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S., Gouveia, A., Jr. 2010a.** Measuring anxiety in zebrafish: a critical review, *Behavioural Brain Research* 214(2):157-171; DOI: 10.1016/j.bbr.2010.05.031.
- Maximino, C., Marques de Brito, T., Dias, C. A., Gouveia, A., Jr., Morato, S. 2010b.** Scototaxis as anxiety-like behavior in fish, *Nature Protocols* 5(2):209-216; DOI: 10.1038/nprot.2009.225.
- Maximino, C., de Oliveira, D. L., Broock Rosemberg, D., de Jesus Oliveira Batista, E., Herculano, A. M., Matos Oliveira, K. R., Benzecry, R., Blaser, R. 2012.** A comparison of the light/dark and novel tank tests in zebrafish, *Behaviour* 149(10-12):1099-1123; DOI: 10.1163/1568539x-00003029.
- McDonald, M. D. 2017.** An AOP analysis of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for fish, *Comparative Biochemistry and Physiology* 197:19-31; DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.03.007.
- Meador, J. P., Yeh, A., Gallagher, E. P. 2017.** Determining potential adverse effects in marine fish exposed to pharmaceuticals and personal care products with the fish plasma model and whole-body tissue concentrations, *Environmental Pollution* 230:1018-1029; DOI: 10.1016/j.envpol.2017.07.047.
- Mehdi, H., Bragg, L. M., Servos, M. R., Craig, P. M. 2019.** Multiple Stressors in the Environment: The Effects of Exposure to an Antidepressant (Venlafaxine) and Increased Temperature on Zebrafish Metabolism, *Frontiers in Physiology* 10:1431; DOI: 10.3389/fphys.2019.01431.
- Melnyk-Lamont, N., Best, C., Gesto, M., Vijayan, M. M. 2014.** The antidepressant venlafaxine disrupts brain monoamine levels and neuroendocrine responses to stress in rainbow trout, *Environmental Science and Technology* 48(22):13434-13442; DOI: 10.1021/es504331n.
- Melvin, S. D., Wilson, S. P. 2013.** The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis, *Chemosphere* 93(10):2217-2223; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.07.036.
- Mennigen, J. A., Sassine, J., Trudeau, V. L., Moon, T. W. 2010.** Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*, *Aquatic Toxicology* 100(1):128-137; DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.07.022.

- Meshalkina, D. A., Kysil, E. V., Antonova, K. A., Demin, K. A., Kolesnikova, T. O., Khatsko, S. L., Gainetdinov, R. R., Alekseeva, P. A., Kalueff, A. V. 2018.** The Effects of Chronic Amitriptyline on Zebrafish Behavior and Monoamine Neurochemistry, *Neurochemical Research* 43(6):1191-1199; DOI: 10.1007/s11064-018-2536-5.
- Metcalfe, C. D., Chu, S., Judt, C., Li, H., Oakes, K. D., Servos, M. R., Andrews, D. M. 2010.** Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed, *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(1):79-89; DOI: 10.1002/etc.27.
- Milne, R. J., Goa, K. L. 1991.** Citalopram *Drugs* 41(3):450-477; DOI: 10.2165/00003495-199141030-00008.
- Minguez, L., Pedelucq, J., Farcy, E., Ballandonne, C., Budzinski, H., Halm-Lemeille, M. P. 2016.** Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France, *Environmental Science and Pollution Research International* 23(6):4992-5001; DOI: 10.1007/s11356-014-3662-5.
- Moermond, C. T., Kase, R., Korkaric, M., Ågerstrand, M. 2016.** CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(5):1297-1309; DOI: 10.1002/etc.3259.
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., Gwaltney-Brant, S. M. 2008.** Serotonin: a review, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31(3):187-199; DOI: 10.1111/j.1365-2885.2008.00944.x.
- Mohammadi, Z., Azarnia, M., Mirabolghasemi, G., Shiravi, A., Mohammadi, Z. 2013.** Histological changes in the liver of fetuses of pregnant rats following citalopram administration, *Indian Journal of Pharmacology* 45(5):517-521; DOI: 10.4103/0253-7613.117726.
- Mohammed, A. 2013.** Why are Early Life Stages of Aquatic Organisms more Sensitive to Toxicants than Adults?, In: **Gowder, S. J. T.**, New Insights into Toxicity and Drug Testing, *IntechOpen*; DOI: 10.5772/55187.
- Molony, B. 2001.** Environmental requirements and tolerances of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown trout (*Salmo trutta*) with special reference to Western Australia: A review, *Fisheries Research Report, Department of Fisheries, Western Australia*, 130, ISBN: 0 7309 8458 3.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., Moon, T. W. 1999.** Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation, *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9:211-268; DOI: 10.1023/A:1008924418720.
- Munari, M., Marin, M. G., Matozzo, V. 2014.** Effects of the antidepressant fluoxetine on the immune parameters and acetylcholinesterase activity of the clam *Venerupis philippinarum*, *Marine Environmental Research* 94:32-37; DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.11.007.
- Nash, J. P., Kime, D. E., Van der Ven, L. T., Wester, P. W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C. R. 2004.** Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish, *Environmental Health Perspectives* 112(17):1725-1733; DOI: 10.1289/ehp.7209.

- Neumann, H., Csepregi, A., Evert, M., Malfertheiner, P. 2008.** Drug-Induced Liver Disease Related to Citalopram, *Journal of Clinical Psychopharmacology* 28(2):254-255; DOI: 10.1097/JCP.0b013e318167b8e1.
- Noble, S., Benfield, P. 1997.** Citalopram, *CNS Drugs* 8(5):410-431; DOI: 10.2165/00023210-199708050-00009.
- Nowakowska, K., Giebułtowiec, J., Kamaszewski, M., Adamski, A., Szudrowicz, H., Ostaszewska, T., Solarska-Dzięciołowska, U., Nałęcz-Jawecki, G., Wroczyński, P., Drobniowska, A. 2020.** Acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: Bioaccumulation, physiological and histological changes, *Comparative Biochemistry and Physiology* 229:108670; DOI: 10.1016/j.cbpc.2019.108670.
- Nunes, B., Gaio, A. R., Carvalho, F., Guilhermino, L. 2008.** Behaviour and biomarkers of oxidative stress in *Gambusia holbrooki* after acute exposure to widely used pharmaceuticals and a detergent, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(2):341-354; DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.12.006.
- Nunes, B., Campos, J. C., Gomes, R., Braga, M. R., Ramos, A. S., Antunes, S. C., Correia, A. T. 2015.** Ecotoxicological effects of salicylic acid in the freshwater fish *Salmo trutta fario*: antioxidant mechanisms and histological alterations, *Environ Sci Pollut Res Int* 22(1):667-678; DOI: 10.1007/s11356-014-3337-2.
- OECD. 2009.** Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, *OECD Publishing*, Paris; DOI: 10.1787/9789264076242-en. .
- OECD. 2019a.** Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, *OECD Publishing*, Paris; DOI: 10.1787/9789264069961-en.
- OECD. 2019b.** OECD Health Statistics 2019, <https://stats.oecd.org/> (17.06.2020).
- OGewV. 2016.** Verordnung zum Schutz der Oberflächengewässer (Oberflächengewässerverordnung = OGewV), *Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz*.
- Oggier, D. M., Weisbrod, C. J., Stoller, A. M., Zenker, A. K., Fent, K. 2010.** Effects of Diazepam on Gene Expression and Link to Physiological Effects in Different Life Stages in Zebrafish *Danio rerio*, *Environmental Science and Technology* 44:7685-7691; DOI: 10.1021/es100980r.
- OHITF. 2008.** One Health : A New Professional Imperative, Final Report, One Health Initiative Task Force, *American Veterinary Medical Association*; [https://www.avma.org/sites/default/files/resources/onehealth\\_final.pdf](https://www.avma.org/sites/default/files/resources/onehealth_final.pdf) (13.11.2020).
- Ojanguren, A. F., Braña, F. 2003.** Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout, *Journal of Fish Biology* 62:580-590; DOI: 10.1046/j.0022-1112.2003.00049.x.
- Oki, T., Kanae, S. 2006.** Global Hydrological Cycles and World Water Resources, *Science* 313(5790):1068-1072; DOI: 10.1126/science.1128845.
- Olsén, K. H., Ask, K., Olsén, H., Porsch-Hällström, I., Hallgren, S. 2014.** Reprint of "Effects of the SSRI citalopram on behaviours connected to stress and reproduction in Endler guppy, *Poecilia wingei*", *Aquatic Toxicology* 151:97-104; DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.02.011.

- Painter, M. M., Buerkley, M. A., Julius, M. L., Vajda, A. M., Norris, D. O., Barber, L. B., Furlong, E. T., Schultz, M. M., Schoenfuss, H. L. 2009.** Antidepressants at Environmentally Relevant Concentrations affect Predator Avoidance Behavior of Larval Fathead Minnows (*Pimephales promelas*), *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12):2677-2684; DOI: 10.1897/08-556.1.
- Parrott, J. L., Metcalfe, C. D. 2019.** Assessing the effects of environmentally relevant concentrations of antidepressant mixtures to fathead minnows exposed over a full life cycle, *Science of the Total Environment* 648:1227-1236; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.237.
- Pedrajas, J. R., Peinado, J., López-Barea, J. 1995.** Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers, *Chemico-Biological Interactions* 98:16; DOI: 10.1016/0009-2797(95)03651-2
- Pollock, B. G. 2001.** Citalopram: a comprehensive review, *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2(4):681-698; DOI: 10.1517/14656566.2.4.681.
- Porseryd, T., Kellner, M., Reyhanian Caspillo, N., Volkova, K., Elabbas, L., Ullah, S., Olsén, H., Dinnézt, P., Porsch Hällström, I. 2017.** Combinatory effects of low concentrations of 17alpha-ethinylestradiol and citalopram on non-reproductive behavior in adult zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology* 193:9-17; DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.10.001.
- Pyle, G., Ford, A. T. 2017.** Behaviour revised: Contaminant effects on aquatic animal behaviour, *Aquatic Toxicology* 182:226-228; DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.11.008.
- Rasmussen, G. H. 2018.** Population Dynamics of Juvenile Brown Trout (*Salmo trutta* L.), Recruitment, Mortality, Biological Production and Smolt Yield in Two Danish Baecks, In: **Lobon-Cervia, J. und Sanz, N.**, Brown Trout: Biology, Ecology and Management, *John Wiley & Sons Ltd*, Chichester; ISSN: 9781119268291.
- ratiopharm GmbH. 2019a.** Gebrauchsinformation: Information für Anwender. Venlafaxin-ratiopharm® 37,5 mg Hartkapseln, retardiert. Venlafaxin-ratiopharm® 75 mg Hartkapseln, retardiert. Venlafaxin-ratiopharm® 150 mg Hartkapseln, retardiert, *ratiopharm GmbH*, Ulm, [https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/pkg\\_insert/Venlafaxin-ratiopharm%C2%AE%2037%2C5%20mg%20Hartkapseln%2C%20retardiert.pdf?pzn=6767062](https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/pkg_insert/Venlafaxin-ratiopharm%C2%AE%2037%2C5%20mg%20Hartkapseln%2C%20retardiert.pdf?pzn=6767062) (17.06.2020).
- ratiopharm GmbH. 2019b.** Gebrauchsinformation: Information für Patienten. Citalopram-ratiopharm® 20 mg Filmtabletten, *ratiopharm GmbH*, Ulm, [https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/pkg\\_insert/Citalopram-ratiopharm%C2%AE%2020%20mg%20Filmtabletten.pdf?pzn=1409464](https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/pkg_insert/Citalopram-ratiopharm%C2%AE%2020%20mg%20Filmtabletten.pdf?pzn=1409464) (17.06.2020).
- Rault, M., Collange, B., Mazzia, C., Capowiez, Y. 2008.** Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion, *Soil Biology & Biochemistry* 40(12):3086-3091; DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.09.010.
- Regoli, F., Giuliani, M. E. 2014.** Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms, *Marine Environmental Research* 93:106-117; DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.07.006.
- Reuter, P. 2004.** Springer Lexikon Medizin, *Springer-Verlag GmbH*, Berlin, ISBN: 3-540-20412-1.
- Rocha, E., Monteiro, R. A. F., Pereira, C. A. 1994.** The liver of the brown trout, *Salmo trutta fario*: a light and electron microscope study, *Journal of Anatomy* 185:241-249; PMID: PMC1166753



- Rodrigues, A., Borges, F. O., Pissarra, V., Luisa Maulvault, A., Paula, J. R., Bispo, R., Rosa, R. 2019.** First indication of deleterious impacts in white-seabream larvae (*Diplodus sargus*) survival and behaviour following acute venlafaxine exposure, *Ecotoxicology* 28(6):612-618; DOI: 10.1007/s10646-019-02057-7.
- Rodriguez, E. d. L., Fanta, E. 1998.** Liver Histopathology of the Fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after Acute Exposure to Sublethal Levels of the Organophosphate Dimethoate 500, *Revista Brasileira de Zoologia* 15(2):441-450; DOI: 10.1590/S0101-81751998000200014
- Rosenberry, T. L. 1975.** Acetylcholinesterase, In: **Meister, A.**, Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, *John Wiley & Sons, Inc.*; ISSN: 0-471-59178-5.
- Rúa-Gómez, P. C., Püttmann, W. 2012a.** Occurrence and removal of lidocaine, tramadol, venlafaxine, and their metabolites in German wastewater treatment plants, *Environmental Science and Pollution Research International* 19(3):689-699; DOI: 10.1007/s11356-011-0614-1.
- Rúa-Gómez, P. C., Püttmann, W. 2012b.** Impact of wastewater treatment plant discharge of lidocaine, tramadol, venlafaxine and their metabolites on the quality of surface waters and groundwater, *Journal of Environmental Monitoring* 14(5):1391-1399; DOI: 10.1039/c2em10950f.
- Rupprecht, R., Baghai, T. C., Möller, H. J. 2004.** Neuentwicklungen in der Pharmakotherapie der Depression, *Nervenarzt* 75(3):273-280; DOI: 10.1007/s00115-003-1517-2.
- Saaristo, M., McLennan, A., Johnstone, C. P., Clarke, B. O., Wong, B. B. M. 2017.** Impacts of the antidepressant fluoxetine on the anti-predator behaviours of wild guppies (*Poecilia reticulata*), *Aquatic Toxicology* 183:38-45; DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.12.007.
- Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M. G., Brooks, B. W., Ehlman, S. M., McCallum, E. S., Sih, A., Sundin, J., Wong, B. B. M., Arnold, K. E. 2018.** Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife, *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* 285(1885); DOI: 10.1098/rspb.2018.1297.
- Saaristo, M., Lagesson, A., Bertram, M. G., Fick, J., Klaminder, J., Johnstone, C. P., Wong, B. B. M., Brodin, T. 2019.** Behavioural effects of psychoactive pharmaceutical exposure on European perch (*Perca fluviatilis*) in a multi-stressor environment, *Science of the Total Environment* 655:1311-1320; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.228.
- Sackerman, J., Donegan, J. J., Cunningham, C. S., Nguyen, N. N., Lawless, K., Long, A., Benno, R. H., Gould, G. G. 2010.** Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of *Danio rerio* Line, *International Journal of Comparative Psychology* 23(1):43-61; PMID: PMC2879659.
- Sanchez-Hernandez, J. C., Mazzia, C., Capowiez, Y., Rault, M. 2009.** Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications, *Comparative Biochemistry and Physiology* 150(4):503-511; DOI: 10.1016/j.cbpc.2009.07.009.
- Sanders, B. M. 1993.** Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective, *Critical Reviews in Toxicology* 23(1):49-75; DOI: 10.3109/10408449309104074.
- Schlüsener, M. P., Hardenbicker, P., Nilson, E., Schulz, M., Viergutz, C., Ternes, T. A. 2015.** Occurrence of venlafaxine, other antidepressants and selected metabolites in the Rhine catchment in the face of climate change, *Environmental Pollution* 196:247-256; DOI: 10.1016/j.envpol.2014.09.019.

- Schmieg, H., Burmester, J. K. Y., Kraus, S., Ruhl, A. S., Tisler, S., Zwiener, C., Köhler, H.-R., Triebkorn, R. 2020.** Interacting Effects of Polystyrene Microplastics and the Antidepressant Amitriptyline on Early Life Stages of Brown Trout (*Salmo trutta f. fario*), *Water* 12(9); DOI: 10.3390/w12092361.
- Schmitz, N., Laverty, S., Kraus, V. B., Aigner, T. 2010.** Basic methods in histopathology of joint tissues, *Osteoarthritis and Cartilage* 18(3):113-116; DOI: 10.1016/j.joca.2010.05.026.
- Schueler, Y. B., Koesters, M., Wieseler, B., Grouven, U., Kromp, M., Kerekes, M. F., Kreis, J., Kaiser, T., Becker, T., Weinmann, S. 2011.** A systematic review of duloxetine and venlafaxine in major depression, including unpublished data, *Acta Psychiatrica Scandinavica* 123(4):247-265; DOI: 10.1111/j.1600-0447.2010.01599.x.
- Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L. B., Blazer, V. S., Norris, D. O., Vajda, A. M. 2010.** Antidepressant Pharmaceuticals in Two U.S. Effluent-Impacted Streams: Occurrence and Fate in Water and Sediment, and Selective Uptake in Fish Neural Tissue, *Environmental Science and Technology* 44:1918-1925; DOI: 10.1021/es9022706.
- Schultz, M. M., Painter, M. M., Bartell, S. E., Logue, A., Furlong, E. T., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L. 2011.** Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows, *Aquatic Toxicology* 104(1-2):38-47; DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.03.011.
- Schwabe, U., Paffrath, D., Ludwig, W.-D., Klauber, J. 2019.** Arzneiverordnungsreport 2019, *Springer-Verlag GmbH*, Berlin, ISBN: 978-3-662-59045-4.
- Schwaiger, J. 2001.** Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors, *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8:231-240; DOI: 10.1023/A:1012954608541.
- Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., Negele, R. D. 2004.** Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout, *Aquatic Toxicology* 68(2):141-150; DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.03.014.
- Schwarz, S., Schmieg, H., Scheurer, M., Köhler, H.-R., Triebkorn, R. 2017.** Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta f. fario*, *Science of the Total Environment* 607-608:1026-1036; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.042.
- Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., Von Gunten, U., Wehrli, B. 2006.** The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems, *Science* 313:1072-1077; DOI: 10.1126/science.1127291.
- Schwarzenbach, R. P., Egli, T., Hofstetter, T. B., von Gunten, U., Wehrli, B. 2010.** Global Water Pollution and Human Health, *Annual Review of Environment and Resources* 35(1):109-136; DOI: 10.1146/annurev-environ-100809-125342.
- Sehonova, P., Hodkovicova, N., Urbanova, M., Örn, S., Blahova, J., Svobodova, Z., Faldyna, M., Chloupek, P., Briedikova, K., Carlsson, G. 2019.** Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians, *Environmental Pollution* 254(Pt A):112999; DOI: 10.1016/j.envpol.2019.112999.

- Shelford, V. E. 1917.** An experimental study of the effects of gas waste upon fishes with especial reference to stream pollution, *Illinois Natural History Survey Bulletin* 11:381-412; DOI: 10.21900/j.inhs.v11.363
- Sih, A. 1984.** The behavioral response race between predator and prey, *The American Naturalist* 123(1):143-150; DOI: 10.1086/284193.
- Sih, A., Englund, G., Wooster, D. 1998.** Emergent impact of multiple predators on prey, *Trends in Ecology & Evolution* 13(9):350-355; DOI: 10.1016/S0169-5347(98)01437-2.
- Sih, A. 2013.** Understanding variation in behavioural responses to human-induced rapid environmental change: a conceptual overview, *Animal Behaviour* 85(5):1077-1088; DOI: 10.1016/j.anbehav.2013.02.017.
- Smith, C. E., Williams, W. G. 1974.** Experimental Nitrite Toxicity in Rainbow Trout and Chinook Salmon, *Transactions of the American Fisheries Society* 103(2):389-390; DOI: 10.1577/1548-8659(1974)103<389:Entirt>2.0.Co;2.
- Smith, K. 2014.** A world of depression, *Nature* 515:180-181; DOI: 10.1038/515180a.
- Sollmann, T. 1906.** The effects of a series of poisons on adult and embryonic funduli, *American Journal of Physiology* 16(1):1-46; DOI: 10.1152/ajplegacy.1906.16.1.1.
- Sproul, O. J., Ryckman, D. W. 1961.** The Significance of Trace Organics in Water Pollution, *Journal Water Pollution Control Federation* 33(11):1188-1198.
- Stadlmann, S., Portmann, S., Tschopp, S., Terracciano, L. M. 2012.** Venlafaxine-induced Cholestatic Hepatitis *American Journal of Surgical Pathology* 36(11):1724-1728; DOI: 10.1097/PAS.0b013e31826af296.
- Stahl, S. M. 1998.** How to Appease the Appetite of Psychotropic Drugs, *Journal of Clinical Psychiatry* 59(10):500-501; DOI: 10.4088/jcp.v59n1001
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., Kalueff, A. V. 2012.** Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review, *Neuropharmacology* 62(1):135-143; DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.037.
- Subathra, S., Karuppasamy, R. 2007.** Toxic Effects of Copper on Bioenergetics and Growth Rates in Fingerlings and Adult Age of the Fish, *Mystus vittatus* (Bloch, 1794), *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 2(4):285-293; ISSN: 1816-4927.
- Sugimoto, H., Yamanish, Y., Iimura, Y., Kawakami, Y. 2000.** Donepezil Hydrochloride (E2020) and Other Acetylcholinesterase Inhibitors, *Current Medical Chemistry* 7(3):303-339; DOI: 10.2174/0929867003375191.
- Sundaram, R., Smith, B. W., Clark, T. M. 2015.** pH-dependent toxicity of serotonin selective reuptake inhibitors in taxonomically diverse freshwater invertebrate species, *Marine and Freshwater Research* 66(6); DOI: 10.1071/mf14015.
- Sutherland, W. J. 1996.** From Individual Behaviour to Population Ecology, *Oxford University Press*, Oxford, ISBN: 9780198549109.

- Thompson, W. A., Vijayan, M. M. 2020.** Environmental levels of venlafaxine impact larval behavioural performance in fathead minnows, *Chemosphere* 259:127437; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127437.
- Triebskorn, R., Casper, H., Heyd, A., Eikemper, R., Köhler, H.-R., Schwaiger, J. 2004.** Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicology* 68(2):151-166; DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.03.015.
- Triebskorn, R., Casper, H., Scheil, V., Schwaiger, J. 2007.** Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*), *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4):1405-1416; DOI: 10.1007/s00216-006-1033-x.
- Triebskorn, R., Telcean, I., Casper, H., Farkas, A., Sandu, C., Stan, G., Colărescu, O., Dori, T., Köhler, H.-R. 2008.** Monitoring pollution in River Mures, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish, *Environmental Monitoring and Assessment* 141(1-3):177-188; DOI: 10.1007/s10661-007-9886-9.
- Triebskorn, R., Schwarz, S., Köhler, H.-R., Berg, K., Jungmann, D., Frey, M., Oehlmann, J., Oetken, M. 2014.** From theory to reality – Evaluation of suitable organisms and test systems for the biomonitoring of pharmaceuticals. Part I: Literature review *Umweltbundesamt*, Dessau-Roßlau.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M. 2006.** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64(2):178-189; DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.
- Valenti, T. W., Gould, G. G., Berninger, J. P., Connors, K. A., Keele, N. B., Prosser, K. N., Brooks, B. W. 2012.** Human therapeutic plasma levels of the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) sertraline decrease serotonin reuptake transporter binding and shelter-seeking behavior in adult male fathead minnows, *Environmental Science and Technology* 46(4):2427-2435; DOI: 10.1021/es204164b.
- Vasskog, T., Berger, U., Samuelsen, P. J., Kallenborn, R., Jensen, E. 2006.** Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway, *Journal of Chromatography A* 1115(1-2):187-195; DOI: 10.1016/j.chroma.2006.02.091.
- Vijayan, M. M., Moon, T. W. 1992.** Acute Handling Stress Alters Hepatic Glycogen Metabolism in Food-Deprived Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49(11):7; DOI: 10.1139/f92-247.
- Vilcinskas, A. 2004.** Fische, Mitteleuropäische Süßwasserarten und Meeresfische der Nord- und Ostsee, *BLV Verlagsgesellschaft mbH*, München, ISBN: 3405158486.
- Völker, J., Mohaupt, V. 2016.** Die Wasserrahmenrichtlinie Deutschlands Gewässer 2015 *Umweltbundesamt*, Bonn.
- Wells, P. R., Pinder, A. W. 1996.** The respiratory development of atlantic salmon. I. Morphometry of gills, yolk sac and body surface, *Journal of Experimental Biology* 199:2725-2736; PMID: 9320637.
- Wendelaar Bonga, S. E. 1997.** The Stress Response in Fish, *Physiological Reviews* 77(3):591-625; DOI: 10.1152/physrev.1997.77.3.591.

- Westheide, W., Rieger, G. 2011.** Spezielle Zoologie. Teil 2: Wirbel- oder Schädeltiere, *Springer-Verlag GmbH*, Berlin, ISBN: 978-3-642-55435-3.
- WHO. 2019.** ATC/DDD Index 2020, [https://www.whooc.no/atc\\_ddd\\_index/](https://www.whooc.no/atc_ddd_index/) (18.06.2020).
- WHO. 2020.** Depression, <https://www.who.int/health-topics/depression> (17.06.2020).
- Wong, B. B. M., Candolin, U. 2014.** Behavioral responses to changing environments, *Behavioral Ecology* 26(3):665-673; DOI: 10.1093/beheco/aru183.
- Wu, M., Liu, S., Hu, L., Qu, H., Pan, C., Lei, P., Shen, Y., Yang, M. 2017.** Global transcriptomic analysis of zebrafish in response to embryonic exposure to three antidepressants, amitriptyline, fluoxetine and mianserin, *Aquatic Toxicology* 192:274-283; DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.09.027.
- Xie, Z., Lu, G., Li, S., Nie, Y., Ma, B., Liu, J. 2015.** Behavioral and biochemical responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to sertraline, *Chemosphere* 135:146-155; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.031.
- Yamabayashi, S. 1987.** Periodic acid- Schiff- Alcian Blue: a method differential staining of glycoproteins, *Histochemical Journal* 19:565-571; DOI: 10.1007/BF01687364.
- Yang, H., Lu, G., Yan, Z., Liu, J., Ma, B., Dong, H. 2017.** Biological effects of citalopram in a suspended sediment-water system on *Daphnia magna*, *Environmental Science and Pollution Research International* 24(26):21180-21190; DOI: 10.1007/s11356-017-9763-1.
- Yang, M., Qiu, W., Chen, J., Zhan, J., Pan, C., Lei, X., Wu, M. 2014.** Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline, *Aquatic Toxicology* 151:68-76; DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.12.029.
- Yuen, C. H., Pillay, N., Heinrichs, M., Schoepf, I., Schradin, C. 2016.** Personality traits are consistent when measured in the field and in the laboratory in African striped mice (*Rhabdomys pumilio*), *Behavioral Ecology and Sociobiology* 70(8):1235-1246; DOI: 10.1007/s00265-016-2131-1.
- Zhou, S., Di Paolo, C., Wu, X., Shao, Y., Seiler, T. B., Hollert, H. 2019.** Optimization of screening-level risk assessment and priority selection of emerging pollutants - The case of pharmaceuticals in European surface waters, *Environment International* 128:1-10; DOI: 10.1016/j.envint.2019.04.034.
- Zindler, F., Beedgen, F., Brandt, D., Steiner, M., Stengel, D., Baumann, L., Braunbeck, T. 2019.** Analysis of tail coiling activity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos allows for the differentiation of neurotoxicants with different modes of action, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 186:109754; DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109754.
- Zindler, F., Stoll, S., Baumann, L., Knoll, S., Huhn, C., Braunbeck, T. 2020a.** Do environmentally relevant concentrations of fluoxetine and citalopram impair stress-related behavior in zebrafish (*Danio rerio*) embryos?, *Chemosphere* 261:127753; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127753.

- Zindler, F., Tisler, S., Loerracher, A. K., Zwiener, C., Braunbeck, T. 2020b.** Norfluoxetine Is the Only Metabolite of Fluoxetine in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos That Accumulates at Environmentally Relevant Exposure Scenarios, *Environmental Science and Technology* 54(7):4200-4209; DOI: 10.1021/acs.est.9b07618.
- Zlatković, J., Todorović, N., Tomanović, N., Bošković, M., Djordjević, S., Lazarević-Pašti, T., Bernardi, R. E., Djurdjević, A., Filipović, D. 2014.** Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: a histopathological study, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 59:20-30; DOI: 10.1016/j.ejps.2014.04.010.
- Zwiener, C., Frimmel, F. H. 2004.** LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment technology--a critical review. Part II: Applications for emerging contaminants and related pollutants, microorganisms and humic acids, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(4):862-874; DOI: 10.1007/s00216-003-2412-1.

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

### **Kapitel I: Impact of the antidepressant citalopram on the behaviour of two different life stages of brown trout**

Michael Ziegler, Sarah Knoll, Heinz-R. Köhler, Selina Tisler, Carolin Huhn, Christian Zwiener and Rita Tribskorn

2020, *PeerJ* 8(e8765), DOI: [10.7717/peerj.8765](https://doi.org/10.7717/peerj.8765)

- 90 % der Planung und des experimentellen Designs
- 95 % der Versuchsdurchführung
- 100 % der Verhaltensanalysen
- 100 % der Cortisolanalysen
- 100 % der Statistischen Auswertung
- 80 % des finalen Manuskripts

### **Kapitel II: Behavioral and Developmental Changes in Brown Trout After Exposure to the Antidepressant Venlafaxine**

Michael Ziegler, Michel Banet, Rebecca Bauer, Heinz-R. Köhler, Sabine Stepinski, Selina Tisler, Carolin Huhn, Christian Zwiener, Rita Tribskorn

2021, *Frontiers in Environmental Science* 8(586584), DOI: [10.3389/fenvs.2020.586584](https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.586584)

- 90 % der Planung und des experimentellen Designs
- 95 % der Versuchsdurchführung
- 90 % der Verhaltensanalysen
- 100 % der Cortisolanalysen
- 100 % der Statistischen Auswertung
- 80 % des finalen Manuskripts

### **Kapitel III: Biochemical and cellular biomarkers in brown trout (*Salmo trutta f. fario*) in response to the antidepressants citalopram and venlafaxine**

Michael Ziegler, Helene Eckstein, Heinz-R. Köhler, Shannon Ottmann, Lukas Reinelt, Sabine Stepinski, Rita Triebskorn

2020, *Environmental Sciences Europe* 32(158), DOI: [10.1186/s12302-020-00437-z](https://doi.org/10.1186/s12302-020-00437-z)

- 90 % der Planung und des experimentellen Designs
- 95 % der Versuchsdurchführung
- 40 % der biochemischen Analysen
- 60 % der histologischen Auswertung
- 100 % der statistischen Auswertung
- 90 % des finalen Manuskripts

**Kapitel I – III:** Die Projektanträge wurden von Prof. Dr. Rita Triebskorn formuliert sowie die Betreuung aller durchgeführten Arbeiten und Korrektur der Erstversionen der Publikationen. Prof. Dr. Heinz-R. Köhler half ebenfalls beim Verbessern der Publikationen. Die Probennahmen erfolgten in Zusammenarbeit mit Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Physiologische Ökologie der Tiere. Die Analysen der Antidepressiva Konzentrationen der Wasserproben wurden von Dr. Selina Tisler und Rebecca Bauer unter Betreuung von Prof. Dr. Christian Zwiener durchgeführt. Die Analysen der Antidepressiva Konzentrationen der Gewebeproben der Bachforellen wurden von Sarah Knoll und Michel Banet unter der Betreuung von Prof. Dr. Carolin Huhn durchgeführt. Dr. Selina Tisler, Sarah Knoll, Rebecca Bauer und Michel Banet verfassten die Teile zur Chemischen Analytik der Publikationen aus Kapitel I und Kapitel II. Im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten, arbeiteten Lukas Reinelt, Sabine Stepinski, Helene Eckstein und Shannon Ottmann mit. Die histologischen Auswertungen, sowie der Stressproteingehalt und die B-Esterasen-Aktivität des Versuchs mit juvenilen Bachforellen und Citalopram wurden von Lukas Reinelt durchgeführt. Der Aufenthalt der Bachforellenlarven bei 11 °C sowie die B-Esterasen-Aktivität des Versuchs mit Bachforellenlarven und Venlafaxin wurden von Sabine Stepinski analysiert. Helene Eckstein führte die Stressproteinanalysen sowie die Analyse der B-Esterasen-Aktivität von juvenilen Bachforellen mit Venlafaxin durch. Shannon Ottmann analysierte die histologischen Proben sowie Teile der SOD-Aktivität des Versuchs mit Bachforellenlarven und Venlafaxin. Alle weiteren Arbeiten im Rahmen dieser Arbeit erfolgten in Eigenarbeit.



#### **Kapitel IV: The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection**

Alex T. Ford, Marlene Ågerstrand, Bryan Brooks, Joel Allen, Michael G. Bertram, Tomas Brodin, ZhiChao Dang, Sabine Duquesne, René Sahm, Frauke Hoffmann, Henner Hollert, Stefanie Jacob, Nils Klüver, Jim Lazorchak, Mariana Ledesma, Steve Melvin, Silvia Mohr, Stephanie Padilla, Gregory Pyle, Stefan Scholz, Minna Saaristo, Els Smit, Jeffery A Steevens, Sanne van den Berg, Werner Kloas, Bob B.M. Wong, Michael Ziegler, Gerd Maack

2021, Environmental Science & Technology, DOI: [10.1021/acs.est.0c06493](https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06493)

- Teilnahme am Workshop „The behaviour of non-target organism after exposure to chemicals“ vom 30. Oktober – 1. November am Umweltbundesamt, Dessau, Deutschland
- Mitentwicklung des Konzepts des Manuskripts
- Korrektur der Manuskriptentwürfe, Bestätigung des finalen Manuskriptentwurfs

## Teil 3: Wissenschaftliche Arbeiten

### Kapitel I:

#### Impact of the antidepressant citalopram on the behaviour of two different life stages of brown trout

Michael Ziegler<sup>1</sup>, Sarah Knoll<sup>2</sup>, Heinz-R. Köhler<sup>1</sup>, Selina Tisler<sup>3</sup>, Carolin Huhn<sup>2</sup>, Christian Zwiener<sup>3</sup> and Rita Triebkorn<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Animal Physiological Ecology, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, Baden-Württemberg, Germany

<sup>2</sup> Effect-based Environmental Analysis, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, Baden-Württemberg, Germany

<sup>3</sup> Environmental Analytical Chemistry, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, Baden-Württemberg, Germany

<sup>4</sup> Steinbeis Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Rottenburg, Baden-Württemberg, Germany

PeerJ 8(e8765), DOI: [10.7717/peerj.8765](https://doi.org/10.7717/peerj.8765)

### Abstract

**Background.** Over the last two decades, there has been a constant increase in prescription rates of antidepressants. In parallel, neuroactive pharmaceuticals are making their way into aquatic environments at increasing concentrations. Among the antidepressants detected in the environment citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor, is one of the most commonly found. Given citalopram is specifically designed to alter mood and behaviour in humans, there is growing concern it can adversely affect the behaviour on non-target wildlife

**Methods.** In our study, brown trout were exposed to citalopram (nominal concentrations: 1, 10, 100, 1000 µg/L) in two different life stages. Larvae were exposed at 7 and 11 °C from the eyed ova stage until 8 weeks post yolk sac consumption, and juvenile brown trout were exposed for 4 weeks at 7 °C. At both stages we measured mortality, weight, length, tissue citalopram concentration, behaviour during exposure and behaviour in a stressful environment. For brown trout larvae additionally hatching rate and heart rate and for juvenile brown trout the tissue cortisol concentration were assessed.

**Results.** During the exposure, both larvae and juvenile fish exposed to the highest test concentration of citalopram (1 mg/L) had higher swimming activity and spent longer in the upper part of the aquaria compared to control fish, which is an indicator for decreased anxiety. Most probably due to the higher swimming activity during the exposure, the juveniles and larvae exposed to 1 mg/L citalopram showed decreased weight and length. Additionally, in a stressful artificial swimming

measurement device, brown trout larvae displayed the anxiolytic effect of the antidepressant by reduced swimming activity during this stress situation, already at concentrations of 100 µg/L citalopram. Chemical analysis of the tissue revealed rising citalopram tissue concentrations with rising exposure concentrations. Tissue concentrations were 10 times higher in juvenile fish compared to brown trout larvae. Fish plasma concentrations were calculated, which exceeded human therapeutic levels for the highest exposure concentration, matching the behavioural results. Developmental parameters like hatching rate and heart rate, as well as mortality and tissue cortisol content were unaffected by the antidepressant. Overall, we could trace the pharmacological mode of action of the antidepressant citalopram in the non-target organism brown trout in two different life stages.

**Subjects:** Animal Behavior, Aquaculture, Fisheries and Fish Science, Ecotoxicology, Freshwater Biology

**Keywords:** Pharmaceutical, Citalopram, Antidepressant, Behaviour, Brown trout, Fish, Stress hormone, Cortisol

## Introduction

Pharmaceuticals like psychotropic drugs are widely distributed in the environment and can be found in most human-influenced surface waters and within most trophic levels, from algae to fish (Álvarez-Muñoz *et al.*, 2015; aus der Beek *et al.*, 2016). During the last decades, psychotropic drugs, especially antidepressants, increasingly detected in rivers and surface waters (Acuña *et al.*, 2015; Grabicova *et al.*, 2017; Hughes *et al.*, 2013; Schultz *et al.*, 2010) due to the increasing numbers of diagnosed mental disorders (Destatis, 2017) and the consequent rising numbers of antidepressant prescriptions (Schwabe & Paffrath, 2016). Within the group of antidepressant drugs, the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) make up the largest part of the prescription rates (Schwabe & Paffrath, 2016). Their mode of action is based on their binding to the serotonin transporter (SERT) in the presynaptic membrane, thereby inhibiting the reuptake of serotonin into the presynaptic neuron causing increased serotonin levels in the synaptic cleft (Hyttel, 1994). These 5-HT reuptake transporters are highly conserved in the animal kingdom and can be found in all phyla (Gunnarsson *et al.*, 2008; Verbruggen *et al.*, 2018). One of the most important antidepressants of the SSRI class is citalopram, which is the most prescribed antidepressant in Germany, with 306.8 million defined daily doses (DDD) in 2015 (Schwabe & Paffrath, 2016). Assuming a DDD of 20 mg per patient, this leads to a minimum consumption of 6.1 t/year in Germany alone.

Citalopram has been found in US surface waters in concentrations ranging from 4 ng/L to 219 ng/L (Schultz *et al.*, 2010). In different effluents of wastewater treatment plants, citalopram was found in

concentrations ranging from 44 ng/L to 431 ng/L (Himmelsbach *et al.*, 2006; Nödler *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014). Furthermore, surface water citalopram was detected at concentrations of up to 76 µg/L downstream of a wastewater treatment plant in India, close to Hyderabad and up to 840 µg/L in the effluent of a drug manufacturer (Fick *et al.*, 2009; Larsson *et al.*, 2007). In contrast environmental concentrations of other antidepressants like fluoxetine are lower within a range of 1 to 43 ng/L (Acuña *et al.*, 2015; Paíga *et al.*, 2016; Schultz *et al.*, 2010). With regard to the critical effect concentrations (CEC) published by Fick *et al.* (2010), it can be seen that citalopram has a very low CEC of 141 ng/L compared to other antidepressants like fluoxetine (CEC: 489 ng/L) or venlafaxine (CEC: 6112 ng/L). Despite the fact that citalopram is one of the most commonly prescribed antidepressants and is frequently detected in surface waters, most studies on the effects of SSRIs in fish were performed with other pharmaceuticals like fluoxetine (Airhart *et al.*, 2007; Foran *et al.*, 2004; Henry & Black, 2008; Martin *et al.*, 2017); as a result, there is a deficit in knowledge concerning the effects of citalopram in fish. At present, the impact of citalopram on fish have been mixed: Kellner *et al.* (2016) showed reduction in anxiety related behaviour indicated by an increase in the swimming activity in three-spined sticklebacks and a longer time spent in the upper part of the aquaria, caused by exposure to 1.5 µg/L citalopram for 21 days. In addition, anxiolytic effects like reduced freezing behaviour in the novel tank diving test and increased curiosity in the novel object test were observed after exposure to 15 and 1.5 µg/L of citalopram respectively for 21 days. Whereas, Kellner *et al.* (2017) exposed three-spined sticklebacks in a developmental stage for 30 days to 1.5 µg/L citalopram with a subsequent 120 days recovery phase and showed a reduced swimming activity in the novel tank diving test as well as increased aggressive behaviour. Though, neither freezing behaviour and latency or number of transitions spent in the upper half were influenced, which can be seen as no change in anxiety. But, Olsén *et al.* (2014) could show anxiolytic effects in the novel tank diving test, like reduced freezing behaviour and faster and longer time spent in the upper aquaria in Endler's guppies exposed to 2.3 and 15 µg/L of citalopram for 21 days. With regard to feeding behaviour, Kellner *et al.* (2015) showed that three-spined sticklebacks had reduced food intake when exposed to 0.15 µg/L citalopram for 21 days. But in contrast, Kellner *et al.* (2017) observed increased food intake in sticklebacks exposed to 1.5 µg/L citalopram for 30 days during developmental stages, and a subsequent 120 days recovery phase. Keysomi *et al.* (2013) also proved a decrease in plasma cortisol level in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to 5 µg/L citalopram for 10 days. Due to these diverse outcomes, it is important to assess different endpoints in different life stages to detect the diverse effects that citalopram can have on aquatic organisms. In our case, two life stages of the native fish species brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) were chosen because of the species' sensitivity and high ecological relevance in central Europe (Klemetsen *et al.*, 2003). To assess the effects of citalopram on developmental parameters like mortality, time to hatch and heart rate, we exposed

brown trout eggs to citalopram at 7 and 11 °C for 5 months until 8 weeks post yolk consumption. Also, juvenile brown trout were exposed to citalopram for 4 weeks at 7 °C, and the apical endpoints mortality, weight and length were evaluated. The cortisol content of the juvenile fish was assessed. Cortisol is a glucocorticoid hormone which has various effects in fish like the regulation of hydro-mineral balance and energy metabolism (Wendelaar Bonga, 1997), and it can be used as an indicator of stress. In addition, in both experiments behavioural parameters were recorded during the exposure period. The preference of the fish to stay in the upper aquaria part in the exposure tanks was assessed and swimming behaviour in a stressful environment was recorded using an artificial swimming measurement device. The aim of this study was to evaluate effects of citalopram on developmental and behavioural endpoints. Furthermore, the study aimed at showing whether these effects occur under chronic exposure at environmentally relevant concentrations.

## Material and Methods

### *Fish*

Brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) eggs and juveniles were purchased from a trout farm in Southern Germany (Forellenzucht Lohmühle, Alpirsbach-Ehlenbogen, Germany). This commercial fish breeder is listed as category I (disease-free) according to the EC Council Directive (2006). The eggs were obtained in the eyed ova stage in December 2016 and directly transferred into the experiment. The juveniles were acclimatised to laboratory conditions for two weeks prior to exposure in a 200 L tank (filtered tap water, aerated) and exposed afterwards in August 2017. Fish were kept under a 10:14 light:dark regime and fed daily with commercial trout feed (0.8 mm, Inico Plus, Biomar, Brande, Denmark). All animals were approved by the animal welfare committee of the Regional Council of Tübingen, Germany (ZO 2/16).

### *Test Substance*

Citalopram hydrobromide ( $C_{20}H_{21}FN_2O \cdot HBr$ , CAS: 59729-32-7) was purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). It was dissolved in distilled water to obtain stock solutions of 100 mg/L and 1 mg/L citalopram. The citalopram concentrations refer to citalopram free base ( $C_{20}H_{21}FN_2O$ ). To achieve the respective nominal concentrations, test solutions were prepared with appropriate volumes of the equivalent stock solutions and aerated, filtered tap water (iron filter, active charcoal filter, particle filter).

### *Experiment with brown trout larvae*

Brown trout eggs in the eyed ova stage (37 days post fertilisation (dpf)) were exposed in a semi static setup with three replicate each of 0, 1, 10, 100, 1000 µg/L citalopram at both 7 °C or 11 °C, in order

to reveal influences of temperature on the effects investigated. Additionally, we had one tank in each of the three replicate blocks with 100 µg/L citalopram but without fish, which served as a control for ingestion, photolytic and microbial degradation of the chemical. Aquaria containing 10 L test solution and 30 fish each were set up in triplicate in a randomised order. Twice a week, 50 % of the test solution were replaced with freshly prepared test solution. A 10:14 light:dark cycle was set and the tanks were covered with black foil to protect them from direct light. Fish were fed daily (0.5 mm, 0.8 mm, Inico Plus, Biomar, Brande, Denmark) from the day the yolk-sac was consumed (for 7 °C: 52 d post hatch; for 11 °C: 35 d post hatch) with a defined amount of food (3 % body weight) adjusted to the developmental state of the fish. Exposure ended 8 weeks (total exposure time 7 °C: 135 d; 11 °C: 107 d) after yolk-sac consumption. During the exposure, time to hatch and mortality were recorded daily. At 7 days post-hatch, the heart rate of 5 individuals of each control and the highest concentration tank was measured and, whenever a difference was revealed, the other treatments were also assessed. Two weeks before sampling, pictures of the photographable tanks were taken on a daily basis to assess the number of fish in the upper and lower aquaria part during exposure. One week before the last sampling, the swimming behaviour was recorded using an artificial swimming measurement device (ASMD). Here, 5 fish from each tank were transferred into small glass aquaria and swimming behaviour was recorded for 18 min. Terminally, fish were sampled 8 weeks after yolk sac consumption. When sampling took place, the fish were anaesthetised by an overdose of the fish anaesthetic MS222 (tricaine mesylate, 1 g/L, buffered with NaHCO<sub>3</sub>) followed by a cervical spine cut. After individual determination of the weight and the total length fish were dissected, and tailfins were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for further analysis of citalopram tissue content. Water conditions (temperature, conductivity, pH, oxygen content) were tested at the beginning, twice during the experiment and at the end.

### *Experiment with juvenile brown trout*

Juvenile brown trout (8 months post hatch) were exposed at 7 °C in a semi-static three block setup to 0, 1, 10, 100, 1000 µg/L citalopram for 28 days. The treatments were setup in triplicate in a randomised order in aquaria containing 15 L of the test solution and 10 fish each. Twice a week, 50 % of the test solution were renewed. The test was conducted under a 10:14 light:dark regime at 7 °C, and the tanks were covered with black foil to protect them from direct light. Fish were fed daily with a defined amount (3 % body weight) of commercial trout feed (0.8 mm, Inico Plus, Biomar, Brande, Denmark). Mortality was recorded daily. From two weeks before the sampling took place until the end of the experiment, daily pictures of the photographable tanks were taken to assess the number of fish in the upper and lower aquaria portion during the exposure. In addition, three fish from each tank were used for swimming behaviour measurements in the artificial swimming measurement

device (ASMD) explained further below and sampled afterwards. At the end of the experiment, 7 of the 10 fish per tank were anaesthetised and killed by an overdose of the fish anaesthetic, MS222 (Tricaine mesylate, 1 g/L, buffered with NaHCO<sub>3</sub>) followed by a cervical spine cut. Prior to dissection, the weight and total length of fish were determined. The dorsal part and tailfin of the fish were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for further analysis of cortisol and citalopram tissue content. Water conditions were tested at the beginning and end of the experiment, and water samples for chemical analyses were taken right before the start of the experiment, after 2 weeks and at the end of the experiment.

### *Chemical analyses*

Water samples were taken at the beginning, in the course and at the end of the experiments. Sampling during the exposure period took place regularly before and after water exchange. Water samples from triplicate aquaria were pooled and stored at -20 °C until further processing. For tissue analysis, at the end of the experiments, tailfin samples of the fish were taken to determine the citalopram concentration in the muscle.

### *Water analysis*

The real water concentrations were determined using LC-MS with a 1290 Infinity HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and a triple quadrupole mass spectrometer (6490 iFunnel Triple Quadrupole LC/MS, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) in ESI (+) mode. An Agilent Poroshell-120-EC-C18 column (2.1 × 100 mm; 2.7 µm particle size) was used at a flow rate of 0.4 mL/min for separation, and column temperature was maintained at 40 °C. Eluent A and B were water (+0.1 % formic acid) and acetonitrile (+0.1 % formic acid), respectively. Gradient elution was used: 0-1 min 5 % B, linear increase to 100 % B within 7 min, hold for 7 min at 100 % B. After switching back to the starting conditions, a reconditioning time of 3 min was employed. Samples were kept in the autosampler at 10 °C. The injection volume was 1 or 10 µL (dilution factor 0-100). The limit of detection of citalopram (mass transition m/z 325→109) for undiluted samples was 10 ng/L (10 µL injection volume). Further details on the operating parameters of the triple quadrupole are provided in the supplement.

### *Tissue analysis*

The citalopram concentrations in the tissues of brown trout larvae and juveniles were determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). For sample extraction, a miniaturised and optimised QuEChERS procedure was applied. Fish samples (tailfin samples containing mainly muscle tissue) originating from all exposure concentrations were analysed. For each exposure group, tissue samples of 10 individuals per treatment were pooled. Frozen fish samples (-20 °C) were first

homogenised by grinding using a mortar and pestle under liquid nitrogen. Aliquots of the homogenised samples were transferred to an Eppendorf tube, and 0.25 mL acetonitrile and 0.75 mL water were added. For extraction, samples were shaken with a vortex device for 30 sec., after which 30 mg sodium chloride and 120 mg anhydrous magnesium sulfate were added; and the sample was immediately shaken for 30 s. After centrifugation for 15 min at 13,000 rpm, 0.1 mL of the acetonitrile phase were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen and the concentrated residue was resolved in 0.3 mL methanol. The extracts were diluted to reach concentrations compatible with the calibration range established for citalopram, and filtered for LC-MS analysis. Matrix matched calibration was performed between 1 and 20 µg/L. The limit of detection was 0.06 ng/g. Further details can be found in the supplementary material.

All analyses were performed using a 1260 Infinity LC system coupled to a 6550 iFunnel QTOF mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany and Santa Clara, CA, USA) with an electrospray ionisation source (ESI). Aliquots of 10 µL sample were injected onto a Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1 × 150 mm; 3.5 µm particle size, narrow bore, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) at a column temperature of 40 °C. A gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min using water and methanol, containing 0.1 % formic acid, was used. Details on the LC-MS method are given in the supplementary material.

### *Swimming behaviour in exposure aquaria*

For quantification of the swimming behaviour during the exposure, photos of tanks were taken and the number of fish in the upper and lower aquaria part was counted. This was only possible for some aquaria (8 of 15 for brown trout larvae, 9 of 15 for juvenile brown trout) due to their position in the climate chamber. Nevertheless, the selection of photographable tanks was representative for the entire number of aquaria, because for control and the highest treatment at least 2 tanks were photographed. Pictures were taken with a Panasonic DMC-TZ56 camera 5 min after the black foil cover was removed; a white sheet of paper was placed in the back of the aquarium to provide a bright background for better contrast. For experiments with brown trout larvae, 3 pictures were taken per day of each photographable tank at an interval of 5 min, from one-week prior to the experiment until sampling (Apr 03 – Apr 13, 2017). In the juvenile brown trout experiment, 3 pictures were taken every day of each photographable tank at an interval of 5 min, from two weeks before sampling until sampling (Aug 21 – Sep 03, 2017). The pictures were analysed manually and the number of fish located in the lower and upper half of the aquaria was recorded. Data for all pictures taken from one tank on the same day were averaged.



### *Artificial swimming measurement device (ASMD)*

The recording of the brown trout larvae took place one week before the second sampling of the fish. Small aquaria (17 × 17 × 8.5 cm) were filled with 500 mL of the respective test solution at an appropriate temperature, and five brown trout larvae were placed in there. The testing of juvenile fish was scheduled after the sampling, where the swimming behaviour of the three leftover juvenile brown trout from each tank was recorded. One litre of the respective test solution was added to the small aquaria, before the three juvenile fish were transferred to them and recorded. Each of the four small aquaria was equipped with a camera (Basler acA 1300-60 gm, 1.3 MP resolution, Basler AG, Ahrensburg, Germany, lens: 4.5 – 12.5 mm; 1:1.2; IR 1/2") placed 32 cm above the water surface. The set-up was arranged on a table in the climate chamber and enclosed by white polystyrene plates on each side and on top. Inside the enclosure, 4 lamps (2700 K, 1521 lm each) were placed, one in each corner facing the top polystyrene plate to obtain indirect illumination. The bright illumination, lack of aeration of the ASMD-aquaria and the transfer process of the fish led to stressful conditions for them. Locomotion was recorded for 20 min, but the first 2 min were ignored to account for acclimatisation. During the remaining 18 min, video sequences were taken and each of the four aquaria was analysed individually. Fish were centre-point tracked individually, and the total distance moved, the average velocity and the time of no movement were logged with the EthoVision 12 XT (Noldus Information Technology by, Wageningen, Netherlands). A manual correction of some of the tracked data was essential due to difficulties in automatic tracking.

### *Cortisol content*

Cortisol content was determined in juvenile brown trout exposed under stressful conditions in the ASMD as well as in fish not exposed to such stress. The cortisol content was measured with the commercially available Fish cortisol ELISA Kit by Cusabio Technology LCC (Houston, Texas, USA). The dorsal parts (muscle and kidney tissue) of juvenile brown trout were manually homogenised in 1xPBS buffer (tissue/buffer ratio 1:11 w/v) with a pestle. After 2 freeze-thaw cycles at -20 °C and room temperature, the samples were centrifuged ( $5,000 \times g$ , 5 min, 4 °C) and the supernatant stored at -20 °C until analysis. Before pipetting the assay, the supernatant was diluted with sample buffer provided in the Kit (supernatant/buffer ratio 1:10 v/v). The assay was conducted in a pre-coated 96 well plate provided by the manufacturer. Each well contained 50 µL antibody and either 50 µL of standard or 50 µL of sample, before being incubated for 40 min at 37 °C. After 3 washing cycles with washing buffer, 100 µL of HRP-conjugate was added and incubated for 30 min at 37 °C. Following 5 washing cycles with washing buffer, 90 µL of TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine) substrate were added and incubated for 20 min at 37 °C. Then, 50 µL of stop solution were added to each well and the plate was measured photometrically at 450 nm and for wavelength correction at

570 nm. Concentrations were calculated with blanked and wavelength corrected data to a four parameter logistic standard curve fit. Concentrations of cortisol are expressed in ng/mL (see Table 1).

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed with SAS JMP 14 and R 3.5.0 (packages: lme4). Mortality and time to hatch were analysed by nested Cox proportional hazards model, using replicate aquaria as a nested factor. Length, weight and total distance moved of the ASMD were analysed by a nested ANOVA, using replicate aquaria as nested factor, and a post hoc Dunnett's test. If necessary, data were transformed to achieve normal distribution and homogeneity of variance. If no normal distribution could be achieved, data were evaluated with a nonparametric Kruskal-Wallis test post-hoc Steel method with control. The difference in cortisol content, mean velocity and no movement offer time of the ASMD was analysed with a Linear Mixed Model with replicate as random factor and subsequently post-hoc Dunnett's test. Data for swimming behaviour during the exposure were evaluated with a Generalized Linear Mixed Model (binomial distribution, aquarium identity as random factor) and subsequently post-hoc Dunnett's Test. The  $\alpha$ -level was set to 0.05. Comparison of the results for different climate chambers was only descriptive to prevent the problem of pseudo-replication due to missing climate chamber replicates. Statistical details are given in the supplementary material.

### *Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data (CRED)*

Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data (CRED) are given in the Supplemental Information (Moermond *et al.*, 2016). CRED is important to improve the reproducibility, relevance and transparency of aquatic ecotoxic research between the different institutions (Moermond *et al.*, 2016).

## Results

### *Water conditions*

Temperature, conductivity, pH and oxygen content were measured at the beginning and end of both experiments. In the brown trout larvae experiment, water quality parameters were assessed at 2 additional time points (18.01.2017, 06.03.2017). All water quality parameters were in an acceptable range (brown trout larvae: mean temperature 7 °C:  $7.1 \pm 0.32$  °C; 11 °C:  $10.47 \pm 0.24$  °C; mean conductivity 7 °C:  $472.6 \pm 9.9$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; 11 °C:  $478.3 \pm 7.2$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; mean pH 7 °C:  $8.08 \pm 0.41$ ; 11 °C:  $7.96 \pm 0.46$ ; mean oxygen content 7 °C:  $10.77 \pm 0.3$  mg/L; 11 °C:  $9.94 \pm 0.5$  mg/L; juvenile brown trout: mean temperature:  $7.15 \pm 0.41$  °C; mean conductivity:  $493.7 \pm 17.5$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; mean pH:  $8.09 \pm 0.01$ ; mean oxygen content:  $11.22 \pm 0.1$  mg/L). Further details are given in the supplementary materials.

### *Chemical analyses*

Regarding water analysis, citalopram could not be detected in any of the control samples. In most of the treatments, aqueous citalopram concentrations measured were lower than nominal concentrations, except for the treatments with the highest concentrations in the brown trout larvae experiment and the exposure at 1  $\mu\text{g}/\text{L}$  of the juvenile brown trout experiment. The recovery rate was about 80 %. The citalopram concentrations in the controls for photolytic and microbial degradation were slightly higher ( $79.84 \pm 2.50$   $\mu\text{g}/\text{L}$ ) than in the 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  exposure tank ( $70.50 \pm 11.11$   $\mu\text{g}/\text{L}$ ). Overall, the measured citalopram concentrations in water samples were in good accordance with the nominal concentrations (Table 1). Further details on water concentrations are given in the supplementary materials. Regarding biota analysis, citalopram determined in tissue samples was in the  $\mu\text{g}/\text{g}$  range. Citalopram could not be detected in the muscle tissue of brown trout in any of the control samples. Tissue concentrations of citalopram were shown to correlate with water concentrations with the highest values in fish exposed to 1000  $\mu\text{g}/\text{L}$  citalopram. Tissue concentrations of brown trout larvae exposed at 7 °C were higher than those of brown trout larvae exposed at 11 °C. Juvenile brown trout accumulated at least 20 times more citalopram in muscle tissue than brown trout larvae.

## Experiment with brown trout larvae

Table 1: Results for brown trout larvae exposed to citalopram.

Data are shown as arithmetical means  $\pm$  standard deviation

Asterisks represent significant differences to the respective control (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001).

Abbreviations: n.a., not assessed; dpf, days post-fertilisation; LoD, limit of detection

Temperature	11 °C					7 °C				
Treatment ( $\mu\text{g/L}$ )	0	1	10	100	1000	0	1	10	100	1000
Mortality (%)	26.67 $\pm$ 2.72	32.22 $\pm$ 1.57	28.89 $\pm$ 8.75	35.56 $\pm$ 4.16	22.22 $\pm$ 3.14	2.22 $\pm$ 3.14	4.44 $\pm$ 4.16	3.37 $\pm$ 2.72	6.74 $\pm$ 2.72	6.67 $\pm$ 2.72
Weight (g)	0.449 $\pm$ 0.139	0.484 $\pm$ 0.169	0.447 $\pm$ 0.140	0.487 $\pm$ 0.143	<b>0.306</b> $\pm$ <b>0.146</b> ***	0.327 $\pm$ 0.089	0.413 $\pm$ 0.113	0.335 $\pm$ 0.101	0.337 $\pm$ 0.091	<b>0.247</b> $\pm$ <b>0.066</b> ***
Length	3.76 $\pm$ 0.37	3.83 $\pm$ 0.42	3.73 $\pm$ 0.39	3.74 $\pm$ 0.40	<b>3.24 <math>\pm</math></b> <b>0.43</b> ***	3.33 $\pm$ 0.27	3.38 $\pm$ 0.32	3.30 $\pm$ 0.32	3.25 $\pm$ 0.28	<b>2.91 <math>\pm</math></b> <b>0.23</b> ***
Heart rate (bpm)	76 $\pm$ 3.74	n.a.	n.a.	n.a.	75 $\pm$ 4.52	49.93 $\pm$ 1.5	51.8 $\pm$ 3.19	49.2 $\pm$ 3.25	50 $\pm$ 3.03	49 $\pm$ 2.37
Time to hatch (dpf)	49.69 $\pm$ 0.93	49.64 $\pm$ 1.11	49.74 $\pm$ 1.02	49.22 $\pm$ 0.96	49.14 $\pm$ 0.84	59.38 $\pm$ 1.27	58.68 $\pm$ 1.65	59.07 $\pm$ 1.31	58.60 $\pm$ 1.31	59.38 $\pm$ 1.17
Aquaria photographed	2	n.a.	2	2	2	2	1	2	1	2
Fish in upper Aquaria half (%)	7.29 $\pm$ 11.11	n.a.	5.71 $\pm$ 10.36	10.68 $\pm$ 13.24	<b>66.52</b> $\pm$ <b>11.28</b> ***	0.14 $\pm$ 0.68	<b>2.3</b> $\pm$ <b>3.73</b> *	<b>2.65</b> $\pm$ <b>3.22</b> *	<b>1.3</b> $\pm$ <b>2.47</b>	<b>79.36</b> $\pm$ <b>7.19</b>
ASDM: total distance moved (cm)	2700 $\pm$ 1405	1987 $\pm$ 755	2501 $\pm$ 815	2252 $\pm$ 1353	<b>1133 <math>\pm</math></b> <b>1015</b> ***	2473 $\pm$ 1016	1591 $\pm$ 1045	1792 $\pm$ 1320	<b>1361</b> $\pm$ <b>1033</b> *	<b>568 <math>\pm</math></b> <b>697</b> ***
Aqueous citalopram concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	<LoD	0.97 $\pm$ 0.20	8.30 $\pm$ 1.17	65.74 $\pm$ 5.77	973.98 $\pm$ 180.64	<LoD	0.83 $\pm$ 0.27	8.74 $\pm$ 0.48	70.50 $\pm$ 11.11	1017.97 $\pm$ 125.84
Tissue citalopram concentration ( $\mu\text{g/g}$ ) (wet weight)	<LoD	0.07 $\pm$ 0.014	0.69 $\pm$ 0.1	1.57 $\pm$ 0.451	55.87 $\pm$ 12.972	<LoD	0.2 $\pm$ 0.042	0.97 $\pm$ 0.235	5.63 $\pm$ 2.0	142.15 $\pm$ 44.961

The mortality of brown trout larvae was not affected by citalopram (11 °C Cox Regression:  $df = 4$ ,  $\chi^2 = 4.2743$ ,  $p = 0.370$ ; 7 °C Cox Regression:  $df = 4$ ,  $\chi^2 = 6.9203$ ,  $p = 0.140$ ). However, the mortality of larvae exposed at 11 °C was higher in all treatments, including the controls, from day 51 to day 86 of exposure (43 d – 71 d post hatch) (11 °C mean mortality 29.11 %). The mortality of fish exposed to 7 °C ranged from 0 – 10 % (7 °C mean mortality 4.69 %). Also, time to hatch did not differ between treatments (11 °C: Cox Regression:  $df = 4$ ,  $\chi^2 = 0$ ,  $p = 1$ ; 7 °C: Cox Regression:  $df = 4$ ,  $\chi^2 = 2.42E-0.9$ ,  $p = 1$ ). The fish exposed at 11 °C hatched approximately 10 days earlier than fish exposed at 7 °C. The heart rate of brown trout larvae was not affected when exposed to 1000 µg/L citalopram at 11 °C (nested ANOVA:  $df = 1$ ,  $F = 0.3968$ ,  $p = 0.535$ ) and 7 °C (nested ANOVA:  $df = 4$ ,  $F = 2.6161$ ,  $p = 0.045$ ; post-hoc Dunnett's test no difference to control). The heart rate of the fish exposed at 11 °C was about 20 beats per minute higher on the average than in fish exposed at 7 °C. The weight and length of fish exposed to 1000 µg/L citalopram was significantly lower compared to the control at both temperatures (Table 1) (11 °C weight: nested ANOVA:  $df = 4$ ,  $F = 12.8137$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc Dunnett's test [0 µg/L|1000 µg/L]  $p < 0.001$ ; 11 °C length: nested ANOVA:  $df = 4$ ,  $F = 13.1786$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc Dunnett's test [0 µg/L|1000 µg/L]  $p < 0.001$ ; 7 °C weight: nested ANOVA:  $df = 4$ ,  $F = 9.7415$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc Dunnett's test [0 µg/L|1000 µg/L]  $p < 0.001$ ; 7 °C length: nested ANOVA:  $df = 4$ ,  $F = 22.0216$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc Dunnett's test [0 µg/L|1000 µg/L]  $p < 0.001$ ).

#### Swimming behaviour during exposure

We could show that citalopram had an effect on the stay of the fish in the upper half of the aquaria at both temperatures. Significantly more fish exposed to 1000 µg/L citalopram stayed close to the water surface compared to the control fish at both temperatures. Fish exposed to 1 and 10 µg/L citalopram concentrations at 7 °C stayed slightly more often in the upper half of the aquaria than control fish (Table 1) (11 °C: Generalized Linear Mixed Model,  $df = 4$ ,  $F = 12.4141$ , post-hoc Dunnett's [0 µg/L|1000 µg/L]  $p < 0.001$ ; 7 °C: Generalized Linear Mixed Model,  $df = 4$ ,  $F = 106.9664$ , post-hoc Dunnett's [0 µg/L|1 µg/L]  $p = 0.027$ , [0 µg/L|10 µg/L]  $p = 0.017$ , [0 µg/L|1000 µg/L]  $p < 0.001$ ).

#### ASMD

Overall, fish exposed at 11 °C swam further and faster in the ASMD than fish exposed at 7 °C. Furthermore, the citalopram treatments also revealed an effect on the total distance moved and the mean velocity during the recordings in the ASMD. Fish exposed to 1000 µg/L citalopram at 11 °C swam significantly less and slower than control fish (distance moved: nested ANOVA:  $df = 4$ ,  $F = 4.7551$ ,  $p = 0.002$ ; post-hoc Dunnett's test [0 µg/L|1000 µg/L]  $p = 0.001$ ). Also, fish exposed at 7 °C showed significantly less total distance moved and had a lower mean velocity when exposed to 100 µg/L or 1000 µg/L citalopram, compared to control fish (Table 1, Figure 1 A, D) (distance moved: nested ANOVA:  $df = 4$ ,  $F = 7.8214$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc Dunnett's test [0 µg/L|100 µg/L]  $p = 0.021$

[0 µg/L|1000 µg/L]  $p < 0.001$ ). Furthermore, it can be seen that control brown trout larvae have an increased time of no movement at the beginning of the experiment, which decreases overtime. Contrary mean velocity at the beginning of the experiment is lower and increases with time and has its peak at 12 min. In contrast brown trout larvae exposed to the highest treatment have a constant lower mean velocity over time and a constant longer time of no movement over recording time (Figure 1 B – C, E – F). Brown trout larvae exposed to 100 and 1000 µg/L at 7 °C show significant decreased mean velocity and increased time of no movement over time (mean velocity: Linear mixed model:  $df = 4;10$ ,  $F = 5.6897$ ,  $p = 0.012$ , post-hoc Dunnett's [0 µg/L|100 µg/L]  $p = 0.024$ , [0 µg/L|1000 µg/L]  $p < 0.001$ ; no movement: Linear mixed model:  $df = 4;10$ ,  $F = 5.4797$ ,  $p = 0.013$ , post-hoc Dunnett's [0 µg/L|100 µg/L]  $p = 0.041$ , [0 µg/L|1000 µg/L]  $p < 0.001$ ). Brown trout larvae exposed at 11 °C do not show significant difference, though a statistical trend is visible (mean velocity: Linear mixed model:  $df = 4;10$ ,  $F = 2.7222$ ,  $p = 0.091$ , no movement: Linear mixed model:  $df = 4;10$ ,  $F = 3.1072$ ,  $p = 0.066$ ).

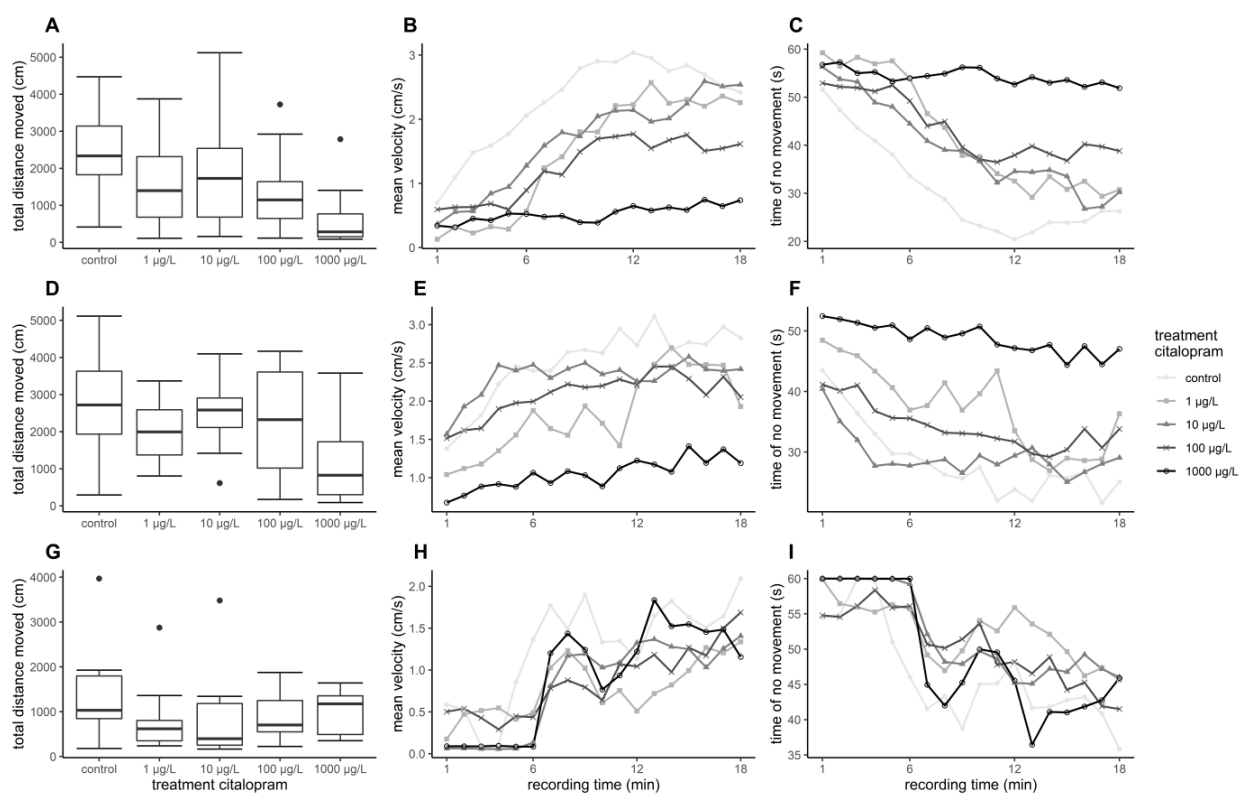


Figure 1: Results for brown trout in the ASMD. Results of total distance moved are shown as boxplot (A, D, G), Results of mean velocity (B, E, H) and time of no movement (C, F, I) are represented as dots, with depicted mean values over time. (A – C) Results for brown trout larvae exposed at 7 °C, (D – F) Results for brown trout larvae exposed at 11 °C, (G – I) Results for juvenile brown trout.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.8765/fig-1

## Experiment with juvenile brown trout

Table 2: Results for juvenile brown trout exposed to citalopram

Data are shown as arithmetical mean  $\pm$  standard deviation.

Asterisks indicate significant differences to the respective controls ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ ).

LoD, limit of detection.

Treatment ( $\mu\text{g/L}$ )	0	1	10	100	1000
Mortality (%)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Weight (g)	2.75 $\pm$ 0.84	2.85 $\pm$ 0.85	2.86 $\pm$ 1.16	2.74 $\pm$ 0.92	2.17 $\pm$ 0.53 *
Length (cm)	6.41 $\pm$ 0.65	6.59 $\pm$ 0.61	6.46 $\pm$ 0.71	6.50 $\pm$ 0.75	5.93 $\pm$ 0.49 *
Aquaria photographed	2	2	1	2	2
Fish in upper aquaria half (%)	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	25.42 $\pm$ 19.11 **
ASMD: total distance moved (cm)	1371 $\pm$ 1057	847 $\pm$ 785	874 $\pm$ 1004	939 $\pm$ 571	980 $\pm$ 473
Cortisol content in fish extract (ng/mL)	19.06 $\pm$ 14.80	15.51 $\pm$ 7.48	12.50 $\pm$ 9.58	20.76 $\pm$ 15.14	23.66 $\pm$ 17.81
Aqueous citalopram concentrations ( $\mu\text{g/L}$ )	<LoD	1.41 $\pm$ 0.22	9.20 $\pm$ 0.59	81.51 $\pm$ 2.39	864.93 $\pm$ 51.54
Tissue citalopram concentrations ( $\mu\text{g/g}$ ) (wet weight)	<LoD	8.2 $\pm$ 4.37	38.3 $\pm$ 30.71	340.63 $\pm$ 124.74	2966.83 $\pm$ 1556.77

No mortality occurred during the experiment. Weight and length were significantly lower in fish exposed to 1000  $\mu\text{g/L}$  citalopram compared to control fish (weight: nested ANOVA:  $df = 4$ ,  $F = 3.2964$ ,  $p = 0.001$ ; post-hoc Dunnett's test [0  $\mu\text{g/L}$  | 1000  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.023$ ; length: nested ANOVA:  $df = 4$ ,  $F = 4.6661$ ,  $p = 0.002$ ; post-hoc Dunnett's test [0  $\mu\text{g/L}$  | 1000  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.019$ ).

### Swimming during exposure

There was a strong effect of the highest citalopram concentration on the swimming behaviour of fish: About 25 % of the 1000  $\mu\text{g/L}$  citalopram-treated fish stayed in the upper half of the aquaria, in contrast to the control and other treatments, where no fish stayed in the upper aquaria part (Generalized linear mixed model,  $df = 4$ ,  $F = 7.3259$ , post-hoc Dunnett's [0  $\mu\text{g/L}$  | 1000  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.0011$ ) (Table 2).

### ASMD

In the artificial swimming measurement device, neither the total distance moved nor the mean velocity of the exposed fish differed significantly to the control (Table 2, Figure 1 G) (distance moved: nested ANOVA:  $df = 4$ ,  $F = 1.0846$ ,  $p = 0.382$ ; velocity: nested ANOVA:  $df = 4$ ,  $F = 1.0846$ ,  $p = 0.382$ ). Mean total distance moved and averaged mean velocity of the exposed fish were about 70 % of the

fish from the control; however, this was not significant. The behaviour pattern over time does not differ strongly between control and treated fish. At the beginning juvenile brown trout have a reduces mean velocity, which increases over time. Opposed to this time of no movement is decreasing over time (Figure 1 H – I). Statistical difference between exposed and control fish could not be revealed with regard to mean velocity and no movement over time (mean velocity: Linear mixed model:  $df = 4;10$ ,  $F = 0.4324$ ,  $p = 0.782$ ; no movement: Linear mixed model:  $df = 4;10$ ,  $F = 0.4902$ ,  $p = 0.743$ ).

#### Cortisol

Tissue cortisol concentrations did not differ between exposed and control fish. The citalopram exposed fish did not show significant differences between the treatments (Table 2, Figure 2) (Linear Mixed Model:  $df = 4,68.638$ ,  $F = 3.7625$ ,  $p = 0.008$ , post-hoc Dunnett's Test revealed no difference between control and treatments). However, there was a significant increase in tissue cortisol content in fish tested in the ASMD (mean cortisol content:  $26.66 \pm 18.57$ ) compared to fish not tested in the ASMD (mean cortisol content:  $15.22 \pm 10.16$ ) (Linear Mixed Model:  $df = 1,95.378$ ,  $F = 16.7132$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 2).



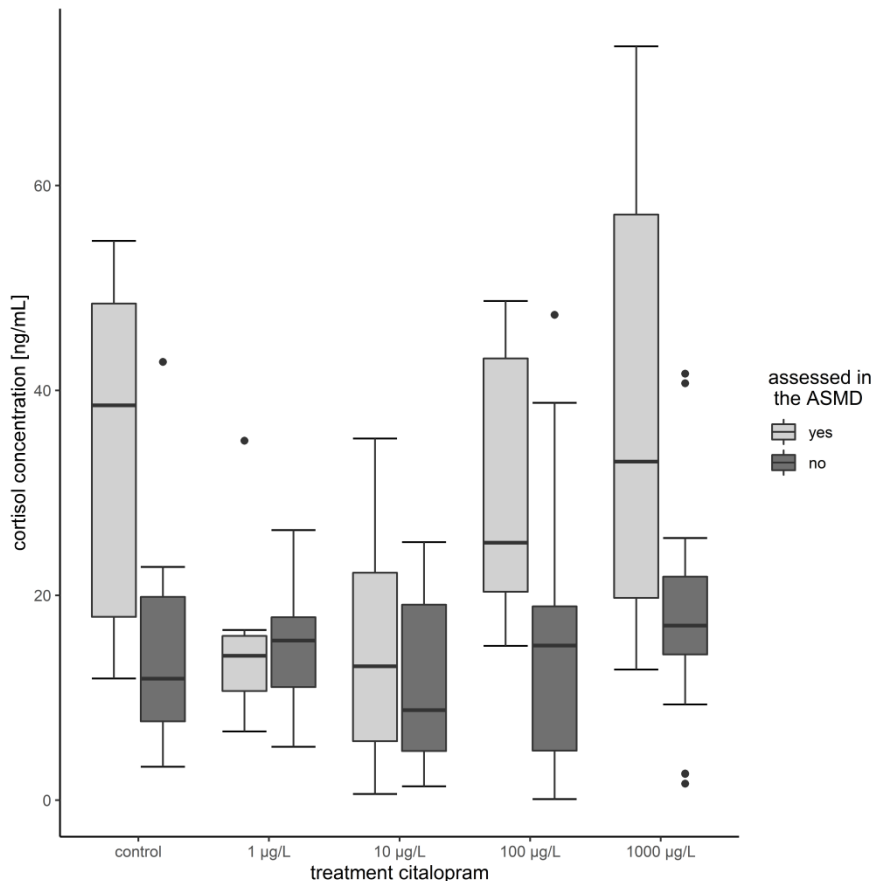


Figure 2: Cortisol content of juvenile brown trout. Cortisol content of the fish assessed in the ASMD compared to whose swimming behaviour was not assessed in the ASMD. Results are shown as boxplots.

Full-size DOI: 10.7717/peerj.8765/fig-2

## Discussion

This study shows that citalopram affects the swimming behaviour and growth of brown trout in different life stages. Effect concentrations were close to citalopram concentrations measured in wastewater effluents (Fick *et al.*, 2009; Larsson *et al.*, 2007; Nödler *et al.*, 2010; Vasskog *et al.*, 2006).

### *Bioconcentration*

It has been shown that citalopram can accumulate in the liver, kidney and brain of fish (Grabicova *et al.*, 2014; Grabicova *et al.*, 2017). In the present study, we analysed tail fin tissue samples (muscle) since all other organs were used for biomarker analyses. The obtained data made evident that even early life stages of brown trout but, more intensely, juveniles accumulate citalopram in their muscle tissue. In both life stages, citalopram tissue concentrations rose slightly with increasing exposure concentrations of 1 to 100 µg/L (Table 1 and Table 2). When comparing the aqueous with the tissue concentration there is a linear relationship between exposure concentrations and internal concentration (Supplemental material). Citalopram concentrations in fish exposed at 7 °C (135 days) were about 3 times higher than those in fish exposed at 11 °C (107 days), possibly due to the longer

exposure time of about 4 weeks. The muscle tissue concentration of juvenile brown trout was about 10 times higher than the muscle tissue concentration of brown trout larvae possibly based on a more intense citalopram uptake due to the ongoing development of the gastro-intestinal system and/or gills of larvae. Sackerman *et al.* (2010) showed a bioconcentration of  $115 \pm 37$  ng/g citalopram in the brain and  $193 \pm 33$  ng/g in the muscle tissue of zebrafish exposed to  $24.3$  µg/L for only 3 min. Brown trout exposed to an effluent-dominated stream (citalopram water concentrations:  $4.558$  ng/L) in the Czech Republic showed citalopram concentrations up to  $31 \pm 11$  ng/g in liver and  $164 \pm 19$  ng/g in kidney tissue; however, no citalopram could be detected in brain and muscle tissue (Grabicova *et al.*, 2017). Likewise, rainbow trout exposed to the effluent of a Swedish wastewater treatment plant (citalopram water concentration:  $260 \pm 60$  ng/L) had most citalopram in the liver and brain, with concentrations of  $12 \pm 5$  ng/g and  $2.2 \pm 1.3$  ng/g, respectively. In contrast, no citalopram was detected in plasma and muscle tissue (Grabicova *et al.*, 2014). The reason for finding citalopram being accumulated in muscle tissue in our study might either be due to the fact that the exposure time was longer and the test concentrations were higher than those used in other studies (Grabicova *et al.*, 2014; Grabicova *et al.*, 2017; Sackerman *et al.*, 2010) or result from a diverging accumulation pattern in brown trout compared to other fish species (Du *et al.*, 2016).

### *Mortality*

Mortality of larvae and juvenile fish was not influenced by citalopram exposure. Although the overall mortality increased to 29 % in brown trout larvae exposed at  $11$  °C. This higher mortality relates to the fact that brown trout larvae exposed to  $11$  °C had a higher metabolism and that the beginning of exogenous feeding in salmonids is associated with higher mortality risks (Klemetsen *et al.*, 2003). Also in a study by Kellner *et al.* (2016), in which sticklebacks have been exposed for 21 days to  $1.5$  and  $15$  µg/L citalopram, no differences in mortality were found. Likewise, time to hatch was not affected by citalopram. This is in accordance with other studies that did not reveal differences in hatching success and time for zebrafish or Japanese medaka exposed to the SSRI fluoxetine (Foran *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2017). With regard to the developmental parameter heart rate of brown trout larvae, no effect was seen in fish exposed to either temperature and any citalopram concentration corroborating finding for other SSRIs by Airhart *et al.* (2007), who exposed zebrafish larvae to  $1,39$  mg/L of the SSRI fluoxetine.

### *Fish growth*

In our experiment, we visually observed more food leftovers in the exposure tanks with  $1000$  µg/L citalopram, which allowed us to conclude that there was a lower food intake in fish exposed to  $1000$  µg/L citalopram; however, a quantification of this effect was not possible. Known side effects of citalopram are anorexia and weight loss in humans (Information of Hexal AG (2012)) and published

data on fish revealed a decreased food intake in sticklebacks exposed to 0.15 µg/L citalopram (Kellner *et al.*, 2015). Reduced food intake in fish was also shown for two other antidepressants, sertraline and fluoxetine, in European perch and goldfish (Hedgspeth *et al.*, 2014; Mennigen *et al.*, 2010). In contrast three-spined sticklebacks exposed for 30 days to 1.5 µg/L citalopram with a subsequent 185 days recovery phase showed increased attacks on a chironomid larvae (Kellner *et al.*, 2017). Mechanistically, the increased swimming activity and the conceivably decreased food intake of the fish make the observed decrease in weight and length of the fish exposed to 1000 µg/L citalopram is reasonable to result from exposure to citalopram, especially as exposed fish were in a period of intense growth. Decreased weight has also been shown in goldfish and decreased length in zebrafish exposed to 54 and 10 µg/L of the SSRI fluoxetine, respectively (Mennigen *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2017).

### *Behaviour during exposure*

Control brown trout preferably stayed at the bottom of the tank when kept in the exposure tanks (Table 1 and Table 2). Fish exposed to 1000 µg/L citalopram showed an increased preference for the upper half of the aquaria independent of their life stage. In general, the test design used in the present study for this parameter implies parts of the novel tank diving test, the scototaxis test and shoaling. Stewart *et al.* (2012) described the novel tank diving test for the measurement of anxiety, where single zebrafish are placed in tanks. Time spent in the upper aquaria portion is recorded along with other parameters like the number of transitions into the upper aquaria portion or number of freezing bouts. When the fish in a novel tank stay in the lower aquaria part (geotaxis) it is a sign for anxiety behaviour and in contrast the transition into the upper aquaria part is a sign of boldness and therefore anti-anxiety behaviour (Stewart *et al.*, 2012). Maximino *et al.* (2010) described the scototaxis test, where fish are transposed into a novel tank and can freely swim into the dark or bright zone. Preferring the dark part of the aquaria and avoiding the brighter side is a clear sign of anxiety (Maximino *et al.*, 2010). Furthermore, Stewart *et al.* (2012) described fish with lower anxiety to have a greater tendency to break away from the shoal in zebrafish. It is obvious that in our case swimming behaviour of the shoal of brown trout was assessed and not individual swimming behaviour. Therefore, the stressor not being in a shoal, like in the novel tank and scototaxis test is not present in our case. Additionally, brown trout were not transposed into novel tanks, but the tanks were covered the most of the exposure time with black foil, only when the photos were taken, the foil was removed, which lead to a higher illumination from the top. Overall an increased stay in the upper aquaria part is a preference for the brighter illuminated water column and water surface in contrast to the darker aquaria bottom. Additionally, these fish recede from the shoal at the bottom of the tank. In our experiments, up to 80 % brown trout larvae and 25 % of juveniles exposed to

1000 mg/L citalopram stayed in the upper aquaria section compared to the control animal. This can be explained by decreased anxiety and an altered swimming behaviour characterised by a higher activity of the exposed fish (Maximino *et al.*, 2010; Stewart *et al.*, 2012). The stronger effect of citalopram on the vertical distribution of the brown trout larvae can be explained by a 5 times longer exposure time compared to the juvenile individuals. Also, different sensitivities of the life stages can come into play, and has already been shown for diclofenac (Schwarz *et al.*, 2017). The significant difference in time spent in the upper aquaria part of the brown trout larvae exposed to 1 µg/L citalopram at 7 °C could also be due to the fact that only one of the three replicate aquaria was photographed and therefore a single individual has a higher impact on the relative number spent in the upper aquaria part. For this reason and the inherent variation in this setup for behaviour measurement the biological relevance of the slight effect in the 1 and 10 µg/L treatment has to be confirmed with a bigger sample size. An anxiolytic effect of citalopram in the novel tank test was also shown for other fish species like Endler's guppies, three-spined sticklebacks and zebrafish, even at decidedly lower concentrations of citalopram down to 1.5 µg/L, which all spent more time in the upper aquaria part during the novel tank test (Kellner *et al.*, 2016; Olsén *et al.*, 2014; Sackerman *et al.*, 2010). Furthermore, Kellner *et al.* (2017) discovered increased transitions to the bright side in sticklebacks exposed to 1.5 µg/L citalopram for 30 days with subsequent 120 days recovery phase. But latency to first transition and time spent in the brighter zone was not influenced. Also sticklebacks exposed did not show any difference to control fish in the novel tank test, except for decreased activity (Kellner *et al.*, 2017). Kellner *et al.* (2016) also observed increased swimming activity in fish exposed to 1.5 µg/L citalopram. This effect has not only been shown in response to citalopram but has also been found for other antidepressants like fluoxetine or amitriptyline, which seem to reduce anxiety and increase the stay of the fish in the upper part of the aquarium (Demin *et al.*, 2017; Henry & Black, 2008; Meshalkina *et al.*, 2018).

### *Behaviour in a stressful environment and cortisol measurements*

In contrast to the increased swimming activity under minor stress conditions, brown trout larvae exposed to citalopram showed a decreased swimming activity in the stressful artificial swimming measurement device (ASMD). This effect can be due to the anxiolytic and soothing effect of the antidepressant. Based on the measurements of the tissue cortisol level, it is evident that the ASMD creates a rather stressful environment for the fish (Figure 2) (Wendelaar Bonga, 1997). The transfer of fish into an ASMD leads to a stress reaction in larvae. This stress reaction is characterised by freezing behaviour at the beginning followed up by increased velocity and escape behaviour (Figure 1). Having a look on the time dependant velocity and time of no movement, it is clear that the control larvae are swimming faster and have reduced time of no movements over recording. In

contrast larvae exposed to 1 mg/L citalopram do not show this pattern, but have a constant low mean velocity and longer time of no movement over the total recording time. A similar pattern can be seen in fish exposed to 100 µg/L citalopram but not as distinct as in fish exposed to 1 mg/L. Since citalopram is an anxiolytic drug and reduces anxiety, fish are reasonably soothed when exposed to 100 µg/L or 1000 µg/L citalopram as they swam slower than control fish over the total recording time. Therefore, the total distance they moved and their mean swimming velocity were lower than that of the controls. Additionally, the time dependant behaviour pattern is not given in fish exposed to 1 mg/L citalopram. It is also possible the reduced mean velocity and increased time of no movement is due to a sedative effect of the antidepressant. Furthermore, it cannot be excluded, that the increased time of no movement of fish exposed to 1 mg/L citalopram represents freezing and therefore anxiogenic behaviour. Nevertheless, with regard to the results of the behaviour during the exposure, it is more likely that the effect is due to a reduction of anxiety in brown trout larvae which resulted in calmed behaviour. This reduction in activity due to citalopram in the ASMD could not be seen in juvenile fish. Neither total distance moved nor the pattern over time differed between the treatment and the control animals. Nevertheless, the total distance moved and the mean velocity of swimming in all citalopram-treated juveniles was 70 % lower than in controls, but these differences were not significant. Similar to the effect on citalopram on vertical distribution patterns during exposure, behavioral changes in the ASMD were more pronounced in exposed larvae than in juveniles. As previously mentioned this might be the result of the longer exposure of larvae or different sensitivities between life stages (Schwarz *et al.*, 2017). It has been reported previously that antidepressants reduce swimming activity. Three-spined sticklebacks exposed to 1.5 µg/L citalopram for 30 days at a developmental stage with subsequent 160 days recovery phase showed a decrease in swimming activity (Kellner *et al.*, 2017). Zebrafish embryos exposed to either 1 mg/L venlafaxine or 3 mg/L sertraline showed reduced swimming behaviour in the zebibox (Sehonova *et al.*, 2019). With regard to the sedative effect of antidepressants, for example, western mosquitofish exposed to 0.5 µg/L fluoxetine over 91 days showed increased lethargy similar to fish exposed to 53 µg/L for 7 days (Henry & Black, 2008). Furthermore, guppies exposed to 16 ng/L fluoxetine for 28 days showed increased freezing time and time spent under cover (Saaristo *et al.*, 2017). Male bluehead wrasse injected intraperitoneal with 6 µg/g bw fluoxetine showed decreased activity levels (Perreault *et al.*, 2003). But also meagre exposed to 20 µg/L venlafaxine showed reduced swimming activity (Maulvault *et al.*, 2018). But it could also be shown that antidepressants reduces anxiety in exposed fish: Painter *et al.* (2009) showed a decreased escape behaviour in fathead minnow larvae exposed to 250 ng/L of the SSRI fluoxetine, resulting in reduced swimming velocity. Likewise, fathead minnow larvae exposed to the serotonin and noradrenalin reuptake inhibitor (SNRI) venlafaxine revealed reduced anxiety, indicated by a reduced escape response (Painter *et al.*, 2009).

### *Calculated plasma concentrations*

Therapeutic human plasma concentrations in patients treated with doses of 20 – 60 mg citalopram per day are  $117 \pm 95 \mu\text{g/L}$  (Le Bloc'h *et al.*, 2003). In contrast, Schreiber *et al.* (2011) reported a maximum blood plasma concentration of only  $21.1 \mu\text{g/L}$  in patients after drug administration with a maximum daily dose of 60 mg. Considering measured human therapeutic plasma concentrations of citalopram, calculated plasma concentrations in fish exposed to 1, 10, 100 and  $1000 \mu\text{g/L}$  at pH 8 with the fish plasma model (Table Supplement 8) (Fu *et al.*, 2009; Huggett *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 2011) revealed that the calculated concentrations in fish exposed to  $100 \mu\text{g/L}$  citalopram or higher exceeded the human therapeutic plasma concentrations according to Le Bloc'h *et al.* (2003). When referred to the human plasma concentrations in the study conducted by Schreiber *et al.* (2011), when even exposed to  $10 \mu\text{g/L}$  fish plasma concentrations would exceed the concentrations in human plasma. However, Holmberg *et al.* (2011) showed that 2 out of 5 rainbow trout exposed to  $10 \mu\text{g/L}$  citalopram revealed a plasma citalopram concentration of  $0.044 \mu\text{g/L}$  and  $0.08 \mu\text{g/L}$  after exposure for only 24 h. The lack of behavioural effects in the study of Holmberg *et al.* (2011) and also our results obtained for the lower treatments  $1 \mu\text{g/L}$  and  $10 \mu\text{g/L}$  citalopram, suggests that citalopram plasma concentrations in fish below human therapeutic plasma concentrations do not to affect the fish. Though, our results on behaviour and growth of brown trout provide evidence that citalopram plasma concentrations in fish higher than human therapeutic plasma concentrations can have severe impact on brown trout in different life stages.

### Conclusion

Our results clearly show that citalopram affects brown trout according to its mode of action known for humans. Under stressful conditions, fish showed reduced swimming behaviour when exposed to at least  $100 \mu\text{g/L}$  citalopram. Furthermore, in the exposure tanks, an increased swimming activity during exposure was observed for fish exposed to  $1 \text{ mg/L}$  citalopram, which can be linked to the antidepressant effect of the drug. The behavioural changes were stronger in early life stages, which could be associated with the longer exposure time in larvae compared to juveniles, but also differences in sensitivity between life stages may play a role. In addition, side-effects of the antidepressant known from human applications could be detected, like reduced weight and length, in both juvenile brown trout and brown trout larvae exposed to  $1000 \mu\text{g/L}$  citalopram. Our results confirm similar findings for citalopram exposure to those reported for other aquatic species. To conclude, citalopram, as a widely distributed drug, severely alters the behaviour and growth of brown trout in different life stages, at concentrations higher than current environmentally relevant levels. And the 10 times stronger accumulation of citalopram in juveniles makes evident that an increase in surface water concentration of citalopram could have severe impact on specific life stages of fish. Nevertheless,

considering safety factors up to  $10^3$  that have to be included in environmental risk assessment and also additive effects of pharmaceuticals affecting similar pathways, citalopram is far from being an environmentally safe pharmaceutical and has to be considered carefully with respect to risk for the aquatic environment.

## Acknowledgements

Particular thanks go to Thomas Braunbeck, Heidelberg University, for the coordination of this project. Furthermore, the authors thank Stefanie Jacob, Stefanie Kraus, Elisabeth May, Katharina Peschke, Lukas Reinelt, Hannah Schmiege and Sabrina Wilhelm for help in the laboratory and technical assistance, and Stefanie Dietz for comments on the manuscript. Furthermore, thanks go to Nils Anthes and Simon Schwarz for statistical advice. Language check was conducted by Proof-Reading-Service.com.

## Additional Informations and declarations

### *Funding*

This study is part of the project Effect-Net (Effect Network in Water Research), which is part of the Water Research Network Baden-Württemberg (Wassernetzwerk Baden- Württemberg) and funded by the Ministry for Science, Research and Arts of Baden- Württemberg. Carolin Huhn received support from the Excellence Initiative, a jointly funded program of the German Federal and State governments, organized by the German Research Foundation (DFG). The authors also received support from the Open Access Publishing Fund of University of Tübingen. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### *Grant Disclosures*

The following grant information was disclosed by the authors:

Effect-Net (Effect Network in Water Research).

Water Research Network Baden-Württemberg (Wassernetzwerk Baden-Württemberg).

Ministry for Science, Research and Arts of Baden-Württemberg.

German Federal and State governments, organized by the German Research Foundation (DFG).

Open Access Publishing Fund (University of Tübingen).

### *Competing Interests*

The authors declare there are no competing interests.

### *Author Contributions*

- Michael Ziegler conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Sarah Knoll and Selina Tisler analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Heinz-R. Köhler, Carolin Huhn, Christian Zwiener and Rita Triebkorn conceived and designed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, contributed reagents/materials/analysis tools, and approved the final draft.

### *Animal Ethics*

The following information was supplied relating to ethical approvals (i.e., approving body and any reference numbers): Animal welfare committee of the Regional Council of Tübingen, Germany approved the study (authorisation ZO 2/16).



### *Data Availability*

The following information was supplied regarding data availability: Data is available at Effect-Net under "brown trout larvae exposed to citalopram" and "juvenile brown trout exposed to citalopram": <https://effectnet-seek.bioquant.uni-heidelberg.de/investigations/9>.

### *Supplemental Information*

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.8765#supplemental-information>.

## References

- Acuña, V., von Schiller, D., García-Galán, M. J., Rodríguez-Mozaz, S., Corominas, L., Petrovic, M., Poch, M., Barceló, D., Sabater, S. 2015.** Occurrence and in-stream attenuation of wastewater-derived pharmaceuticals in Iberian rivers, *Science of the Total Environment* 503-504:133-141; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.067.
- Airhart, M. J., Lee, D. H., Wilson, T. D., Miller, B. E., Miller, M. N., Skalko, R. G. 2007.** Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC), *Neurotoxicology and Teratology* 29(6):652-664; DOI: 10.1016/j.ntt.2007.07.005.
- Álvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., Maulvault, A. L., Tediosi, A., Fernández-Tejedor, M., Van den Heuvel, F., Kotterman, M., Marques, A., Barceló, D. 2015.** Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe, *Environmental Research* 143(Pt B):56-64; DOI: 10.1016/j.envres.2015.09.018.
- aus der Beek, T., Weber, F.-A., Bergmann, A., Grüttner, G., Carius, A. 2016.** Pharmaceuticals in the environment: Global occurrence and potential cooperative action under the Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM), Texte: 67/2016, Hickmann, S., Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau; ISSN: 1862-4804.
- Demin, K. A., Kolesnikova, T. O., Khatsko, S. L., Meshalkina, D. A., Efimova, E. V., Morzherin, Y. Y., Kalueff, A. V. 2017.** Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes, *Neurotoxicology and Teratology* 62:27-33; DOI: 10.1016/j.ntt.2017.04.002.
- Destatis. 2017.** Gesundheit: Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle), Fachserie 12 Reihe 6.2.1, Statistisches Bundesamt; Artikelnummer: 2120621167004.
- Du, B., Haddad, S. P., Luek, A., Scott, W. C., Saari, G. N., Burket, S. R., Breed, C. S., Kelly, M., Broach, L., Rasmussen, J. B., Chambliss, C. K., Brooks, B. W. 2016.** Bioaccumulation of human pharmaceuticals in fish across habitats of a tidally influenced urban bayou, *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(4):966-974; DOI: 10.1002/etc.3221.
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, D. G. J. 2009.** Contamination of Surface, Ground, and Drinking Water from Pharmaceutical Production, *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12):2522-2527; DOI: 10.1897/09-073.S1.
- Fick, J., Lindberg, R. H., Tysklind, M., Larsson, D. G. 2010.** Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 58(3):516-523; DOI: 10.1016/j.yrtph.2010.08.025.
- Foran, C. M., Weston, J., Slattery, M., Brooks, B. W., Huggett, D. B. 2004.** Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46(4):511-517; DOI: 10.1007/s00244-003-3042-5.
- Fu, W., Franco, A., Trapp, S. 2009.** Methods for estimating the bioconcentration factor of ionizable organic chemicals, *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(7):1372-1379; DOI: 10.1897/08-233.1.

- Grabicova, K., Lindberg, R. H., Ostman, M., Grabic, R., Randak, T., Larsson, D. G., Fick, J. 2014.** Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant, *Science of the Total Environment* 488-489:46-50; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.052.
- Grabicova, K., Grabic, R., Fedorova, G., Fick, J., Cervený, D., Kolarova, J., Turek, J., Zlabek, V., Randak, T. 2017.** Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream, *Water Research* 124:654-662; DOI: 10.1016/j.watres.2017.08.018.
- Gunnarsson, L., Jauhainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., Larsson, D. G. J. 2008.** Evolutionary Conservation of Human Drug Targets in Organisms used for Environmental Risk Assessments, *Environmental Science and Technology* 42(15):5807-5813; DOI: 10.1021/es8005173.
- Hedgspeth, M. L., Nilsson, P. A., Berglund, O. 2014.** Ecological implications of altered fish foraging after exposure to an antidepressant pharmaceutical, *Aquatic Toxicology* 151:84-87; DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.12.011.
- Henry, T. B., Black, M. C. 2008.** Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54(2):325-330; DOI: 10.1007/s00244-007-9018-0.
- Hexal AG. 2012.** Citalopram HEXAL 10 mg Filmtabletten, Hexal AG, [https://www.medikamente-perklick.de/images/ecommerce/01/39/01390871\\_2012-05\\_de\\_o.pdf](https://www.medikamente-perklick.de/images/ecommerce/01/39/01390871_2012-05_de_o.pdf) (04.06.2019).
- Himmelsbach, M., Buchberger, W., Klampfl, C. W. 2006.** Determination of antidepressants in surface and waste water samples by capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection after preconcentration using off-line solid-phase extraction, *Electrophoresis* 27(5-6):1220-1226; DOI: 10.1002/elps.200500693.
- Holmberg, A., Fogel, J., Albertsson, E., Fick, J., Brown, J. N., Paxéus, N., Förlin, L., Johnsson, J. I., Larsson, D. G. 2011.** Does waterborne citalopram affect the aggressive and sexual behaviour of rainbow trout and guppy?, *Journal of Hazardous Materials* 187(1-3):596-599; DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.055.
- Huggett, D. B., Cook, J. C., Ericson, J. F., Williams, R. T. 2003.** A Theoretical Model for Utilizing Mammalian Pharmacology and Safety Data to Prioritize Potential Impacts of Human Pharmaceuticals to Fish, *Human and Ecological Risk Assessment* 9(7):1789-1799; DOI: 10.1080/714044797.
- Hughes, S. R., Kay, P., Brown, L. E. 2013.** Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems, *Environmental Science and Technology* 47(2):661-677; DOI: 10.1021/es3030148.
- Hyttel, J. 1994.** Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), *International Clinical Psychopharmacology* 9:19-26; DOI: 10.1097/00004850-199403001-00004.
- Kellner, M., Porseryd, T., Porsch-Hällström, I., Hansen, S. H., Olsén, K. H. 2015.** Environmentally relevant concentrations of citalopram partially inhibit feeding in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Aquatic Toxicology* 158:165-170; DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.11.003.

- Kellner, M., Porseryd, T., Hallgren, S., Porsch-Hällström, I., Hansen, S. H., Olsén, K. H. 2016.** Waterborne citalopram has anxiolytic effects and increases locomotor activity in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Aquatic Toxicology* 173:19-28; DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.12.026.
- Kellner, M., Porseryd, T., Porsch-Hällström, I., Borg, B., Roufidou, C., Olsén, K. H. 2017.** Developmental exposure to the SSRI citalopram causes long-lasting behavioural effects in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Ecotoxicology* 27(1):12-22; DOI: 10.1007/s10646-017-1866-4.
- Keysomi, M. M. E., Sudagar, M., Nasirir, A. 2013.** Effect of Citalopram on Reducing Transportation Stress in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of Aquaculture Research and Development* 04(03); DOI: 10.4172/2155-9546.1000171.
- Klemetsen, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J. B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M. F., Mortensen, E. 2003.** Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories, *Ecology of Freshwater Fish* 12:1-59; DOI: 10.1034/j.1600-0633.2003.00010.x.
- Larsson, D. G., de Pedro, C., Paxeus, N. 2007.** Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals, *Journal of Hazardous Materials* 148(3):751-755; DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.07.008.
- Le Bloc'h, Y., Woggon, B., Weissenrieder, H., Brawand-Amey, M., Spagnoli, J., Eap, C. B., Baumann, P. 2003.** Routine Therapeutic Drug Monitoring in Patients Treated with 10–360 mg/day Citalopram, *Therapeutic Drug Monitoring* 25:600-608; DOI: 10.1097/00007691-200310000-00010.
- Martin, J. M., Saaristo, M., Bertram, M. G., Lewis, P. J., Coggan, T. L., Clarke, B. O., Wong, B. B. M. 2017.** The psychoactive pollutant fluoxetine compromises antipredator behaviour in fish, *Environmental Pollution* 222:592-599; DOI: 10.1016/j.envpol.2016.10.010.
- Maulvault, A. L., Santos, L., Paula, J. R., Camacho, C., Pissarra, V., Fogaça, F., Barbosa, V., Alves, R., Ferreira, P. P., Barceló, D., Rodriguez-Mozaz, S., Marques, A., Diniz, M., Rosa, R. 2018.** Differential behavioural responses to venlafaxine exposure route, warming and acidification in juvenile fish (*Argyrosomus regius*), *Science of the Total Environment* 634:1136-1147; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.015.
- Maximino, C., Marques de Brito, T., Dias, C. A., Gouveia, A., Jr., Morato, S. 2010.** Scototaxis as anxiety-like behavior in fish, *Nature Protocols* 5(2):209-216; DOI: 10.1038/nprot.2009.225.
- Mennigen, J. A., Sassine, J., Trudeau, V. L., Moon, T. W. 2010.** Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*, *Aquatic Toxicology* 100(1):128-137; DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.07.022.
- Meshalkina, D. A., Kysil, E. V., Antonova, K. A., Demin, K. A., Kolesnikova, T. O., Khatsko, S. L., Gainetdinov, R. R., Alekseeva, P. A., Kalueff, A. V. 2018.** The Effects of Chronic Amitriptyline on Zebrafish Behavior and Monoamine Neurochemistry, *Neurochemical Research* 43(6):1191-1199; DOI: 10.1007/s11064-018-2536-5.
- Moermond, C. T., Kase, R., Korkaric, M., Ågerstrand, M. 2016.** CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(5):1297-1309; DOI: 10.1002/etc.3259.

- Nödler, K., Licha, T., Bester, K., Sauter, M. 2010.** Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples, *Journal of Chromatography A* 1217(42):6511-6521; DOI: 10.1016/j.chroma.2010.08.048.
- Olsén, K. H., Ask, K., Olsén, H., Porsch-Hällström, I., Hallgren, S. 2014.** Reprint of "Effects of the SSRI citalopram on behaviours connected to stress and reproduction in Endler guppy, *Poecilia wingei*", *Aquatic Toxicology* 151:97-104; DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.02.011.
- Paíga, P., Santos, L., Ramos, S., Jorge, S., Silva, J. G., Delerue-Matos, C. 2016.** Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation, *Science of the Total Environment* 573:164-177; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.089.
- Painter, M. M., Buerkley, M. A., Julius, M. L., Vajda, A. M., Norris, D. O., Barber, L. B., Furlong, E. T., Schultz, M. M., Schoenfuss, H. L. 2009.** Antidepressants at Environmentally Relevant Concentrations affect Predator Avoidance Behavior of Larval Fathead Minnows (*Pimephales promelas*), *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12):2677-2684; DOI: 10.1897/08-556.1.
- Perreault, H., Semsar, K., Godwin, J. 2003.** Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish, *Physiology & Behavior* 79(4-5):719-724; DOI: 10.1016/s0031-9384(03)00211-7.
- Saaristo, M., McLennan, A., Johnstone, C. P., Clarke, B. O., Wong, B. B. M. 2017.** Impacts of the antidepressant fluoxetine on the anti-predator behaviours of wild guppies (*Poecilia reticulata*), *Aquatic Toxicology* 183:38-45; DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.12.007.
- Sackerman, J., Donegan, J. J., Cunningham, C. S., Nguyen, N. N., Lawless, K., Long, A., Benno, R. H., Gould, G. G. 2010.** Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of *Danio rerio* Line, *International Journal of Comparative Psychology* 23(1):43-61; PMCID: PMC2879659.
- Schreiber, R., Gundel, U., Franz, S., Kuster, A., Rechenberg, B., Altenburger, R. 2011.** Using the fish plasma model for comparative hazard identification for pharmaceuticals in the environment by extrapolation from human therapeutic data, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 61(3):261-275; DOI: 10.1016/j.yrtph.2011.08.006.
- Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L. B., Blazer, V. S., Norris, D. O., Vajda, A. M. 2010.** Antidepressant Pharmaceuticals in Two U.S. Effluent-Impacted Streams: Occurrence and Fate in Water and Sediment, and Selective Uptake in Fish Neural Tissue, *Environmental Science and Technology* 44:1918-1925; DOI: 10.1021/es9022706.
- Schwabe, U., Paffrath, D. 2016.** Arzneiverordnungsreport 2016, *Springer-Verlag GmbH*, Berlin, ISBN: 978-3-662-50350-8.
- Schwarz, S., Schmiege, H., Scheurer, M., Köhler, H.-R., Triebkorn, R. 2017.** Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta* f. *fario*, *Science of the Total Environment* 607-608:1026-1036; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.042.

- Sehonova, P., Hodkovicova, N., Urbanova, M., Örn, S., Blahova, J., Svobodova, Z., Faldyna, M., Chloupek, P., Briedikova, K., Carlsson, G. 2019.** Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians, *Environmental Pollution* 254(Pt A):112999; DOI: 10.1016/j.envpol.2019.112999.
- Silva, L. J., Pereira, A. M., Meisel, L. M., Lino, C. M., Pena, A. 2014.** A one-year follow-up analysis of antidepressants in Portuguese wastewaters: occurrence and fate, seasonal influence, and risk assessment, *Science of the Total Environment* 490:279-287; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.131.
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., Kalueff, A. V. 2012.** Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review, *Neuropharmacology* 62(1):135-143; DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.037.
- Vasskog, T., Berger, U., Samuelsen, P. J., Kallenborn, R., Jensen, E. 2006.** Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway, *Journal of Chromatography A* 1115(1-2):187-195; DOI: 10.1016/j.chroma.2006.02.091.
- Verbruggen, B., Gunnarsson, L., Kristiansson, E., Österlund, T., Owen, S. F., Snape, J. R., Tyler, C. R. 2018.** ECOdrug: a database connecting drugs and conservation of their targets across species, *Nucleic Acids Research* 46(D1):D930-D936; DOI: 10.1093/nar/gkx1024.
- Wendelaar Bonga, S. E. 1997.** The Stress Response in Fish, *Physiological Reviews* 77(3):591-625; DOI: 10.1152/physrev.1997.77.3.591.
- Wu, M., Liu, S., Hu, L., Qu, H., Pan, C., Lei, P., Shen, Y., Yang, M. 2017.** Global transcriptomic analysis of zebrafish in response to embryonic exposure to three antidepressants, amitriptyline, fluoxetine and mianserin, *Aquatic Toxicology* 192:274-283; DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.09.027.

## Kapitel II:

# Behavioral and Developmental Changes in Brown Trout After Exposure to the Antidepressant Venlafaxine

Michael Ziegler<sup>1</sup>, Michel Banet<sup>2</sup>, Rebecca Bauer<sup>3</sup>, Heinz-R. Köhler<sup>1</sup>, Sabine Stepinski<sup>1</sup>, Selina Tisler<sup>3</sup>, Carolin Huhn<sup>2</sup>, Christian Zwiener<sup>3</sup>, Rita Triebkorn<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, 72076 Tübingen, Germany

<sup>2</sup>Effect-based Environmental Analysis, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 18, 72076 Tübingen, Germany

<sup>3</sup>Environmental Analytical Chemistry, University of Tübingen, Hölderlinstr. 12, 72074 Tübingen, Germany

<sup>4</sup>Steinbeis Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstraße 13, 72108 Rottenburg, Germany

*Frontiers in Environmental Science* 8(586584), DOI: [10.3389/fenvs.2020.586584](https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.586584)

## Abstract

During the last decades, depression has been diagnosed in increasing numbers, accompanied by rising prescription rates of antidepressants. Concomitantly, these pharmaceuticals are frequently detected in surface waters. Serotonin and noradrenalinreuptake inhibitors such as venlafaxine form the second largest group of antidepressants worldwide, and venlafaxine is the second most prescribed antidepressant in Germany. As drug targets are evolutionary highly conserved, venlafaxine can potentially change not only behavior and related physiological processes in humans but also in non-target species, especially aquatic organisms. In order to test this hypothesis for fish, we exposed brown trout larvae and juveniles to venlafaxine at concentrations ranging from 1 to 1000 µg/L. Larvae were exposed for 5 months from the eyed ova stage until 8 weeks post yolk-sac consumption at 7 and 11 °C. Juveniles were exposed for 4 weeks at 7 °C. Mortality, weight, length, behavior during exposure and behavior in a stressful environment were recorded in both experiments. For larvae, additionally, hatching rate and heart rate were analyzed. In juvenile fish, tissue cortisol levels were determined. Our results clearly showed that brown trout, irrespective of their life stage, change their behavior when being exposed to venlafaxine: During exposure, venlafaxine at 7 °C caused larvae to sojourn in the upper part of the aquaria for a longer time, with a lowest observed effect concentration of 100 µg/L. In a stressful environment with limited space, fish exposed to ≥10 µg/L venlafaxine were less active than controls. Furthermore, venlafaxine reduced the growth of larvae (length at ≥10 µg/L, weight at 1 mg/L) and their survival after 5 months (at 1 mg/L). Hatching rate and heart rate of larvae as well as tissue cortisol concentration of juveniles were not affected by venlafaxine treatment.

**Keywords:** antidepressant, venlafaxine, brown trout, fish, behavior, development

## Introduction

The rising number of diagnosed depression in humans has led to continuously soaring prescription rates of antidepressant drugs during the last decades (Liu *et al.*, 2020; Wittchen *et al.*, 2011). Many of these pharmaceuticals resemble each other with respect to their mode of action: they inhibit the reuptake of neurotransmitters such as serotonin, noradrenalin or dopamine into the pre-synapse. One of the most prescribed antidepressants worldwide is venlafaxine, a serotonin and noradrenalin reuptake inhibitor (SNRI). To a minor extent, it also inhibits the reuptake of dopamine (Burnett & Dinan, 1998). Since no notable effects of venlafaxine on other receptors were found, e.g., cholinergic, adrenergic and histaminergic receptors, it is regarded as a rather specific anti-depressant (Burnett & Dinan, 1998). Venlafaxine is used as therapeutic drug against major depression but also generalized anxiety disorders and panic disorders (Hexal AG, 2019). In Germany, about 200 million defined daily doses (DDD) of venlafaxine were prescribed in 2018. This resulted in a market share of about 13.6 % of all prescribed antidepressants (Schwabe *et al.*, 2019). With an assumed defined daily dose (DDD) of 100 mg per patient (WHO, 2019), this leads to a minimum consumption rate of 20 t/year for Germany only. Due to increasing and still rising prescription rates of antidepressants, especially of SNRI during the last decade (Schwabe *et al.*, 2019), and low elimination rates in wastewater treatment plants (Mackul'ak *et al.*, 2015), venlafaxine was detected frequently in the water cycle (Acuña *et al.*, 2015; Ferrer & Thurman, 2012; Schlüsener *et al.*, 2015). Maximum concentrations reached up to 690 ng/L in wastewater-dominated streams, however, mean concentrations in surface waters were about 200 ng/L (Ferrer & Thurman, 2012; Grabicova *et al.*, 2017; Himmelsbach *et al.*, 2006; Lajeunesse *et al.*, 2008; Schultz *et al.*, 2010). In wastewater effluents, venlafaxine was detected in concentrations from 63.8 ng/L up to 2.5 µg/L (Lajeunesse *et al.*, 2012; Paíga *et al.*, 2016; Schlüsener *et al.*, 2015). Its active metabolite, O-desmethylvenlafaxine, was found at two to three times higher concentrations ranging from 610 ng/L up to 4 µg/L in wastewater effluents (Lajeunesse *et al.*, 2012; Schlüsener *et al.*, 2015). Having in mind the continuously increasing prescription rates and the poor elimination rates, surface water concentrations of venlafaxine can be expected to rise in the future (Mackul'ak *et al.*, 2015; Schwabe *et al.*, 2019). Most studies addressing the risk related to the exposure of aquatic organisms to antidepressants were conducted with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), especially with fluoxetine (Henry & Black, 2008; Martin *et al.*, 2017; Mennigen *et al.*, 2010). Less information is available for SNRI impact on fish, but, nevertheless, a number of studies were conducted in fathead minnow (*Pimephales promelas*) with a focus on venlafaxine impact on behavior. For this species, diminished escape behavior, increased mortality, increased nest defense and egg production were reported (Painter *et al.*, 2009; Parrott & Metcalfe, 2017, 2018; Schultz *et al.*, 2011). Decreased hatching rates, deformities in fry and increased weight of males were shown in fathead minnows



exposed to a mixture of the antidepressants venlafaxine (24 µg/L), citalopram (2.4 µg/L), fluoxetine (900 ng/L), sertraline (200 ng/L) and bupropion (900 ng/L). However, these effects could not be attributed to a single antidepressant (Parrott & Metcalfe, 2019). In white seabream (*Diplodus sargus*), an exposure of larvae to venlafaxine resulted in decreased survival, increased attack frequency and time on nauplii prey (Rodrigues *et al.*, 2019). Marine juvenile meagre (*Argyrosomus regius*) exposed to 20 µg/L venlafaxine showed an increased sojourn time in the top part of the water column and a decreased activity in the novel tank diving test (Maulvault *et al.*, 2018). Melvin (2017) showed a change in the circadian rhythm of male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) when exposed to at least 100 µg/L of the antidepressant. Also, in invertebrates, venlafaxine was shown to modulate behavior. In several studies, foot detachment from the surface and increased moving velocity were reported for snails (Fong & Hoy, 2012; Fong & Molnar, 2013; Fong *et al.*, 2015). In common cuttlefish (*Sepia officinalis*) brain regional changes in cellular proliferation, a decrease in the norepinephrine level and a reduction of the relative number of glutamate N-methyl-D-aspartate (NMDA)-like receptor binding sites in response to 5 ng/L venlafaxine after 20 days exposure were reported. Additionally, 100 ng/L venlafaxine affected the camouflage ability of these animals (Bidel *et al.*, 2016). Up to now, there is still a lack of knowledge concerning the risk posed by antidepressants to fish native in Central European waters. We therefore conducted our study with two life stages of brown trout, a species which is supposed to react in a sensitive way to environmental chemicals (Schwarz *et al.*, 2017). Brown trout eggs were exposed to venlafaxine concentrations ranging from environmentally relevant to explicitly higher concentrations (1, 10, 100, 1000 µg/L) for up to 5 months. However, the highest concentration used is still far below LC<sub>50</sub> values of >100 mg/L known for rainbow trout (Merck KGaA, 2017; Pfizer Pharmaceutical Group, 2011). During exposure, developmental parameters like hatching rate, malformations, heart rate and mortality were recorded. At the end of the experiment, also, weight and length of the fish were assessed. Since venlafaxine as an antidepressant could affect normal and anxiety related behavior, we assessed behaviour under conditions of exposure and in a stressful environment. In the comparable novel tank diving test with zebrafish stay in the upper part is connected to reduced anxiety (Maximino *et al.*, 2010a; Stewart *et al.*, 2012) and this behavior could already be detected in fish exposed to venlafaxine (Maulvault *et al.*, 2018). Furthermore, in artificial systems a reduced activity due to venlafaxine exposure could already be detected (Maulvault *et al.*, 2018; Sehonova *et al.*, 2019; Thompson & Vijayan, 2020). Therefore, an increased stay in the upper part as well as reduced activity in a stressful environment could be expected. In a second experiment, juvenile brown trout were exposed to the same venlafaxine concentrations for four weeks and, also here, the apical endpoints mortality, weight and length were determined at the end of the exposure time. Behavior was recorded in a similar way as for brown trout larvae, i.e. during exposure and at the end of the

experiment in a stressful environment. As a proxy for their stress status, cortisol levels were determined in juvenile fish. The aim of our study was to provide data for an environmental risk assessment of venlafaxine with particular emphasis on sublethal effects of this antidepressant, ranging from biochemical to behavioral endpoints, in a feral fish species.

## Material and methods

### *Fish*

Brown trout eggs and juvenile fish were obtained from a commercial trout farm (Forellenzucht Lohmühle, Alpirsbach-Ehlenbogen, Germany). This commercial trout breeder is listed as disease-free Category I according to the EU council directive 2006 (EU, 2006). The eggs in the eyed ova stage were directly transferred into the test aquaria. Juvenile fish were kept in an acclimation tank for one week prior to the experiment and subsequently subjected to experimental exposure. The larvae were kept in climate chambers at 10:14 h light:dark cycle at either 7 °C or 11 °C. Exposure of juveniles was conducted at 7 °C only.

### *Test substance*

Venlafaxine is an antidepressant belonging to the group of SNRIs (serotonin and noradrenalin reuptake inhibitors). For our experiments we used venlafaxine hydrochloride ( $C_{17}H_{27}NO_2 \cdot HCl$ , CAS: 99,300-78-4) from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). The stock solutions contained 1 and 100 mg/L venlafaxine dissolved in distilled water. The nominal concentrations of venlafaxine in the experiments refer to the free base ( $C_{17}H_{27}NO_2$ ) of the pharmaceutical.

### *Experiment with brown trout eggs and hatched larvae*

Brown trout eggs ( $3 \times 10$  per treatment) were exposed in a randomized semi-static three-block design to nominal 0, 1, 10, 100 and 1000  $\mu\text{g/L}$  venlafaxine in 25 L aquaria containing 10 L of the respective test solution. Prior to the exposure of eggs, each aquarium was saturated for seven days with the respective test solution. For each treatment, eggs in the eyed ova stage (32 days post fertilization) were exposed either at 7 °C or at 11 °C in a 10:14 h light:dark cycle in two climate chambers. The aquaria were covered with non-transparent black plastic foil to prevent direct illumination. Twice a week, in each aquarium, 50 % of the test solution volume was renewed for sanitary reasons and in order to maintain the respective venlafaxine concentrations. After yolk sac consumption, fish were fed daily with a defined amount of trout feed (first 0.5 mm, later 0.8 mm in diameter, Inico Plus, Biomar, Brande, Denmark) equivalent to 3 % of their body weight. During exposure, mortality and hatching rate were recorded on a daily basis. The heart rate of five individuals per treatment was recorded one week after hatching in the respective climate chamber. For heart rate determination, larvae were transferred into a Petri dish. After acclimatization for 5 min, the heart beat was counted for 20 s as a basis to calculate the heart rate (beats per minute).

Simultaneously, the water temperature in the Petri dish was measured. Subsequent to this measurement, fish were transferred back into their exposure tank. From six days after yolk-sac consumption until the end of the experiment, three photos of each aquarium were taken daily with the aim to evaluate swimming behavior during exposure. One week before termination of exposure, five individuals of each tank were transferred into an artificial swimming measurement device (described below) aiming at quantifying swimming behaviour under stressful conditions. Subsequently, these five fish were anesthetized with an overdose of MS222 (1 g/L buffered with NaHCO<sub>3</sub>) followed by a cervical spine cut to assure death. For each individual, weight and length were determined. Seven weeks after yolk-sac consumption, when the exposure ended, all remaining fish were killed as described before. Samples of the posterior body part were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for further analysis of venlafaxine tissue concentrations. At the beginning and the end of the experiment physico-chemical water parameters (temperature, oxygen concentration, pH, conductivity) were recorded. Additionally, the concentration of nitrite in water was measured at the end of the experiment and four weeks before. Detailed information is given in the Supplementary Material.

#### *Experiment with juvenile brown trout*

Juvenile brown trout were exposed to venlafaxine at 7 °C with a light:dark cycle of 10:14 h for 25 days. The 25 L tanks were arranged in randomized order following a semi-static three block design. Each aquarium contained 15 L of the respective test solution (0, 1, 10, 100 and 1000 µg/L Venlafaxine). The top of the tanks were covered with non-transparent black plastic foil to prevent direct illumination. Twice a week, 50 % of the test solution was replaced by freshly prepared test solution. Additionally, three tanks with solely 100 µg/L venlafaxine without fish served as a control for possible venlafaxine degradation and were treated equally to the other aquaria. Fish were fed daily with a defined amount of trout feed, equivalent to 3 % of their body weight (grain size: 0.8 mm, Inico Plus, Biomar, Brande, Denmark). During the experiment, mortality was recorded daily. Additionally, three photos were taken daily from each tank as a basis to quantify behavior during exposure. At the end of the experiment, all fish were killed as described above except for three animals per aquarium which were used for behavioral analyses under stressful conditions prior to dissection. From each fish, samples were taken from the dorsal body portion, containing muscle and kidney tissue, to determine the cortisol level. Samples of the posterior body portion, containing mainly muscle tissue, were used for the chemical analysis of venlafaxine tissue residues. All samples were frozen in liquid nitrogen immediately after dissection and stored at -80 °C until further processing. At the beginning and the end of the experiments physico-chemical water parameters (temperature, oxygen concentration, pH, conductivity) were recorded. Detailed information is given in the Supplementary Material.

## *Venlafaxine analysis*

### Water samples

Water samples were taken at the beginning and the end of the experiment and once a month during the experiments. Venlafaxine concentrations were determined using LC-MS with a 1290 Infinity HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and a triple quadrupole mass spectrometer (6490 iFunnel Triple Quadrupole LC/MS, Agilent Technologies) in ESI(+) mode. An Agilent Poroshell-120-ECC18 (2.7  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  100 mm) column at a flow rate of 0.4 ml/min was used for separation, and column temperature was maintained at 40 °C. Eluent A and B were water (+0.1 % formic acid) and acetonitrile (+0.1 % formic acid), respectively. For the samples taken from the experiment with juvenile brown trout, gradient elution was adapted as follows: 0 – 1 min 5 % B, linear increase to 100% B within 7 min, hold for 7 min at 100 % B. After switching back to the starting conditions, a reconditioning time of 3 min was set. Samples were kept in the autosampler at 10 °C and an injection volume of one or 10  $\mu\text{L}$  (dilution factor 0 – 100). The detection limit of venlafaxine (mass transition  $m/z$  278.2  $\rightarrow$  260.2) for undiluted samples was 10 ng/L (10  $\mu\text{L}$  injection volume). For the samples taken from the experiment with brown trout eggs and larvae, the gradient elution was adapted as follows: 0 – 1 min 5 % B, linear increase to 100 % B within 5 min, remain at 100 % for 2 min, then return to starting conditions for 5 min to recondition the column. Samples were kept in an autosampler at 10 °C, and the injection volume was 5  $\mu\text{L}$ . Further details on operating parameters of the triple quadrupole are provided in the Supplementary Material.

### Tissue samples

Venlafaxine tissue concentrations in brown trout larvae and juveniles were determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Sample extraction was carried out with a miniaturized and optimized QuEChERS dispersive solid phase extraction method. Samples of each exposure group were either pooled if the sample quantity was too little (5 animals per pool) or treated individually. Since tailfin samples were expected to contain similar matrices (mainly muscle tissue), all samples were treated in the same way during extraction. The extraction method presented by Ziegler *et al.* (2020b) originally developed for citalopram, was adapted. Homogenization of the frozen individual and pooled fish samples (-20 °C) was performed with mortar and pestle under liquid nitrogen. The homogenized samples were transferred into 2.0 mL tubes, weighed (Eppendorf, Hamburg, Germany) and subsequently spiked with deuterated venlafaxine-D6 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Due to varying venlafaxine tissue concentrations and the consequent different dilution necessary after extraction, samples were spiked with adjusted concentrations. This ensured final concentrations in the established calibration range. Therefore, 10  $\mu\text{L}$  of either a 10 mg/L venlafaxine-D6 solution in methanol for high exposure groups (100  $\mu\text{g/L}$ , 1000  $\mu\text{g/L}$  venlafaxine in aquarium water) or a 1 mg/L solution for low exposure groups (0  $\mu\text{g/L}$ , 1  $\mu\text{g/L}$ , 10  $\mu\text{g/L}$ ) was used. Then, the solvent was

evaporated at room temperature for 5 min under a gentle stream of nitrogen. In a next step, 0.25 mL acetonitrile (LC-MS grade, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 0.75 mL water (LC-MS grade, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were added to the samples followed by mixing for 30 s. Then, 120 mg anhydrous magnesium sulfate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), which was dried overnight at 140 °C, and 30 mg sodium chloride (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were added to the samples which were immediately mixed for 30 s. After centrifugation for 15 min at 13,000 rpm, 0.1 ml of the acetonitrile phase were separated and evaporated carefully under a continuous stream of nitrogen. The dried residue was resolved in 0.5 ml methanol (LCMS grade, Chemsolute, Renningen, Germany) and diluted to concentrations in the established calibration range for venlafaxine and venlafaxine-D6. At last, the methanol extract was filtered for LC-MS analysis with a 45 µm PTFE filter (pore size: 0.45 µm, Chromafil, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Matrix-matched calibration was performed between 1 and 50 µg/L with venlafaxine-D6 and venlafaxine (>98 %, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The limit of detection of the method was 5 ng/L. Recoveries of the extraction process were calculated by using standard addition after extraction. The extraction recovery of venlafaxine-D6 was 20 %. All analyses were performed using a 1260 Infinity LC system coupled to a 6550 iFunnel QTOF mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany and Santa Clara, CA, USA) with a jet stream electrospray ionization source. Aliquot samples with a volume of 10 µL were injected onto a Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1 × 150 mm; 3.5 µm particle size, narrow bore, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) at a column temperature of 40 °C. Details for analyses are summarized in the Supplementary Material. A gradient elution was performed with 0.3 ml/min using water and methanol, both containing 0.1 % formic acid. Data analysis was performed with MassHunter Workstation 10.1 software (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

### *Analyses of behavior during the exposure*

To assess the influence of the antidepressant on the swimming behavior of fish during the exposure, three photos of each aquarium were taken daily. Five minutes after removal of the black foil from the aquaria three photos of each tank were taken with 5 min intervals in between, using a Panasonic DMC-TZ56 camera. Photos were taken between 1 and 4 p.m. before feeding. A white sheet of paper was placed behind the aquaria to obtain a bright background for better contrast, and all photos were taken from the aquarium's front side. During the experiment with eggs and larvae, photos were taken every day within the period from one week after yolk sac consumption onwards until sampling. In the study with juvenile brown trout photos were taken every day from the second day of exposure onwards until the end of the experiment (01 August – 23 August 2018). For each photograph, the number of fish in the upper and lower half of the aquarium was determined and. From the three photos per treatment and per day, a mean value was calculated.

### *Analyses of behavior under stressful conditions*

Swimming behavior under stressful conditions was analyzed in an artificial swimming measurement device (ASMD) according to Ziegler *et al.* (2020b). Fish were transferred into four small aquaria (17 × 17 × 8.5 cm) which were surrounded by white polystyrene plates. Each aquarium was monitored by an individual camera (Basler acA 1,300 – 60 gm, 1.3 MP resolution, Basler AG, Ahrensburg, Germany, lens: 4.5 – 12.5 mm; 1:1.2, IR1/2”). To obtain optimal illumination, four lamps were adjusted to face the top of the polystyrene enclosure for indirect bright illumination. Five brown trout larvae were transferred into each of the four small aquaria containing 500 ml of the respective test solution, and their individual movement was recorded for 20 min. In the case of juvenile brown trout, three individuals per tank were assessed in 1 L of the respective solution. The respective first 2 min of each recording were neglected to account for the acclimation of fish to the test conditions. Video sequences of the remaining 18 min were analyzed for the parameters “total distance moved”, “mean velocity” and “time of no movement (inactivity)”. The individuals were centre-point tracked with the program EthoVision XT12 (Noldus Information Technology BV, Wageningen, Netherlands). Due to occasional difficulties in automatic tracking, swimming tracks were manually corrected when necessary.

### *Cortisol content*

The cortisol content of juvenile fish exposed to venlafaxine was measured with the commercially available fish cortisol ELISA Kit by Cusabio Technology LCC (Houston, Texas, United States). The samples of the dorsal body portion were manually homogenized with a pestle in PBS buffer (pH 7.6, 0.1 M) (tissue/buffer ratio 1:11 w/v). The homogenates were frozen at -20 °C, thawed at room temperature, frozen and re-thawed again, and then centrifuged for 5 min at 5,000 rpm. Then, the supernatants were stored at -80 °C. Immediately before testing, the supernatants were thawed and diluted with the kit’s sample buffer (supernatant/buffer ratio 1:5 v/v). In the pre-coated 96-well plates provided, 50 µL of the respective standard solution or 50 µL sample as well as 50 µL assay buffer were pipetted into each well (except for the predetermined blank), followed by a 40 min incubation at 37 °C. After three washing cycles with washing buffer, 100 µL horseradish peroxidase (HRP)-conjugate was pipetted into each well (except for the blank) and incubated at 37 °C for 30 min again. After five further washing cycles, 90 µL of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) solution was added into each well and the plate was incubated at 37 °C for 20 min. Finally, 50 µL of the stop solution were added, and the emission was determined photometrically at 405 nm and at 570 nm for wavelength correction. The concentrations were calculated using data corrected for the blank and wavelength fitted to a four parameter logistic standard curve. Results are expressed as ng/mL.

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed with the programmes SAS JMP 14 (Cary, North Carolina, USA) and R 3.5.0 (Vienna, Austria) (packages: lme4, coxme). Mortality and hatching rates were analyzed with a cox mixed effect model (aquarium identity as random factor). Weight, length, heart rate of brown trout larvae and total distance moved in the ASMD were assessed with a nested ANOVA and subsequent post-hoc Dunnett's test. Whenever data were not normally distributed, a nonparametric Kruskal-Wallis test was performed with a subsequent post-hoc Steel with control. If homogeneity of variance was not achieved, a Welch ANOVA with a subsequent post-hoc Dunnett's test was used. Data for behavior during exposure were analyzed with a generalized linear mixed model (aquarium identity as random factor) and subsequent post-hoc Dunnett's test. Cortisol content, time dependant mean velocity and time of no movement in the ASMD were analyzed with a linear mixed model (aquarium identity as random factor).

### *CRED*

Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data (CRED) are given in the Supplementary Material and aim to improve the evaluation of ecotoxicity studies (Moermond *et al.*, 2016). CRED is used to improve the transparency, reproducibility and consistency of reliability with different reliability and relevance criteria to increase the chance, that an ecotoxicological study is considered for regulatory purposes (Moermond *et al.*, 2016).

## Results

### *Physico-chemical water parameters*

Physico-chemical water parameters were determined at the beginning and the end of the two experiments. Temperature, oxygen content, pH and conductivity were in an acceptable range in both experiments (brown trout larvae: mean temperature: 7 °C:  $7.25 \pm 0.26$  °C; 11 °C:  $11.37 \pm 0.23$  °C; mean oxygen content: 7 °C:  $11.18 \pm 0.33$  mg/L; 11 °C:  $9.92 \pm 0.06$  mg/L; mean pH: 7 °C:  $8.26 \pm 0.23$ ; 11 °C:  $7.90 \pm 0.11$ ; mean conductivity: 7 °C:  $489.2 \pm 28.3$   $\mu$ S/cm; 11 °C:  $469.8 \pm 2.3$   $\mu$ S/cm; juvenile brown trout: mean temperature:  $7.01 \pm 0.26$  °C; mean oxygen content:  $11.24 \pm 0.08$  mg/L; mean pH:  $7.43 \pm 0.28$ ; mean conductivity:  $489.6 \pm 6.75$   $\mu$ S/cm). In the experiment with eggs and larvae, nitrite levels were in an acceptable range (0.05 – 0.1 mg/L) during the experiment and at the end at 7 °C. Only at the very end of the experiment at 11 °C the nitrite level was elevated (0.6 mg/L). In the experiment with juvenile brown trout, the nitrite level was determined at the end of the experiment and was shown to be in an acceptable range (0.05 mg/L). Further details are given in the Supplementary Material.

### *Venlafaxine analysis in water and tissue*

#### Water samples

Venlafaxine concentrations were below the limit of detection in all control treatments. Recovery rates of venlafaxine were at least 75 % of the nominal concentrations. In most cases, the real water concentrations were 4–20 % lower than the nominal concentrations, except for the highest concentration in the experiment with eggs and larvae (Table 1). Here, the concentrations were up to 6 % higher than nominal concentrations. The water concentrations of the 100  $\mu$ g/L venlafaxine degradation control in the experiment with juvenile brown trout (real water concentration:  $75.79 \pm 1.24$   $\mu$ g/L) was similar to the concentrations of the 100  $\mu$ g/L venlafaxine treatment with fish (real water concentration:  $75.80 \pm 1.78$   $\mu$ g/L). Overall, the real venlafaxine concentrations in water were in good accordance the nominal concentrations (Table 1 and Table 2).

#### Tissue samples

Results for venlafaxine residues in fish tissue samples made evident that tissue concentrations correlated with the respective concentrations in the exposure medium. Tissue concentrations in brown trout larvae exposed at 7 °C were similar to those in juvenile fish (Table 1 and Table 2). In control animals, venlafaxine concentrations were below the limit of detection of 5 ng/L. Bioconcentration factors ranged from 13.9 for the treatments with the lower venlafaxine concentrations to 3.5 for fish exposed to the highest test concentration. This could be shown for both life stages (Table 1 and Table 2).



## Experiment with brown trout eggs and larvae

Table 1: Results for brown trout larvae exposed to venlafaxine.

Data are shown as arithmetical means  $\pm$  standard deviation. Asterisks represent significant differences to the respective control (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Abbreviations: n.a., not assessed; dpf, day post fertilization; ASMD, Artificial swimming measurement device; LoD, limit of detection; BCF, concentration in tissue (ng/g)/concentration in water (ng/L)  $\times 1,000$ .

Temperature (°C)	11					7				
Nominal venlafaxine concentration $\mu\text{g/L}$	0	1	10	100	1000	0	1	10	100	1000
Mortality (%)	3.33 $\pm$ 2.72	5.56 $\pm$ 1.57	4.44 $\pm$ 3.14	5.56 $\pm$ 3.14	14.44 $\pm$ 7.86	20 $\pm$ 7.2	22.22 $\pm$ 6.29	18.89 $\pm$ 4.16	16.67 $\pm$ 2.72	28.89 $\pm$ 3.14
Weight (g)	0.437 $\pm$ 0.115	0.435 $\pm$ 0.156	0.424 $\pm$ 0.137	0.393 $\pm$ 0.128	0.435 $\pm$ 0.185	0.319 $\pm$ 0.078	0.316 $\pm$ 0.081	0.309 $\pm$ 0.083	0.300 $\pm$ 0.065	<b>0.285</b> $\pm$ <b>0.096</b> **
Length (cm)	3.68 $\pm$ 0.35	3.66 $\pm$ 0.43	3.65 $\pm$ 0.38	<b>3.48</b> $\pm$ <b>0.37</b> **	3.54 $\pm$ 0.44	3.33 $\pm$ 0.26	3.27 $\pm$ 0.27	<b>3.22</b> $\pm$ <b>0.25</b> **	<b>3.17</b> $\pm$ <b>0.20</b> ***	<b>3.06</b> $\pm$ <b>0.33</b> ***
Time to hatch (dpf)	45.59 $\pm$ 0.65	45.81 $\pm$ 0.74	45.71 $\pm$ 0.76	45.63 $\pm$ 0.67	45.48 $\pm$ 0.74	58.61 $\pm$ 1.85	58.72 $\pm$ 1.45	59.44 $\pm$ 1.95	58.84 $\pm$ 1.41	58.92 $\pm$ 1.63
Heart rate (bpm)	90.4 $\pm$ 3.07	88.46 $\pm$ 3.76	87.2 $\pm$ 2.99	88.13 $\pm$ 4.94	88 $\pm$ 3.41	55 $\pm$ 3.03	56.8 $\pm$ 2.79	53.8 $\pm$ 2.32	57.2 $\pm$ 3.71	56.4 $\pm$ 2.50
Behaviour during exposure (% in upper aquaria half)	0.31 $\pm$ 1.11	0.32 $\pm$ 1.19	0.28 $\pm$ 1.02	0.81 $\pm$ 1.62	<b>13.72</b> $\pm$ <b>9.62</b> ***	0.19 $\pm$ 0.81	0.33 $\pm$ 1.27	0.11 $\pm$ 0.74	<b>1.54</b> $\pm$ <b>3.13</b> **	<b>16.72</b> $\pm$ <b>8.56</b> ***
ASMD: total distance moved (cm)	2266 $\pm$ 1024	1991 $\pm$ 958	<b>1433</b> $\pm$ <b>727</b> *	1586 $\pm$ 632	<b>533 <math>\pm</math></b> <b>174</b> ***	3065 $\pm$ 1358	2789 $\pm$ 1219	2867 $\pm$ 1834	<b>1686</b> $\pm$ <b>1123</b> *	<b>636 <math>\pm</math></b> <b>620</b> ***
Tissue venlafaxine concentration (ng/g)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<LoD	11.56 $\pm$ 8.34	47.60 $\pm$ 12.29	492.9 $\pm$ 204.6 8	3582. $\pm$ 81 $\pm$ 845.3 3
Aqueous venlafaxine concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	<LoD	0.96 $\pm$ 0.04	8.88 $\pm$ 0.78	83.97 $\pm$ 2.25	1003. 08 $\pm$ 32.05	<LoD	0.83 $\pm$ 0.05	9.19 $\pm$ 0.93	79.27 $\pm$ 7.09	1015. 07 $\pm$ 44.83
Bioconcentration factor (BCF)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	13.93	5.18	6.22	3.53

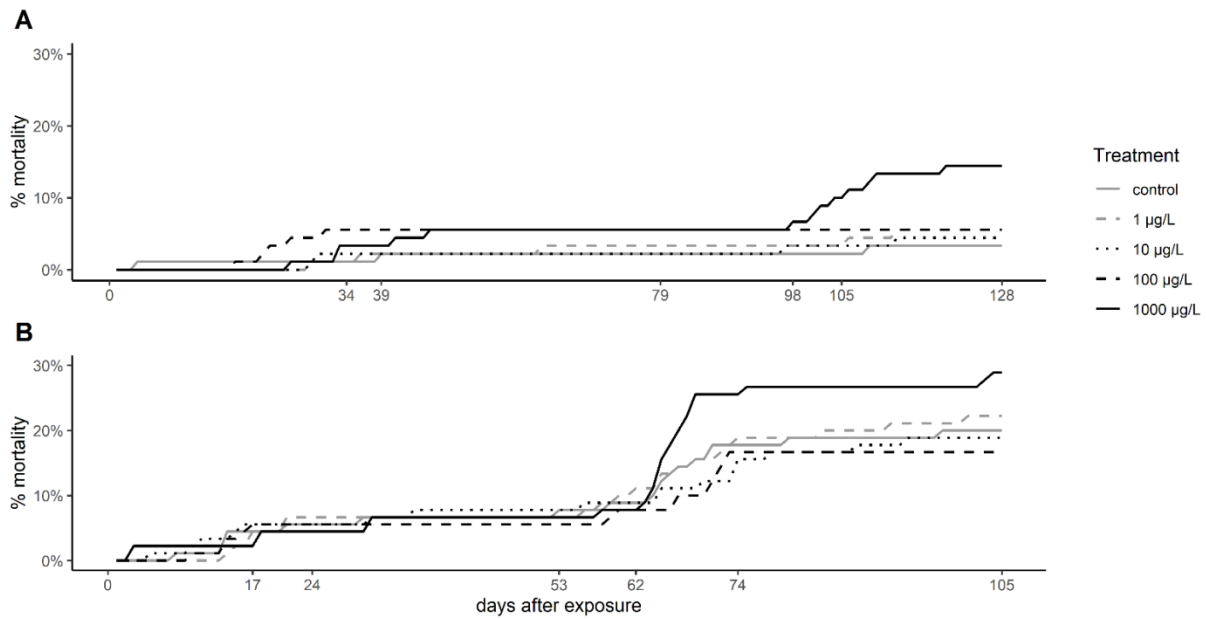


Figure 1: Mortality of brown trout larvae. Mortality rate of brown trout larvae exposed (A) at 7 °C, and (B) at 11 °C. Depicted is the cumulative mortality over time.

Mortality of brown trout larvae was elevated in fish exposed to the highest venlafaxine concentration (1000 µg/L) compared to the other exposure groups (Figure 1). This trend was observed at 7 °C (cox mixed-effects model:  $df = 4$ ,  $\chi^2 = 9.4954$ ,  $p = 0.04984$ , posthoc Dunnett's test [control|1000 µg/L]  $p = 0.0563$ ) with a prominent increase in the mortality from day 98 to day 109 to about 15 % at the end of the experiment (Figure 1 A), the time of completion of the yolk sac consumption and the first food intake of the larvae. At 11 °C mortality of larvae exposed to 1000 µg/L ( $28.89 \pm 3.14$  %) was about 44 % higher than control mortality ( $20 \pm 7.2$  %) (Figure 1 B), but not significantly different (cox mixed-effects model:  $df = 4$ ,  $\chi^2 = 4.3496$ ,  $p = 0.3608$ ). At 11 °C from day 62 onwards overall mortality increased resulting in an average mortality of about 21.33 % at the end of the experiment (Figure 1 B). At 7 °C overall mortality of fish was 6.67 % only. The hatching rate at both temperatures did not differ significantly between control and the respective venlafaxine treatments (cox mixed-effects model: 11 °C:  $df = 4$ ,  $\chi^2 = 8.8912$ ,  $p = 0.06388$ ; 7 °C:  $df = 4$ ,  $\chi^2 = 126.13$ ,  $p < 0.0001$ , post-hoc Dunnett's test revealed no difference to the control). Also, the heart rate was not affected by venlafaxine at both temperatures (nested ANOVA: 7 °C:  $df = 4.10$ ,  $F = 3.6544$ ,  $p = 0.0099$ , post-hoc Dunnett's test revealed no difference to the control; 11 °C nested ANOVA:  $df = 4.10$ ,  $F = 1.9067$ ,  $p = 0.121$ ). As it could be expected, fish exposed at 11 °C displayed an approximately 30 bpm higher heart rate than fish exposed at 7 °C. The impact of venlafaxine on body length and weight became more evident in fish exposed at 7 °C rather than at 11 °C. Here, fish exposed to  $\geq 10$  µg/L venlafaxine were significantly smaller, and fish exposed to the highest venlafaxine concentration were also significantly lighter than control fish (length: Kruskal-Wallis test:  $df = 4$ ,  $\chi^2 = 50.6227$ ,  $p < 0.0001$ , post-hoc Steel with control [control|10 µg/L]  $p = 0.0093$  [control|100 µg/L]  $p < 0.0001$  [control|1000 µg/L]  $p < 0.0001$  µg/L; weight: Kruskal-Wallis test:  $df = 4$ ,

$\chi^2 = 12.6183$ ,  $p = 0.0133$ , post-hoc Steel with control [control|1000  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.0053$ ). At 11 °C, in particular fish exposed to 100  $\mu\text{g/L}$  venlafaxine were significantly smaller than control fish, however no significant difference was observed (weight: Welch-ANOVA:  $df = 4,167.97$ ,  $F = 1.4336$ ,  $p = 0.225$ ; length: nested ANOVA:  $df = 4.10$ ;  $F = 3.5667$ ;  $p = 0.0073$ ; post-hoc Dunnett's test [control|100  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.0064$ ). Although not significantly different, fish exposed to either venlafaxine concentration were on the average smaller and lighter than control fish.

#### Analysis of behavior during exposure

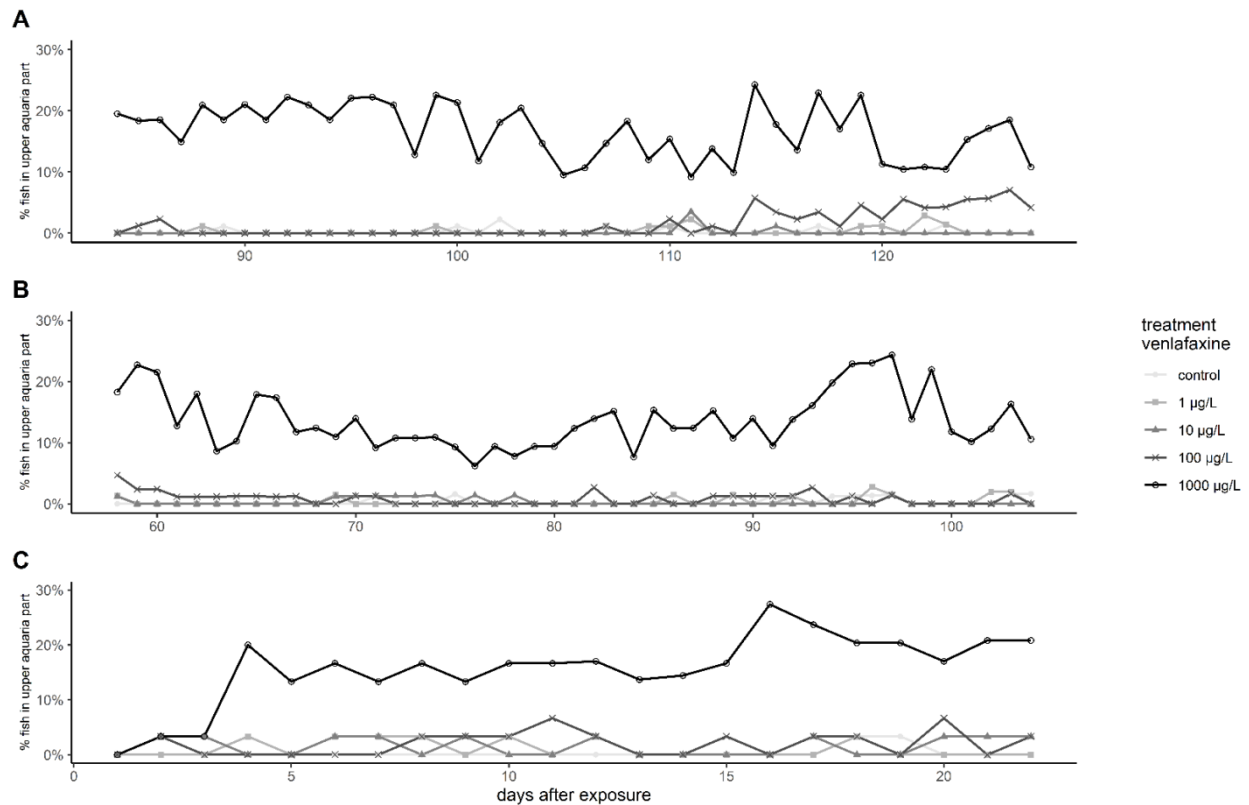


Figure 2: Results for the behavior of brown trout during the exposure. (A): Brown trout larvae exposed at 7 °C, (B): Brown trout larvae exposed at 11 °C, (C): Juvenile brown trout, depicted are daily mean percentage of fish observed in the upper half of the aquaria.

Regarding behavior during exposure, larvae exposed to 100 and 1000  $\mu\text{g/L}$  venlafaxine at 7 °C stayed more often in the upper part of the respective aquarium than the control fish (Figure 2 A) (generalized linear mixed model,  $df = 4$ ,  $F = 29.6409$ , post-hoc Dunnett's test [control|100  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.0037$  [control|1000  $\mu\text{g/L}$ ]  $p < 0.001$ ). Whereas this effect became obvious in larvae exposed to 1000  $\mu\text{g/L}$  right from the first photos taken, in fish exposed to 100  $\mu\text{g/L}$  it could be observed first from day 114 onwards (Figure 2). Larvae exposed to 1000  $\mu\text{g/L}$  venlafaxine at 11 °C showed an increased sojourn frequency in the upper part of the aquaria during the entire experiment, whereas for fish exposed to 100  $\mu\text{g/L}$  venlafaxine such behavior could not be observed (Figure 2 B) (generalized linear mixed model,  $df = 4$ ,  $F = 15.2872$ , post-hoc Dunnett's test [control|100  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.278$  [control|1000  $\mu\text{g/L}$ ]  $p < 0.001$ ).

## Analysis of behavior in stressful environment

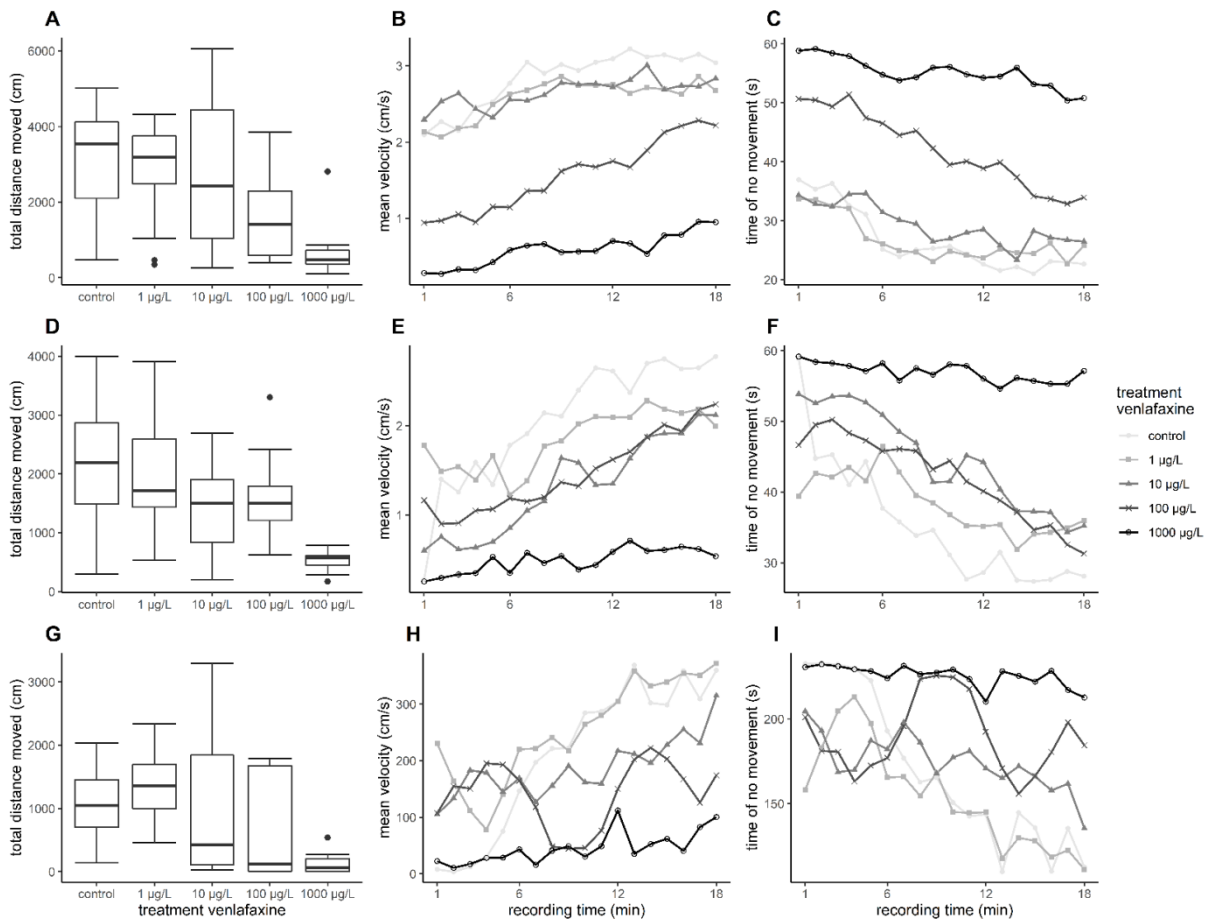


Figure 3: Results for brown trout in the ASMD.

Results of total distance moved are shown as boxplot (A, D, G), results of mean velocity (B, E, H) and time of no movement (C, F, I) are represented by dots with lines, with depicted mean values over time. A-C: Results for brown trout larvae exposed at 7 °C, D-F: Results for brown trout larvae exposed at 11 °C, G-I: Results for juvenile brown trout

Nominal venlafaxine concentrations affecting fish behavior under stressful conditions were lower than effective nominal concentrations affecting behavior during exposure. Larvae exposed to 100 and 1000 µg/L venlafaxine at 7 °C swam less during the time of recording compared to control fish (Table 1, Figure 3 A) (Welch-ANOVA:  $df = 4.34.003$ ,  $F = 14.5522$ ,  $p < 0.0001$ , post-hoc Dunnett's test [control|100 µg/L]  $p = 0.0228$  [control|1000 µg/L]  $p < 0.0001$ ). Likewise, fish exposed to 10 and 1000 µg/L venlafaxine at 11 °C swam less than respective control fish. For fish exposed to 100 µg/L, data were more variable and not significantly different, however, a trend became visible (Table 1, Figure 3 D). (Welch-ANOVA:  $df = 4.29.399$ ,  $F = 30.6773$ ,  $p < 0.0001$ , post-hoc Dunnett's test [control|10 µg/L]  $p = 0.018$  [control|100 µg/L]  $p = 0.0691$  [control|1000 µg/L]  $p < 0.0001$ ). With regard to the temporal pattern during the recording time, control fish showed a low locomotor activity at the beginning of the recording but increased activity over time during the measurement (Figure 3 B + C + E + F). In contrast, fish exposed to 1000 µg/L did not show such a temporal relationship with regard to mean velocity and inactivity (time of no movement). They constantly showed a low mean velocity and a constantly long time of inactivity during the recording time, with

data being significantly different from controls (mean velocity: 7 °C: Linear mixed model: df = 4,10, F = 4.3551, p = 0.02694, post-hoc Dunnett's test [control|1000 µg/L] p = 0.00206; 11 °C: Linear mixed model: df = 4.10, F = 4.728, p = 0.02114, posthoc Dunnett's test [control|1000 µg/L] p < 0.001; time of no movement: 7 °C: Linear mixed model: df = 4,10, F = 4.8471, p = 0.01961, post-hoc Dunnett's test [control|1000 µg/L] p = 0.00133; 11 °C: Linear mixed model: df = 4,10, F = 5.1766, p = 0.01601, post-hoc Dunnett's test [control|1000 µg/L] p < 0.001).

### Experiment with juvenile brown trout

Table 2: Results for juvenile brown trout exposed to venlafaxine

Data are shown as arithmetical means ± standard deviation. Asterisks represent significant differences to the respective control (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001). Abbreviations: n.a., not assessed; dpf, day post fertilization; LoD, limit of detection; BCF, concentration in tissue (ng/g)/concentration in water (ng/L) × 1,000.

Nominal venlafaxine concentration µg/L	0	1	10	100	1000
Mortality (%)	13.33 ± 18.86	0 ± 0	3.33 ± 4.71	0 ± 0	6.67 ± 9.43
Weight (g)	2.47 ± 0.48	2.51 ± 0.93	2.64 ± 0.63	2.77 ± 0.83	2.73 ± 1.15
Length (cm)	6.28 ± 0.45	6.30 ± 0.80	6.46 ± 0.54	6.50 ± 0.73	6.42 ± 0.85
Behaviour during exposure (% sojourn in upper aquaria half)	0.45 ± 2.10	1.06 ± 3.10	1.51 ± 3.61	1.97 ± 4.01	<b>15.72 ±</b> <b>13.73</b> <b>***</b>
ASMD: total distance moved (cm)	1079 ± 579	1318 ± 540	723 ± 780	939 ± 571	<b>130 ±</b> <b>172*</b>
Tissue cortisol content (ng/mL)	7.20 ± 4.35	4.40 ± 5.29	5.93 ± 3.76	4.57 ± 5.27	5.36 ± 4.46
Tissue venlafaxine concentration (ng/g)	<LoD	6.68 ± 2.87	53.67 ± 20.26	402.205 ± 151.44	4323.33 ± 2629.06
Aqueous venlafaxine concentration (µg/L)	<LoD	0.79 ± 0.01	8.27 ± 0.10	75.8 ± 1.78	829.39 ± 5.19
Bioconcentration factor (BCF)	n.a.	8.45	6.49	5.30	5.21

Exposure of juvenile brown trout to venlafaxine did not affect mortality independent of the exposure concentration (cox mixedeffects model: df = 4,  $\chi^2 = 13.215$ , p = 0.01027, post-hoc Dunnett's test revealed no difference to control). Likewise, length and weight of juvenile brown trout exposed to venlafaxine did not differ significantly from control fish (weight: Welch-ANOVA: df = 4.66.624, F = 1.0271, p = 0.3999; length: Welch-ANOVA: df = 4.68.448, F = 0.7528, p = 0.5596).

#### Analysis of behavior during exposure

Only few control fish sojourned in the upper half of the respective aquarium (less than 1%). Significant differences occurred in fish exposed to the highest venlafaxine concentration with about 15 % of fish staying in the upper half of the aquarium (Figure 2 C, Table 2) (generalized linear mixed model, df = 4, F = 5.6349, post-hoc Dunnett's test [control|1000 µg/L] p < 0.001).

### Analysis of Behavior in Stressful Environment

Also, in the artificial swimming measurement device (ASMD), behavior of brown trout exposed to the highest concentration of venlafaxine was significantly different to the one of control fish. Exposed fish swam significantly less than controls (Table 2, Figure 3 G) (total distance moved: Welch-ANOVA:  $df = 4, 14.735$ ,  $F = 4.026$ ,  $p = 0.021$ , post-hoc Dunnett's test [control | 1000  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.0174$ ). Similar to control brown trout larvae, juvenile fish swam slower at the beginning of the exposure and increased swimming velocity over recording time (Figure 3 H + I). Juvenile fish exposed to 1000  $\mu\text{g/L}$  venlafaxine showed a trend toward reduced velocity and longer inactivity, but the difference to the control was not as distinct as in larvae, and no significant differences could be revealed (linear mixed model: mean velocity:  $df = 4, 10$ ,  $F = 2.1353$ ,  $p = 0.1508$ ; time of no movement:  $df = 4, 10$ ,  $F = 2.3322$ ,  $p = 0.1265$ ).

### Cortisol

Tissue cortisol levels in juvenile brown trout were not affected by exposure to venlafaxine (linear mixed model:  $df = 4, 119.02$ ,  $F = 1.4114$ ,  $p = 0.234370$ ) (Table 2). However, there was a significant impact of the ASMD on cortisol levels of fish. Animals assessed in the ASMD had a significant higher tissue cortisol concentration (7.97 ng/ml) compared to fish not assessed in the measurement device (4.57 ng/ml) (linear mixed model:  $df = 1, 119.37$ ,  $F = 9.8669$ ,  $p = 0.002122$ ).

### Discussion

As a basis for an evaluation of the risk posed by the antidepressant venlafaxine to aquatic ecosystems, the present study provides data for effects of this drug on two life stages of brown trout complemented by analytical data in water and exposed biota. Fish were exposed to four concentrations of venlafaxine with the lowest concentration representing an environmentally relevant exposure situation, e.g. in wastewater dominated surface waters (Lajeunesse *et al.*, 2008; Lajeunesse *et al.*, 2012; Schlüsener *et al.*, 2015).

In both experiments, the real water concentrations were close to the nominal concentrations. Venlafaxine tissue concentrations correlated well with the respective water concentrations with low venlafaxine concentrations of the aqueous medium resulting in higher BCFs than for higher concentrations in the exposure medium (Table 1 and Table 2). When comparing the tissue concentrations between the two life stages, juvenile brown trout exposed to 1000  $\mu\text{g/L}$  venlafaxine for four weeks only accumulated equal or even slightly higher amounts of venlafaxine than larvae exposed to the same concentration for five months. Also, for the other concentrations, accumulation in juvenile and larval fish were in a comparable range, even though the larvae were exposed five times longer than juvenile fish. An explanation for this observation might be, that in larvae, the gastro-intestinal system and the gills are still under development and not yet fully functional which

may have led to a lower uptake of the chemical (Wells & Pinder, 1996). It is also possible that, tissue concentrations may have also reached a saturation plateau in both life stages exposed (Meador *et al.*, 2017). David *et al.* (2018) reported venlafaxine concentrations in brain tissue of roach, exposed for 15 days to wastewater (356 ± 39 ng/L venlafaxine), in the low ng/g range with a bioconcentration factor (BCF) of 0.7. In white sucker from a creek in Iowa, U.S.A. (venlafaxine concentration 102 ng/L), venlafaxine brain tissue concentrations of 0.1 ± 0.1 ng/g were measured (Schultz *et al.*, 2010). In rainbow trout exposed to wastewater (venlafaxine concentration 330 ± 20 ng/L), venlafaxine concentrations of 21 ± 11 ng/g were found in the liver (BCF 63) and 3.1 ± 1.4 ng/g in the brain (BCF 9) while no venlafaxine was detected in muscle tissue (Grabicova *et al.*, 2014). In brown trout, concentrations of up to 3.5 ± 1.7 ng/g were found in liver (BCF 15) and 16 ± 4 ng/g in kidney (BCF 37) after exposure in a Czech river downstream a wastewater treatment plant (venlafaxine concentration 65 ± 34 ng/L) for 18 months. In the same study, no venlafaxine could be detected in brain and muscle tissue of exposed fish (Grabicova *et al.*, 2017). Comparing our results with literature data, it becomes evident that venlafaxine can be accumulated also in muscle tissue, when fish are exposed to high concentrations of the antidepressant for longer time (up to 5 months). However, literature data indicate a higher accumulation in other organs, at least in liver and kidney, compared to muscular tissue. The comparatively low BCFs reported for brain may result from the rather low octanol-water partition coefficient log P<sub>ow</sub> of 2.74 (DrugBank, 2020) and thus low lipophilicity of venlafaxine. The overall mortality of larvae was generally higher when exposed at 11 °C (21.33 %) than at 7 °C (6.67 %). The high nitrite levels at the end of the experiment at 11 °C can be excluded as mortality reason for this, since mortality increased between day 95 and 106 of exposure, and nitrite levels were still low (0.1 mg/L) and thus well acceptable at day 106 (Brown & McLeay, 1975; Molony, 2001; Smith & Williams, 1974). Furthermore, it is known that salmonid eggs and larvae are more resistant to nitrite than adult fish due to the larvae size, and therefore higher surfacearea-to-volume ratio and the higher oxygen uptake through the skin (Bartlett & Neumann, 1998). A more likely reason for the higher mortality is the fact that fish developed quicker at 11 °C than at 7 °C and started earlier to feed on exogenous food. This transition to exogenous feeding represents an important bottleneck in the salmonid development and is generally associated with a higher mortality risk (Klemetsen *et al.*, 2003). The increased mortality at 11 °C may be attributed to the smaller and lighter individuals at this temperature that reasonably did not survive the faster transition to exogenous feeding. Even though, at both temperatures, the increase in the mortality of larvae exposed to 1000 µg/L venlafaxine was evidently higher than in controls, this difference was represented by a statistical trend at 7 °C only but was not significant at 11 °C. In fathead minnow, even lower concentrations of 305 ng/L venlafaxine led to an increased mortality (Schultz *et al.*, 2011), and white-seabream larvae have reported to show a reduced survival rate when exposed to 100 µg/L venlafaxine (Rodrigues *et al.*,

2019). Also other antidepressants are known to increase mortality as, e.g., fluoxetine with a 50 % lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of 546 µg/L in mosquitofish (Henry & Black, 2008). However, in other studies, meagre, zebrafish and fathead minnow mortality was not affected by venlafaxine (Maulvault *et al.*, 2018; Parrott & Metcalfe, 2017; Sehonova *et al.*, 2019) as it was the case for juvenile brown trout in our study.

Brown trout larvae exposed to 1000 µg/L venlafaxine were generally smaller and lighter compared to the controls. This can be explained by the fact that antidepressants are known to alter the appetite of exposed organisms resulting in reduced food uptake and weight loss, as it was reported, e.g., in humans, rats and fish (de Oliveira *et al.*, 2004; Hedgspeth *et al.*, 2014; Mennigen *et al.*, 2010; Stahl, 1998). We observed more food leftovers in all tanks containing 1000 µg/L venlafaxine indicating less food uptake by fish in these exposure groups. Unfortunately, we did not have the possibility to quantify the amount of food ingested in our experiment. In general, however, the reduced food uptake may be confounded by the higher mortality of venlafaxine-exposed larvae. Regarding fish growth in general, it became evident that long-time exposure of hatched larvae to venlafaxine induced stronger effects than short-time exposure of juvenile fish, and effects became more evident at 7 °C than at 11 °C presumably due to the longer exposure time (105 days for larvae at 11 °C, 128 days for larvae at 7 °C, 24 days for juveniles at 7 °C). Due to co-variation and, possibly, concurrence of the test parameters, it cannot be decided which of the test parameters are more relevant to explain the observed effects. In previous studies, venlafaxine did not exert effects on growth, particularly weight and length of fish (Maulvault *et al.*, 2018; Painter *et al.*, 2009; Parrott & Metcalfe, 2019). The shorter exposure time in the studies of (Maulvault *et al.*, 2018) and (Painter *et al.*, 2009) which was below 28 days, and the lower exposure concentrations (max. 88 µg/L) used by Parrott & Metcalfe (2019) can likely account for these differences. Different species-specific sensitivities can also be of importance in this context. Several other antidepressants like citalopram, fluoxetine (SSRIs) and mianserin, a tetracyclic antidepressant, are known to affect food intake and growth in fish: In a previous study we showed that brown trout larvae and juveniles were smaller and lighter than controls when exposed to 1000 µg/L citalopram (Ziegler *et al.*, 2020b). Kellner *et al.* (2015) showed that sticklebacks exposed to at least 0.15 µg/L citalopram had a reduced food intake. Similarly, goldfish exposed to 54 µg/L fluoxetine showed a reduced food intake and lower weight gain (Mennigen *et al.*, 2010), and zebrafish exposed to either 10 µg/L fluoxetine or 10 µg/L mianserin were shorter compared to control fish (Wu *et al.*, 2017).

Generally, hatching time and the heart rate of fish seem not to be parameters sensitive to antidepressants. Regarding time to hatch, in our experiment with brown trout no impact of venlafaxine became evident. Also, in fathead minnow, the hatching rate was not impacted by



venlafaxine applied in concentrations up to 88 µg/L (Parrott & Metcalfe, 2019). Likewise, zebrafish exposed to up to 3 mg/L venlafaxine did not show any difference in their hatching rate (Sehonova *et al.*, 2019). Also other antidepressants did not alter the hatching rate of fish, like fluoxetine in medaka (Foran *et al.*, 2004), sertraline in zebrafish (Sehonova *et al.*, 2019) or citalopram in brown trout (Ziegler *et al.*, 2020b). In addition, the heart rate, which was assessed one week after hatching was completed, did not show any differences between treated and control fish. Sehonova *et al.* (2019) exposed zebrafish and western-clawed frogs (*Xenopus tropicalis*) up to 3 mg/L venlafaxine or 1 mg/L sertraline and also did not observe changes in heart rate by either venlafaxine or sertraline. In a previous experiment, in which brown trout larvae were exposed to the antidepressant citalopram, similarly, the heart rate was not influenced by citalopram applied in concentrations up to 1 mg/L (Ziegler *et al.*, 2020b).

#### *Analysis of behavior during exposure*

Both larvae of brown trout and juvenile fish showed higher preference for the upper half of the aquarium when exposed to venlafaxine. This was true for fish exposed to 1000 µg/L venlafaxine during the entire experiment, but also larvae exposed to 100 µg/L at 7 °C exhibited such behavior at day 114 onwards presumably due to the longer exposure time compared to larvae at 11 °C. Juvenile brown trout started to sojourn more frequently in the upper part of the aquarium from exposure day 4 onwards. As previously pointed out by (Ziegler *et al.*, 2020b), the interpretation of such behavior requires consideration of (anti) anxiety-modulated preference-associated movement such as geotaxis and scototaxis. Under control conditions, brown trout larvae and juveniles mostly stayed in the lower part of the water column or even close to the bottom of the tank (control, Table 1 and Table 2). Fish exposed to venlafaxine, however, stayed in the upper part of the aquarium, which was far better illuminated than the dark bottom of the aquarium, after removal of the black cover foil. In the novel tank test, where a single zebrafish is placed in a new environment, increased residence near the water surface (reduced geotaxis) was described to be due to reduced anxiety behavior and increased boldness (Maximino *et al.*, 2010a; Stewart *et al.*, 2012). Also Maximino *et al.* (2010b) reported the preference of fish for a lighter area (reduced scototaxis) to result from antianxiety. Even though, general toxicity cannot be excluded as a factor, based on the reduced geo- and scototaxis and the fact that venlafaxine acute toxicity (LC<sub>50</sub>) is higher than 100 mg/L in rainbow trout (Merck KGaA, 2017; Pfizer Pharmaceutical Group, 2011), the behavioural changes are most likely due to anti-anxiety effect of the substance. Furthermore, effects already appeared with a LOEC of 100 µg/L, while no mortality occurred within this exposure group. This is also supported by the findings of the histopathology of these fish, where no histopathological alterations in the liver were found and therefore no cytotoxicity appeared (Ziegler *et al.*, 2020a). This decreased anxiety can alter natural behaviors, resulting in inter alia increased predation risk and can therefore have an effect on

the population level (Ågerstrand *et al.*, 2020; Saaristo *et al.*, 2018). In a previous experiment, brown trout exposed to the antidepressant citalopram, similarly, resided more often in the upper part of the aquarium (Ziegler *et al.*, 2020b). Maulvault *et al.* (2018) showed, in the novel tank test, that juvenile meagre exposed to 20 µg/L venlafaxine spent more time in the upper aquaria part. Similar results from the novel tank test were also shown for other antidepressants like citalopram in sticklebacks, endler guppies and zebrafish (Kellner *et al.*, 2016; Olsén *et al.*, 2014; Sackerman *et al.*, 2010), fluoxetine in mosquitofish (Henry & Black, 2008), and amitriptyline in zebrafish (Demin *et al.*, 2017; Meshalkina *et al.*, 2018). A consequential increase of the swimming activity as a result of the exposure to antidepressants was also reported by (Kellner *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2017). Despite this compelling evidence, however, occasionally also a decrease in the swimming activity was found after antidepressant exposure (Kellner *et al.*, 2017; Maulvault *et al.*, 2018). Ecological relevance of this behavioural endpoint is given, because anxiety in fish is related inter alia to predation risk and foraging efficacy (Kellner *et al.*, 2016). Our results reveal an effect at 100 µg/L venlafaxine after five months exposure. Even though this is at least 100 fold higher than environmentally relevant concentrations, with regard to safety factors a no observed effect concentration (NOEC) of 10 µg/L for the behavior during the exposure, should not be ignored when assessing the environmental risk of venlafaxine.

### *Analysis of Behavior in Stressful Environment*

In the ASMD, brown trout larvae and juveniles exposed to venlafaxine showed a decreased total distance moved during the 18 min recording time. For control juveniles and larvae, the mean velocity increased with recording time, and the time of inactivity decreased over time. This behavioral pattern is likely to be explained by freezing behavior at the beginning of confrontation with the new setting, shifting to escape behaviour toward the end of the recordings. It disappeared in fish exposed to 1000 µg/L of the drug: these fish constantly showed a low mean velocity and long times of inactivity. Also, in juvenile fish, the same effect became evident when exposed to 1000 µg/L venlafaxine, although the difference to the controls was not significant. The cortisol concentrations measured in these individuals proved that a sudden translocation into an artificial new setting, the ASMD, is a stressful procedure for fish (Wendelaar Bonga, 1997). In this context, venlafaxine-exposed fish proved to be less stressed and more 'relaxed' under these conditions compared to controls. This reflects the anxiolytic mode of action of venlafaxine in humans. Venlafaxine is a very receptor specific antidepressant (Holliday & Benfield, 1995) and to our knowledge no mutagenicity or teratogenicity was reported yet (Furu *et al.*, 2015). Moreover, LC<sub>50</sub>-values of venlafaxine are regarded above 100 mg/L in rainbow trout (Merck KGaA, 2017; Pfizer Pharmaceutical Group, 2011), and our highest test concentrations are far below this LC<sub>50</sub>. In addition, effects already appeared at concentrations down to 10 µg/L, where no effects on mortality were apparent. Furthermore, the histopathology of

these same fish did also not reflect general toxicity (Ziegler *et al.*, 2020a). Therefore, it is unlikely that the behavioral changes are due to unspecific toxicity, but most likely the effects shown here are due to the anti-anxiety mode of action of venlafaxine. Furthermore, in larval brown trout, this anxiolytic effect was stronger and occurred at lower concentrations than in juveniles, which could be due to the much longer exposure time of the larvae. However, different sensitivities with respect to the life stage cannot be excluded as Schwarz *et al.* (2017) also showed differences in the sensitivity of different life stages of brown trout to the pharmaceutical diclofenac. A retarded swimming in the same experimental setup under stressful conditions was already observed in brown trout exposed to citalopram (Ziegler *et al.*, 2020b). Painter *et al.* (2009) showed reduced escape behavior in venlafaxine-exposed fathead minnow larvae. And also in other fish species, a reduced activity under stressful conditions after exposure to different antidepressants was reported frequently (Demin *et al.*, 2017; Kellner *et al.*, 2017; Maulvault *et al.*, 2018; Meshalkina *et al.*, 2018; Saaristo *et al.*, 2017). But also in respect to this testing procedure, contradictory results do exist. Three-spined sticklebacks exposed to 1.5 µg/L citalopram for 21 days showed decreased freezing and increased swimming behaviour in the novel tank test (Kellner *et al.*, 2016).

### *Hazard Assessment*

The effects we found in our study, in concentration ranges down to 10 µg/L, result in a NOEC of 1 µg/L for behavior under stressful conditions and length of brown trout larvae. This concentration range is comparable to results found in literature, including (Maulvault *et al.*, 2019; Melnyk-Lamont *et al.*, 2014; Painter *et al.*, 2009; Sehonova *et al.*, 2019). Fick *et al.* (2010) calculated the critical environmental concentration (CEC) for 500 pharmaceuticals and derived a CEC for venlafaxine of 6.112 µg/L. Taken together, results from literature and our NOEC are below this CEC and partly below measured environmental concentrations in surface waters and wastewater effluents (Golovko *et al.*, 2014; Lajeunesse *et al.*, 2012; Schultz *et al.*, 2010). Accordingly, the environmental risk of venlafaxine cannot be excluded. Additionally, the antidepressant venlafaxine was already in focus of risk assessment studies, in which an environmental risk by venlafaxine could be deduced (Fernández-Rubio *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019). As a last consequence, venlafaxine and its main metabolite were incorporated to the surface water watch list of the water framework directive in August 2020 (EU, 2020).

### *Conclusion*

We could demonstrate that, in both larvae and juveniles, venlafaxine exerts an anti-anxiety effect in brown trout as it does in humans, with a lowest observed effect concentration (LOEC) of 10 µg/L which is only a single decimal order of magnitude above environmentally relevant concentrations. The most sensitive parameters were the cautiousness in an unfamiliar surrounding area, together

with decreased growth. In nature, the combination of these changes likely makes early life stages of fish to become an easier prey for predators. Due to such high potential relevance for the survival of fish offspring and the rather small difference between LOEC and environmentally relevant concentrations, the risk posed by venlafaxine in the environment should not be neglected, particularly when interacting in concert with other pharmaceuticals.

## Additional Informations and declarations

### *Data availability statement*

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://effectnet-seek.bioquant.uni-heidelberg.de/investigations/9>.

### *Ethics statement*

The animal study was reviewed and approved by Animal welfare committee of the Regional Council of Tübingen, Germany (authorisation ZO 2/16).

### *Authors contributions*

MZ conceived, designed and performed the experiments, analysed the data and prepared the figures and tables and wrote the first draft of the paper and edited according to the coauthors. MB, RB, SS, and ST analysed part of the Data and contributed parts to the first draft of the paper as well as reviewed drafts of the paper and approved the final draft. H-R.K, CH, and CZ contributed reagents/materials/analysis tools reviewed drafts of the paper and approved the final draft. RT conceived and designed the experiments and contributed reagents/materials/ analysis tools as well as reviewed the first draft of the paper and approved the final draft.

### *Funding*

We would like to thank the Ministry for Science, Research and Arts of Baden-Württemberg for funding the Effect-Net (Effect Network in Water Research) project, which is part of the Water Research Network Baden-Württemberg (Wassernetzwerk Baden-Württemberg). We acknowledge support by Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

### *Acknowledgements*

Further, we thank the Open Access Publishing Fund of University of Tübingen for support. Thanks go to Thomas Braunbeck for coordinating the project. Furthermore, the authors thank Stefanie Jacob, Stefanie Kraus, Elisabeth May, Katharina Peschke, Hannah Schmiege and Sabrina Wilhelm for help in the laboratory and technical assistance, and Stefanie Dietz for comments on the manuscript.

### *Supplementary material*

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2020.586584/full#supplementary-material>.

### *Conflict of interest:*

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## References

- Acuña, V., von Schiller, D., García-Galán, M. J., Rodríguez-Mozaz, S., Corominas, L., Petrovic, M., Poch, M., Barceló, D., Sabater, S. 2015.** Occurrence and in-stream attenuation of wastewater-derived pharmaceuticals in Iberian rivers, *Science of the Total Environment* 503-504:133-141; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.067.
- Ågerstrand, M., Arnold, K., Balshine, S., Brodin, T., Brooks, B. W., Maack, G., McCallum, E. S., Pyle, G., Saaristo, M., Ford, A. T. 2020.** Emerging investigator series: use of behavioural endpoints in the regulation of chemicals, *Environmental Science: Progress and Impacts* 22(1):49-65; DOI: 10.1039/c9em00463g.
- Bartlett, F., Neumann, D. 1998.** Sensitivity of Brown Trout Alevins (*Salmo trutta* L.) to Nitrite at Different Chloride Concentrations, *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 60:340-346; DOI: 10.1007/s001289900632.
- Bidel, F., Di Poi, C., Budzinski, H., Pardon, P., Callewaert, W., Arini, A., Basu, N., Dickel, L., Bellanger, C., Jozet-Alves, C. 2016.** The antidepressant venlafaxine may act as a neurodevelopmental toxicant in cuttlefish (*Sepia officinalis*), *Neurotoxicology* 55:142-153; DOI: 10.1016/j.neuro.2016.05.023.
- Brown, D. A., McLeay, D. J. 1975.** Effect of Nitrite on Methemoglobin and Total Hemoglobin of Juvenile Rainbow Trout, *Progressive Fish-Culturist* 37(1):36-38; DOI: 10.1577/1548-8659(1975)37[36:Eonoma]2.0.Co;2.
- Burnett, F., Dinan, T. G. 1998.** Venlafaxine. Pharmacology and Therapeutic Potential in the Treatment of Depression, *Human Psychopharmacology* 13:153-162; DOI: 10.1002/(SICI)1099-1077(199804)13:3<153::AID-HUP973>3.0.CO;2-S.
- David, A., Lange, A., Tyler, C. R., Hill, E. M. 2018.** Concentrating mixtures of neuroactive pharmaceuticals and altered neurotransmitter levels in the brain of fish exposed to a wastewater effluent, *Science of the Total Environment* 621:782-790; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.265.
- de Oliveira, R. A., Cunha, G. M., Borges, K. D., de Bruin, G. S., dos Santos-Filho, E. A., Viana, G. S., de Bruin, V. M. 2004.** The effect of venlafaxine on behaviour, body weight and striatal monoamine levels on sleep-deprived female rats, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 79(3):499-506; DOI: 10.1016/j.pbb.2004.09.001.
- Demin, K. A., Kolesnikova, T. O., Khatsko, S. L., Meshalkina, D. A., Efimova, E. V., Morzherin, Y. Y., Kalueff, A. V. 2017.** Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes, *Neurotoxicology and Teratology* 62:27-33; DOI: 10.1016/j.ntt.2017.04.002.
- DrugBank. 2020.** Venlafaxine, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00285> (18.06.2020).
- EU. 2006.** Council Directive 2006/88/EC of 24 October 2006 on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals, *Official Journal of the European Union L 328/14*, Luxembourg.

- EU. 2020.** Commission implementing decision (EU) 2020/1161 of 4 August 2020 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council *Official Journal of the European Union*, Brussels.
- Fernández-Rubio, J., Rodríguez-Gil, J. L., Postigo, C., Mastroianni, N., López de Alda, M., Barceló, D., Valcárcel, Y. 2019.** Psychoactive pharmaceuticals and illicit drugs in coastal waters of North-Western Spain: Environmental exposure and risk assessment, *Chemosphere* 224:379-389; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.02.041.
- Ferrer, I., Thurman, E. M. 2012.** Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1259:148-157; DOI: 10.1016/j.chroma.2012.03.059.
- Fick, J., Lindberg, R. H., Tysklind, M., Larsson, D. G. 2010.** Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 58(3):516-523; DOI: 10.1016/j.yrtph.2010.08.025.
- Fong, P. P., Hoy, C. M. 2012.** Antidepressants (venlafaxine and citalopram) cause foot detachment from the substrate in freshwater snails at environmentally relevant concentrations, *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 45(2):145-153; DOI: 10.1080/10236244.2012.690579.
- Fong, P. P., Molnar, N. 2013.** Antidepressants cause foot detachment from substrate in five species of marine snail, *Marine Environmental Research* 84:24-30; DOI: 10.1016/j.marenvres.2012.11.004.
- Fong, P. P., Bury, T. B., Dworkin-Brodsky, A. D., Jasion, C. M., Kell, R. C. 2015.** The antidepressants venlafaxine ("Effexor") and fluoxetine ("Prozac") produce different effects on locomotion in two species of marine snail, the oyster drill (*Urosalpinx cinerea*) and the starsnail (*Lithopoma americanum*), *Marine Environmental Research* 103:89-94; DOI: 10.1016/j.marenvres.2014.11.010.
- Foran, C. M., Weston, J., Slattery, M., Brooks, B. W., Huggett, D. B. 2004.** Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46(4):511-517; DOI: 10.1007/s00244-003-3042-5.
- Furu, K., Kieler, H., Haglund, B., Engeland, A., Selmer, R., Stephansson, O., Valdimarsdottir, U. A., Zoega, H., Artama, M., Gissler, M., Malm, H., Norgaard, M. 2015.** Selective serotonin reuptake inhibitors and venlafaxine in early pregnancy and risk of birth defects: population based cohort study and sibling design, *BMJ* 350:h1798; DOI: 10.1136/bmj.h1798.
- Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randak, T., Grabic, R. 2014.** Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant, *Chemosphere* 111:418-426; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.132.
- Grabicova, K., Lindberg, R. H., Ostman, M., Grabic, R., Randak, T., Larsson, D. G., Fick, J. 2014.** Tissue-specific bioconcentration of antidepressants in fish exposed to effluent from a municipal sewage treatment plant, *Science of the Total Environment* 488-489:46-50; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.052.

- Grabicova, K., Grabic, R., Fedorova, G., Fick, J., Cerveny, D., Kolarova, J., Turek, J., Zlabek, V., Randak, T. 2017.** Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream, *Water Research* 124:654-662; DOI: 10.1016/j.watres.2017.08.018.
- Hedgespeth, M. L., Nilsson, P. A., Berglund, O. 2014.** Ecological implications of altered fish foraging after exposure to an antidepressant pharmaceutical, *Aquatic Toxicology* 151:84-87; DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.12.011.
- Henry, T. B., Black, M. C. 2008.** Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in western mosquitofish, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54(2):325-330; DOI: 10.1007/s00244-007-9018-0.
- Hexal AG. 2019.** Gebrauchsinformation: Information für Patienten. Venlafaxin HEXAL® 37,5 mg Hartkapseln, retardiert. Venlafaxin HEXAL® 75 mg Hartkapseln, retardiert. Venlafaxin HEXAL® 150 mg Hartkapseln, retardiert, Hexal AG, Holzkirchen, [https://www.hexal.biz/praeparate/dokumente/gi/46259701\\_165x620\\_If\\_it-1575531248.pdf](https://www.hexal.biz/praeparate/dokumente/gi/46259701_165x620_If_it-1575531248.pdf) (17.06.2020).
- Himmelsbach, M., Buchberger, W., Klampfl, C. W. 2006.** Determination of antidepressants in surface and waste water samples by capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection after preconcentration using off-line solid-phase extraction, *Electrophoresis* 27(5-6):1220-1226; DOI: 10.1002/elps.200500693.
- Holliday, S. M., Benfield, P. 1995.** Venlafaxine. A Review of its Pharmacology and Therapeutic Potential in Depression, *Drugs* 49(2):280-294; DOI: 10.2165/00003495-199549020-00010.
- Kellner, M., Porseryd, T., Porsch-Hällström, I., Hansen, S. H., Olsén, K. H. 2015.** Environmentally relevant concentrations of citalopram partially inhibit feeding in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Aquatic Toxicology* 158:165-170; DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.11.003.
- Kellner, M., Porseryd, T., Hallgren, S., Porsch-Hällström, I., Hansen, S. H., Olsén, K. H. 2016.** Waterborne citalopram has anxiolytic effects and increases locomotor activity in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Aquatic Toxicology* 173:19-28; DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.12.026.
- Kellner, M., Porseryd, T., Porsch-Hällström, I., Borg, B., Roufidou, C., Olsén, K. H. 2017.** Developmental exposure to the SSRI citalopram causes long-lasting behavioural effects in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Ecotoxicology* 27(1):12-22; DOI: 10.1007/s10646-017-1866-4.
- Klemetsen, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J. B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M. F., Mortensen, E. 2003.** Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories, *Ecology of Freshwater Fish* 12:1-59; DOI: 10.1034/j.1600-0633.2003.00010.x.
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., Sauvé, S. 2008.** Determination of Basic Antidepressants and Their N-Desmethyl Metabolites in Raw Sewage and Wastewater Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry (Washington)* 80(14):5325-5333; DOI: 10.1021/ac800162q.



- Lajeunesse, A., Smyth, S. A., Barclay, K., Sauvé, S., Gagnon, C. 2012.** Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada, *Water Research* 46(17):5600-5612; DOI: 10.1016/j.watres.2012.07.042.
- Liu, Q., He, H., Yang, J., Feng, X., Zhao, F., Lyu, J. 2020.** Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study, *Journal of Psychiatric Research* 126:134-140; DOI: 10.1016/j.jpsychires.2019.08.002.
- Mackul'ak, T., Mosný, M., Škubák, J., Grabic, R., Birošová, L. 2015.** Fate of psychoactive compounds in wastewater treatment plant and the possibility of their degradation using aquatic plants, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 39(2):969-973; DOI: 10.1016/j.etap.2015.02.018.
- Martin, J. M., Saaristo, M., Bertram, M. G., Lewis, P. J., Coggan, T. L., Clarke, B. O., Wong, B. B. M. 2017.** The psychoactive pollutant fluoxetine compromises antipredator behaviour in fish, *Environmental Pollution* 222:592-599; DOI: 10.1016/j.envpol.2016.10.010.
- Maulvault, A. L., Santos, L., Paula, J. R., Camacho, C., Pissarra, V., Fogaça, F., Barbosa, V., Alves, R., Ferreira, P. P., Barceló, D., Rodriguez-Mozaz, S., Marques, A., Diniz, M., Rosa, R. 2018.** Differential behavioural responses to venlafaxine exposure route, warming and acidification in juvenile fish (*Argyrosomus regius*), *Science of the Total Environment* 634:1136-1147; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.015.
- Maulvault, A. L., Camacho, C., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Pousão-Ferreira, P., Rosa, R., Marques, A., Diniz, M. S. 2019.** Living in a multi-stressors environment: An integrated biomarker approach to assess the ecotoxicological response of meagre (*Argyrosomus regius*) to venlafaxine, warming and acidification, *Environmental Research* 169:7-25; DOI: 10.1016/j.envres.2018.10.021.
- Maximino, C., de Brito, T. M., da Silva Batista, A. W., Herculano, A. M., Morato, S., Gouveia, A., Jr. 2010a.** Measuring anxiety in zebrafish: a critical review, *Behavioural Brain Research* 214(2):157-171; DOI: 10.1016/j.bbr.2010.05.031.
- Maximino, C., Marques de Brito, T., Dias, C. A., Gouveia, A., Jr., Morato, S. 2010b.** Scototaxis as anxiety-like behavior in fish, *Nature Protocols* 5(2):209-216; DOI: 10.1038/nprot.2009.225.
- Meador, J. P., Yeh, A., Gallagher, E. P. 2017.** Determining potential adverse effects in marine fish exposed to pharmaceuticals and personal care products with the fish plasma model and whole-body tissue concentrations, *Environmental Pollution* 230:1018-1029; DOI: 10.1016/j.envpol.2017.07.047.
- Melnyk-Lamont, N., Best, C., Gesto, M., Vijayan, M. M. 2014.** The antidepressant venlafaxine disrupts brain monoamine levels and neuroendocrine responses to stress in rainbow trout, *Environmental Science and Technology* 48(22):13434-13442; DOI: 10.1021/es504331n.
- Melvin, S. D. 2017.** Effect of antidepressants on circadian rhythms in fish: Insights and implications regarding the design of behavioural toxicity tests, *Aquatic Toxicology* 182:20-30; DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.11.007.
- Mennigen, J. A., Sassine, J., Trudeau, V. L., Moon, T. W. 2010.** Waterborne fluoxetine disrupts feeding and energy metabolism in the goldfish *Carassius auratus*, *Aquatic Toxicology* 100(1):128-137; DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.07.022.

- Merck KGaA. 2017.** Safety Data Sheet according to Regulation (EC) No. 07/2006, Venlafaxine Hydrochloride, [https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/msds/EMD\\_BIO-506135?Origin=accelerator-singlestep-msds](https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/msds/EMD_BIO-506135?Origin=accelerator-singlestep-msds) (09.12.2020).
- Meshalkina, D. A., Kysil, E. V., Antonova, K. A., Demin, K. A., Kolesnikova, T. O., Khatsko, S. L., Gainetdinov, R. R., Alekseeva, P. A., Kalueff, A. V. 2018.** The Effects of Chronic Amitriptyline on Zebrafish Behavior and Monoamine Neurochemistry, *Neurochemical Research* 43(6):1191-1199; DOI: 10.1007/s11064-018-2536-5.
- Moermond, C. T., Kase, R., Korkaric, M., Ågerstrand, M. 2016.** CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(5):1297-1309; DOI: 10.1002/etc.3259.
- Molony, B. 2001.** Environmental requirements and tolerances of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown trout (*Salmo trutta*) with special reference to Western Australia: A review, *Fisheries Research Report, Department of Fisheries, Western Australia*, 130, ISBN: 0 7309 8458 3.
- Olsén, K. H., Ask, K., Olsén, H., Porsch-Hällström, I., Hallgren, S. 2014.** Reprint of "Effects of the SSRI citalopram on behaviours connected to stress and reproduction in Endler guppy, *Poecilia wingei*", *Aquatic Toxicology* 151:97-104; DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.02.011.
- Paíga, P., Santos, L., Ramos, S., Jorge, S., Silva, J. G., Delerue-Matos, C. 2016.** Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation, *Science of the Total Environment* 573:164-177; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.089.
- Painter, M. M., Buerkley, M. A., Julius, M. L., Vajda, A. M., Norris, D. O., Barber, L. B., Furlong, E. T., Schultz, M. M., Schoenfuss, H. L. 2009.** Antidepressants at Environmentally Relevant Concentrations affect Predator Avoidance Behavior of Larval Fathead Minnows (*Pimephales promelas*), *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12):2677-2684; DOI: 10.1897/08-556.1.
- Parrott, J. L., Metcalfe, C. D. 2017.** Assessing the effects of the antidepressant venlafaxine to fathead minnows exposed to environmentally relevant concentrations over a full life cycle, *Environmental Pollution* 229:403-411; DOI: 10.1016/j.envpol.2017.06.009.
- Parrott, J. L., Metcalfe, C. D. 2018.** Nest-defense behaviors in fathead minnows after lifecycle exposure to the antidepressant venlafaxine, *Environmental Pollution* 234:223-230; DOI: 10.1016/j.envpol.2017.11.049.
- Parrott, J. L., Metcalfe, C. D. 2019.** Assessing the effects of environmentally relevant concentrations of antidepressant mixtures to fathead minnows exposed over a full life cycle, *Science of the Total Environment* 648:1227-1236; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.237.
- Pfizer Pharmaceutical Group. 2011.** Material Safety Data Sheet, Venlafaxine Hydrochloride, [https://pfe-pfizercom-d8-prod.s3.amazonaws.com/products/material\\_safety\\_data/PZ01391.pdf](https://pfe-pfizercom-d8-prod.s3.amazonaws.com/products/material_safety_data/PZ01391.pdf) (09.12.2020).
- Rodrigues, A., Borges, F. O., Pissarra, V., Luisa Maulvault, A., Paula, J. R., Bispo, R., Rosa, R. 2019.** First indication of deleterious impacts in white-seabream larvae (*Diplodus sargus*) survival and behaviour following acute venlafaxine exposure, *Ecotoxicology* 28(6):612-618; DOI: 10.1007/s11064-019-02057-7.

- Saaristo, M., McLennan, A., Johnstone, C. P., Clarke, B. O., Wong, B. B. M. 2017.** Impacts of the antidepressant fluoxetine on the anti-predator behaviours of wild guppies (*Poecilia reticulata*), *Aquatic Toxicology* 183:38-45; DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.12.007.
- Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M. G., Brooks, B. W., Ehlman, S. M., McCallum, E. S., Sih, A., Sundin, J., Wong, B. B. M., Arnold, K. E. 2018.** Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife, *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* 285(1885); DOI: 10.1098/rspb.2018.1297.
- Sackerman, J., Donegan, J. J., Cunningham, C. S., Nguyen, N. N., Lawless, K., Long, A., Benno, R. H., Gould, G. G. 2010.** Zebrafish Behavior in Novel Environments: Effects of Acute Exposure to Anxiolytic Compounds and Choice of *Danio rerio* Line, *International Journal of Comparative Psychology* 23(1):43-61; PMCID: PMC2879659.
- Schlüsener, M. P., Hardenbicker, P., Nilson, E., Schulz, M., Viergutz, C., Ternes, T. A. 2015.** Occurrence of venlafaxine, other antidepressants and selected metabolites in the Rhine catchment in the face of climate change, *Environmental Pollution* 196:247-256; DOI: 10.1016/j.envpol.2014.09.019.
- Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L. B., Blazer, V. S., Norris, D. O., Vajda, A. M. 2010.** Antidepressant Pharmaceuticals in Two U.S. Effluent-Impacted Streams: Occurrence and Fate in Water and Sediment, and Selective Uptake in Fish Neural Tissue, *Environmental Science and Technology* 44:1918-1925; DOI: 10.1021/es9022706.
- Schultz, M. M., Painter, M. M., Bartell, S. E., Logue, A., Furlong, E. T., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L. 2011.** Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows, *Aquatic Toxicology* 104(1-2):38-47; DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.03.011.
- Schwabe, U., Paffrath, D., Ludwig, W.-D., Klauber, J. 2019.** Arzneiverordnungsreport 2019, *Springer-Verlag GmbH, Berlin*, ISBN: 978-3-662-59045-4.
- Schwarz, S., Schmiege, H., Scheurer, M., Köhler, H.-R., Triebkorn, R. 2017.** Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta f. fario*, *Science of the Total Environment* 607-608:1026-1036; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.042.
- Sehonova, P., Hodkovicova, N., Urbanova, M., Örn, S., Blahova, J., Svobodova, Z., Faldyna, M., Chloupek, P., Briedikova, K., Carlsson, G. 2019.** Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians, *Environmental Pollution* 254(Pt A):112999; DOI: 10.1016/j.envpol.2019.112999.
- Smith, C. E., Williams, W. G. 1974.** Experimental Nitrite Toxicity in Rainbow Trout and Chinook Salmon, *Transactions of the American Fisheries Society* 103(2):389-390; DOI: 10.1577/1548-8659(1974)103<389:Entirt>2.0.Co;2.
- Stahl, S. M. 1998.** How to Appease the Appetite of Psychotropic Drugs, *Journal of Clinical Psychiatry* 59(10):500-501; DOI: 10.4088/jcp.v59n1001
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., Kalueff, A. V. 2012.** Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review, *Neuropharmacology* 62(1):135-143; DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.037.

- Thompson, W. A., Vijayan, M. M. 2020.** Environmental levels of venlafaxine impact larval behavioural performance in fathead minnows, *Chemosphere* 259:127437; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127437.
- Wells, P. R., Pinder, A. W. 1996.** The respiratory development of atlantic salmon. I. Morphometry of gills, yolk sac and body surface, *Journal of Experimental Biology* 199:2725-2736; PMID: 9320637.
- Wendelaar Bonga, S. E. 1997.** The Stress Response in Fish, *Physiological Reviews* 77(3):591-625; DOI: 10.1152/physrev.1997.77.3.591.
- WHO. 2019.** ATC/DDD Index 2020, [https://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/](https://www.whocc.no/atc_ddd_index/) (18.06.2020).
- Wittchen, H. U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jönsson, B., Olesen, J., Allgulander, C., Alonso, J., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Jennum, P., Lieb, R., Maercker, A., van Os, J., Preisig, M., Salvador-Carulla, L., Simon, R., Steinhausen, H. C. 2011.** The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010, *European Neuropsychopharmacology* 21(9):655-679; DOI: 10.1016/j.euroneuro.2011.07.018.
- Wu, M., Liu, S., Hu, L., Qu, H., Pan, C., Lei, P., Shen, Y., Yang, M. 2017.** Global transcriptomic analysis of zebrafish in response to embryonic exposure to three antidepressants, amitriptyline, fluoxetine and mianserin, *Aquatic Toxicology* 192:274-283; DOI: 10.1016/j.aquatox.2017.09.027.
- Zhou, S., Di Paolo, C., Wu, X., Shao, Y., Seiler, T. B., Hollert, H. 2019.** Optimization of screening-level risk assessment and priority selection of emerging pollutants - The case of pharmaceuticals in European surface waters, *Environment International* 128:1-10; DOI: 10.1016/j.envint.2019.04.034.
- Ziegler, M., Eckstein, H., Ottmann, S., Reinelt, L., Stepinski, S., Köhler, H.-R., Triebkorn, R. 2020a.** Biochemical and cellular biomarkers in brown trout (*Salmo trutta f. fario*) in response to the antidepressants citalopram and venlafaxine, *Environmental Sciences Europe* 32(158); DOI: 10.1186/s12302-020-00437-z.
- Ziegler, M., Knoll, S., Köhler, H.-R., Tisler, S., Huhn, C., Zwiener, C., Triebkorn, R. 2020b.** Impact of the antidepressant citalopram on the behaviour of two different life stages of brown trout, *PeerJ* 8(e8765); DOI: 10.7717/peerj.8765.

## Kapitel III:

### Biochemical and cellular biomarkers in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) in response to the antidepressants citalopram and venlafaxine

Michael Ziegler<sup>1</sup>, Helene Eckstein<sup>1</sup>, Shannon Ottmann<sup>1</sup>, Lukas Reinelt<sup>1</sup>, Sabine Stepinski<sup>1</sup>, Heinz-R. Köhler<sup>1</sup>, Rita Triebkorn<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Auf der Morgenstelle 5, 72076 Tübingen, Germany

<sup>2</sup>Steinbeis Transfer Center for Ecotoxicology and Ecophysiology, Blumenstraße 13, 72108 Rottenburg, Germany

Environmental Sciences Europe 32(158), DOI: [10.1186/s12302-020-00437-z](https://doi.org/10.1186/s12302-020-00437-z)

#### Abstract

**Background:** During the last decades, a worldwide increase in the number of cases of depression accompanied by rising prescription rates of antidepressants was recorded. In Germany, the two most prescribed antidepressants are the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) citalopram and the serotonin and noradrenalin reuptake inhibitor (SNRI) venlafaxine, taking about 30 % of the market share. Both antidepressants are found frequently in surface waters and have the potential of adversely affecting aquatic organisms. Most studies dealing with antidepressants address apical endpoints and behaviour; however, only few studies investigate biochemical biomarkers and histopathological alterations. We conducted citalopram and venlafaxine exposure experiments over 5 months, starting with brown trout eggs in the eyed-ova stage, as well as with juvenile brown trout for 4 weeks. Exposure concentrations ranged from environmentally relevant 1 µg/L up to 1 mg/L. In this study, we investigated the effects of the antidepressants on b-esterase activity (neurotoxicity), stress protein level (proteotoxicity) and superoxide dismutase activity (oxidative stress). Additionally, we assessed the health status of the liver by means of histopathological analyses.

**Results:** We were able to show that both antidepressants did neither induce proteotoxic nor neurotoxic effects in brown trout. But for venlafaxine, the biochemical biomarker for oxidative stress (superoxide dismutase activity) was significantly increased in larvae exposed to at least 10 µg/L venlafaxine at 7 °C. With regard to liver histopathology, fish exposed to higher citalopram concentrations were in a worse health condition than control fish irrespective of their life stage. Also, the energy storage of fish exposed to 1 mg/L citalopram was reduced.

**Conclusion:** Thus, we here report citalopram-dependent histopathological alterations in brown trout liver, and the induction of oxidative stress by venlafaxine.

**Keywords:** Histopathology, Fish, B-esterase, Acetylcholinesterase, Superoxide dismutase, Hsp70, SNRI, SSRI

## Background

Depression is one of the most common mental illnesses worldwide and has undergone a continuous increase during the last decades (Liu *et al.*, 2020; Wittchen *et al.*, 2011). Worldwide, the number of cases of depression showed an increase of about 50 % since 1990 (Liu *et al.*, 2020). Associated with an increasing number of cases of depression, the number of prescribed antidepressants is constantly rising. In Germany, prescription rates of antidepressants increased about 40 % between 2009 and 2018 (Schwabe *et al.*, 2019). Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) and serotonin and noradrenalin reuptake inhibitors (SNRI) constitute the majority of antidepressants. Two of the most prescribed antidepressants worldwide are citalopram (SSRI) and venlafaxine (SNRI). They amount to about 30 % of the market share in Germany (Schwabe *et al.*, 2019). This leads to a total consumption of 4.5 t (262.3 million defined daily doses (DDD)) of citalopram and 20.5 t (205.4 million DDD) of venlafaxine in 2018 in Germany only (Schwabe *et al.*, 2019). Both antidepressants affect a similar biochemical pathway by inhibiting the reuptake of neurotransmitters from the synaptic cleft. Due to this, citalopram increases the serotonin level and venlafaxine the serotonin and noradrenaline level in the synaptic cleft (Bezchlibnyk-Butler *et al.*, 2000; Holliday & Benfield, 1995). Both are known to be metabolised in liver and kidney of the human body. However, 12 – 23 % of citalopram and 4.7 – 10 % of venlafaxine are excreted unmetabolised via the urine and, therefore, enter wastewater treatment plants (Burnett & Dinan, 1998; Holliday & Benfield, 1995; Mackul'ak *et al.*, 2015; Noble & Benfield, 1997). There, 18 – 27 % of the citalopram is degraded, while the degradation of venlafaxine is even less efficient, amounting to 1 – 19 % (Golovko *et al.*, 2014; Lajeunesse *et al.*, 2012). Therefore, both antidepressants are found frequently in surface waters around the world (Ferrer & Thurman, 2012; Fick *et al.*, 2009; Grabicova *et al.*, 2017; Himmelsbach *et al.*, 2006; Lajeunesse *et al.*, 2008; Nödler *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 2010). Citalopram surface water concentrations commonly range from 4 ng/L to 219 ng/L (Nödler *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 2010) but, occasionally, also concentrations of up to 8 µg/L have been found in Indian lakes (Fick *et al.*, 2009). Concentrations of citalopram in wastewater treatment plant effluents are usually in the range of 44 – 431 ng/L (Himmelsbach *et al.*, 2006; Nödler *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014), but exceptional high concentrations up to 76 µg/L citalopram was found downstream of an Indian wastewater treatment plant, and up to 840 µg/L in the effluent of an Indian drug manufacturer (Fick *et al.*, 2009; Larsson *et al.*, 2007). Venlafaxine concentrations in surface waters are higher than those for citalopram and range between 8 and 690 ng/L in wastewater-dominated streams (Ferrer & Thurman, 2012; Grabicova *et al.*, 2017; Himmelsbach *et al.*, 2006). Moreover, up to 2.5 µg/L venlafaxine was found in wastewater effluents (Lajeunesse *et al.*,

2012). Being detected in such high concentrations, the effects of antidepressants, particularly of venlafaxine and citalopram, on aquatic life are important to being investigated. For both antidepressants, most studies were conducted regarding behavioural and apical endpoints in several fish species (Brodin *et al.*, 2014; Sehonova *et al.*, 2018). Behavioural changes in fish following exposure to venlafaxine or citalopram include changes in circadian rhythm (Melvin, 2017), decreased escape behaviour (Painter *et al.*, 2009), reduced attacks on food (Kellner *et al.*, 2015), changes in swimming behaviour (Kellner *et al.*, 2017; Maulvault *et al.*, 2018) and increased curiosity (Kellner *et al.*, 2016). With regard to biochemical or structural biomarkers, however, knowledge about possible effects of citalopram and venlafaxine in fish is scarce (Maulvault *et al.*, 2019; Schultz *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). While venlafaxine did not affect the activity of the enzymes citrate synthase, catalase and pyruvate kinase in zebrafish, effects on superoxide dismutase (SOD) and acetylcholine esterase activities and the heat shock response were detected in fish exposed to different antidepressants (Maulvault *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). With respect to possible histopathological consequences in fish, different results have been reported. Fathead minnow exposed to either venlafaxine, fluoxetine or sertraline did not reveal any histological effects in liver (Schultz *et al.*, 2011), while zebrafish and *Chichlosoma dimerus* exposed to fluoxetine, sertraline, paroxetine or mianserine showed histopathological alterations in liver, spleen and head kidney (Nowakowska *et al.*, 2020; Rey Vázquez *et al.*, 2020). Thus, no consistent picture of possible effects of these pharmaceuticals on suborganismic effects in aquatic species can be drawn. In addition, data on the interplay of antidepressants and the confounding factor temperature are lacking up to now, and potential variation in the sensitivity of different life stages of fish has not been investigated so far. Consequently, we conducted experiments with brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*), a feral fish species at different life stages at two temperatures. Brown trout are a sensitive monitoring organism with a high ecological relevance in Central Europe (Dußling & Berg, 2001; Klemetsen *et al.*, 2003). Eggs in the eyed-ova stage and juvenile fish were exposed to environmentally relevant and explicitly higher concentrations of the antidepressants citalopram and venlafaxine with focus on neurotoxicity (b-esterase activity), oxidative stress (SOD activity), proteotoxicity (stress protein level) and liver histopathology (overall health condition). B-esterases, including acetylcholinesterase and carboxylesterases among others, are enzymes that are inhibited by paraxon (Aldridge, 1952; Laguerre *et al.*, 2009). Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme present in the synaptic cleft of cholinergic synapses, hydrolysing the neurotransmitter acetylcholine into its subcomponents acetic acid and choline (Rault *et al.*, 2008). AChE is inhibited by various substances, such as carbamates or organophosphates and, thus, their inhibition can be seen as an adequate biomarker for neurotoxicity (Xie *et al.*, 2015). Carboxylesterases (CbE) are known to detoxify insecticides like organophosphates, carbamates or pyrethroids and protectively counteract

organophosphate-induced acetylcholinesterase inhibition (Carr & Chambers, 1991; Sanchez-Hernandez *et al.*, 2009). It has already been shown that antidepressants like citalopram, fluoxetine or sertraline affect acetylcholinesterase activity in aquatic organisms (Munari *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017). Superoxide dismutase (SOD) is an enzyme of the first line of the antioxidant defence system that catalyzes the dismutation of  $O_2^-$  radicals to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). This compound can subsequently be decomposed to water and oxygen, catalyzed by the enzyme catalase (Regoli & Giuliani, 2014; Xie *et al.*, 2015). Reactive oxygen species (ROS) are formed in several biological reactions; however, they can also be induced by xenobiotics (Pedrajas *et al.*, 1995). These ROS including superoxide radicals ( $O_2^-$ ) are known to react with proteins, DNA and lipids resulting in oxidative stress for the organism (Vutukuru *et al.*, 2006). Therefore, an increased SOD activity is accompanied by an increased amount of ROS and, thus, represents an appropriate biomarker for oxidative stress (Valavanidis *et al.*, 2006). An increased SOD activity has been shown in amitriptyline-exposed zebrafish (Yang *et al.*, 2014), sertraline-exposed goldfish (Xie *et al.*, 2015), venlafaxine-exposed meagre (*Argyrosomus regius*) (Maulvault *et al.*, 2019) and citalopram-exposed daphnids (Yang *et al.*, 2017). Stress proteins or heat shock proteins with 70 kDa molecular weight (Hsp70) are chaperones, that bind to unfold, misfolded or newly synthesised proteins to assist correct folding to the native protein (Feder & Hofmann, 1999; Fink, 1999). These Hsp70s are induced by an increased portion of misfolded proteins in the cytoplasm and their induction is, therefore, regarded as a suitable biomarker for proteotoxicity (Köhler *et al.*, 2001). Maulvault *et al.* (2019) have shown an elevated heat shock protein response and ubiquitin level in meagre exposed to venlafaxine. The liver is the main metabolic organ of vertebrates and is responsible for many vital functions like the metabolism of proteins, lipids and carbohydrates, as well as the detoxification of xenobiotics (Rodriguez & Fanta, 1998). Therefore, histopathological investigation of the liver is a powerful tool to assess sublethal effects of xenobiotics in fish (Bernet *et al.*, 1999; Jacob *et al.*, 2019; Triebkorn *et al.*, 2007). In zebrafish exposed to the antidepressants sertraline, paroxetine or mianserine, a reduced proliferation of liver hepatocytes has been detected (Nowakowska *et al.*, 2020). Changes in liver-associated macrophage centres were shown in fluoxetine-exposed *Chichlosoma dimerus* (Rey Vázquez *et al.*, 2020). The present study has been designed to complement existing data on citalopram and venlafaxine toxicity exerted on freshwater organisms, particularly with respect to biochemical and cytological effects of these two compounds. Therefore, we hypothesise that the antidepressants citalopram and venlafaxine alter enzyme activity and change the histological structure in the liver, resulting in health impairment of the fish. Behavioural and apical endpoints that, furthermore, have been investigated in our experiments have been previously published (Ziegler *et al.*, 2020; Ziegler *et al.*, 2021).



## Materials and methods

### *Test organisms*

Juvenile brown trout and brown trout eggs were purchased from a commercial trout farm in Southern Germany (Forellenzucht Lohmühle, Alpirsbach-Ehlenbogen, Germany). This commercial fish breeder is listed as disease free (category I) according to the EC Council Directive (EU, 2006). The eggs were obtained in the eyed-ova stage and directly transferred into the experiments. Experiments with brown trout larvae took place in two climate chambers set on 7 °C or 11 °C, respectively, with a 10:14 h light-dark-cycle. Prior to the experiments, juvenile brown trout were kept in an acclimation tank for at least 1 week. Experiments with juvenile brown trout were carried out in a climate chamber at 7 °C and the same photoperiod. All animal experiments were approved by the animal welfare committee of the Regional Council of Tübingen, Germany (ZO 2/16).

### *Test substances*

Citalopram hydrobromide ( $C_{20}H_{21}FN_2O \cdot HBr$ , CAS: 59729-32-7) and venlafaxine hydrochloride ( $C_{17}H_{27}NO_2 \cdot HCl$ , CAS: 99300-78-4) were obtained by Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Citalopram and venlafaxine stock solutions with concentrations of 1 and 100 mg/L were prepared with double distilled water and diluted to the respective test concentrations with filtered tap water (iron filter, active charcoal filter, particle filter). The concentrations refer to the respective free base substance (citalopram:  $C_{20}H_{21}FN_2O$ ; venlafaxine:  $C_{17}H_{27}NO_2$ ).

### *Exposure conditions*

In both experiments, measured chemical concentrations only differed slightly from nominal concentrations by 16 % for venlafaxine and 19 % for citalopram on the average, and limnochemical analyses revealed optimal test conditions with respect to temperature ( $\pm 1.5$  °C), oxygen content (>90 %), pH (7 – 8.5) and conductivity (450 – 525  $\mu S/cm$ ). Detailed data can be taken from (Ziegler *et al.*, 2020; Ziegler *et al.*, 2021).

### *Experiments with brown trout larvae*

As described previously (Ziegler *et al.*, 2020; Ziegler *et al.*, 2021), the eyed-ova staged eggs of brown trout were exposed in a semi-static randomised three-block design at 7 °C and 11 °C. The respective nominal exposure concentrations of either citalopram or venlafaxine were 0, 1, 10, 100, 1000  $\mu g/L$ . Fish were exposed in 25 L aquaria containing 10 L of the respective test solution, half of which was renewed twice a week. From the total yolk sac consumption until the end of the experiment, fish were fed daily 3 % of body weight with commercial trout feed (first 0.5 mm, then 0.8 mm, Inico Plus, Biomar, Brande, Denmark). Fish were exposed until eight respectively seven weeks after yolk sac consumption in the citalopram (7 °C: 135 days, 11 °C: 107 days) respectively venlafaxine experiment (7 °C: 128 days, 11 °C: 105 days). At the end of the experiments, fish were euthanised with an

overdose of the anaesthetic MS222 (1 g/L tricaine methanesulphonate buffered with NaHCO<sub>3</sub>), followed by a cervical spine cut. Subsequently, fish were dissected. Livers were used for histopathology, heads for analyses of the b-esterase activity and the dorsal body part containing muscle, kidney and spinal cord for testing superoxide dismutase activity (only for the venlafaxine experiment). Livers were directly fixed in 2 % glutardialdehyde (GA) dissolved from 25 % GA with cacodylic buffer (0.1 M, pH 7.6) and stored at 4 °C until further processing. Samples for superoxide dismutase activity analysis were rinsed in PBS buffer (pH 7.4), and, along with the samples taken for b-esterase activity, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

### *Experiments with juvenile brown trout*

As described in previous publications (Ziegler *et al.*, 2020; Ziegler *et al.*, 2021), juvenile brown trout were exposed to 0, 1, 10, 100 and 1000 µg/L of either citalopram or venlafaxine at 7 °C in a semistatic randomised block design with three replicates. Ten fish were exposed in 25 L tanks containing 15 L of the respective concentrations. Twice a week, half of the respective test solution was replaced by freshly prepared test medium. Trout were fed 3 % of body weight daily (0.8 mm, Inico Plus, Biomar, Brande, Denmark). After approximately 4 weeks of exposure (citalopram experiment: 28 days, venlafaxine experiment: 25 days), fish were euthanised with an overdose of MS222 (1 g/L buffered with NaHCO<sub>3</sub>) followed by a cervical spine cut. Samples were taken from the liver for histopathological analyses, the head was used for analyses of b-esterase activity, the dorsal part of the body containing mainly muscle and kidney was taken for superoxide dismutase testing (only venlafaxine experiment), and the gills were used for stress protein analysis. Liver samples were directly fixed in 2 % glutardialdehyde (GA) dissolved from 25 % GA with cacodylic buffer (0.1 M, pH 7.6) and stored at 4 °C. Samples for superoxide dismutase activity were rinsed in PBS buffer (pH 7.4) and, along with samples for the other biochemical biomarkers, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

### *Histopathology*

After at least 1 week of fixation, samples were washed three times with cacodylic buffer (0.1 M, pH 7.6), dehydrated in an ascending ethanol series, followed by 2-propanolol as an intermedium and infiltrated with paraffin wax in a tissue processor (TP 1020, Leica, Wetzlar, Germany). Afterwards, 3 µm sections were cut with a sledge microtome (SM 2000 R, Leica, Wetzlar, Germany). One of the microscope slides was stained with haematoxylin-eosin as an overview staining, and every other slide with alcian blue in combination with periodic acid-Schiff reagent (alcian blue-PAS) as a stain for glycogen and mucopolysaccharides. Slides were visually analysed using a light microscope (Axioskop 2, Zeiss, Oberkochen, Germany). A first evaluation of all samples was conducted to get an overview and to qualitatively assess occurring pathological changes. In a second round, samples were

re-labelled in a randomised order to obtain an observer-blinded assessment. The second evaluation was semi-quantitative, in which samples were classified into five different categories (1 - control, 2 - slight reaction, 3 - moderate reaction, 4 - strong reaction, 5 - destruction) according to the criteria described by Triebkorn *et al.* (2008). Additionally, the glycogen content of the samples was classified into three categories (1 - low, 2 - medium, 3 - high glycogen content).

### *Biochemical biomarkers*

#### Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured in venlafaxine-exposed fish only, using the superoxide dismutase assay kit by Cayman Chemical (Item No. 706002, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA). Tissues were homogenised in HEPES buffer (20 mM HEPES, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, pH 7.2, tissue/buffer ratio 1:5 w/v) with a pestle, and subsequently centrifuged ( $1500 \times g$ , 5 min, 4 °C). After centrifugation, the supernatant was taken, mixed with Tris-HCl buffer (50 mM, pH 8) (supernatant/buffer ratio 1:30 w/v) and stored at -80 °C. Before performing the assay, the radical detector solution was freshly prepared from 19.95 mL assay buffer (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM DTPA, 0.1 mM Hypoxanthine) and 50 µL tetrazolium salt solution (Item No. 706004, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA). Additionally, the SOD-standard curve (0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 SOD activity (U/mL)) was freshly prepared containing bovine erythrocyte SOD (Item No. 706005, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA). The assay was performed in 96-well plates with each well being filled with 200 µL radical detector. In the first wells, 10 µL of the standard and in the remaining wells, 10 µL sample was pipetted in duplicates. Subsequently, 50 µL xanthine oxidase (Item No. 706006, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) was mixed with 1.95 mL assay buffer. 20 µL of this solution was given in each well; the plate was sealed with adhesive foil and incubated for 30 min at room temperature. Subsequently, the plate was measured photometrically at 450 nm and the SOD activity was calculated according to the following equation: Results are expressed as unit (U)/mL. One unit is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50 % of the superoxide radical.

$$\left[ \left( \frac{\text{sample linearised rate} - y \text{ intercept}}{\text{slope}} \right) * \left( \frac{0.23 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}} \right) \right] * \text{sample dilution}$$

#### B-esterase activity

For measuring the b-esterase activity, fish head samples were homogenised manually in Tris-buffer (10 mM Tris, 10 mM NaCl, pH 7.3) mixed with protease inhibitors (aprotinin, leupeptin, pepstatin, antipain, trypsin). After homogenisation, samples were centrifuged ( $5000 \times g$ , 10 min, 4 °C), the supernatant was taken and 10 % glycerol was added before storage at -20 °C. The protein content of the samples was determined photometrically at 650 nm according to the method of Lowry *et al.* (1951), modified by Markwell *et al.* (1978). Bovine serum albumin was used as a standard. The determination of the acetylcholinesterase (AChE) activity was conducted according to Ellman *et al.*

(1961), modified by Rault *et al.* (2008) and measured for 5 min at 405 nm. This method has some disadvantages (Šinko *et al.*, 2007) but was used because of the convenient usage. The activity of the carboxylesterases (CbE) was analysed using the substrates 4-nitrophenylacetate (NPA) and 4-nitrophenylvalerate (NPV). Determination was conducted according to Carr & Chambers (1991) and Chanda *et al.* (1997), modified by Sanchez-Hernandez *et al.* (2009). The activity was also measured for 5 min at 405 nm. All samples were analysed in triplicates. The activity of AChE and CbE is referred to the protein content and expressed as milliunits (mU)/mg protein. One unit is defined as one micromole of substrate hydrolysed per minute.

#### Stress protein level

The quantification of 70 kDa stress proteins (Hsp70) was conducted in gill samples of the juvenile fish. Samples for larvae were not analysed in this assay due to the low weight of the samples and the high base loads of stress proteins in developing brown trout (Jacob *et al.*, 2018). Gills were homogenised with 98 % of extraction buffer and 2 % protease inhibitor (tissue/buffer ratio 1:4 w/v) according to the protocol of Dieterich *et al.* (2015). The total protein content was quantified according to Bradford (1976). For the quantification of Hsp70, a total amount of 40 µg total protein was analysed. The proteins were separated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and subsequently blotted on a nitrocellulose membrane in a semi-dry chamber according to Dieterich *et al.* (2015). Subsequently, the protein bands on the membrane were immunostained with a monoclonal  $\alpha$ -Hsp70 IgG (mouse anti-human Hsp70, Dianova, Hamburg, Germany) and secondary peroxidase-coupled  $\alpha$ -IgG (goat anti-mouse IgG conjugated to peroxidase, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA). Subsequently, membranes were stained with 4-chloro-1-naphthol until the protein bands became visible. Finally, the optical volume (= band area  $\times$  average grey scale value) of the bands was quantified by planimetry and densitometry and referred to an internal standard (brown trout total body homogenate). Results are expressed relative to the standard.

#### Statistics

Statistical analyses were performed with SAS JMP 14 software. Data for histological evaluation, either pathological classes or glycogen classes, were analysed with the likelihood-ratio  $\chi^2$  test. Whenever significant differences occurred, single comparisons between control and each treatment were also performed with the likelihoodratio  $\chi^2$  test. To correct for multiple comparisons, the  $\alpha$ -level was adjusted according to the method developed by Benjamini & Hochberg (1995). Data for biochemical biomarkers were analysed using a nested ANOVA with a subsequent post hoc Dunnett's test. If necessary, data were transformed to fulfil model assumptions. If no normal distribution could be achieved by transformation, data were analysed using a Kruskal-Wallis test with subsequent post

hoc Steel with control. If no homogeneity of variance was given, data were analysed using a Welch ANOVA with subsequent post hoc Dunnett's test. The  $\alpha$ -level was always set to 0.05.

### *CRED*

Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data (CRED) aim to improve the evaluation, transparency, reproducibility and consistency of reliability of ecotoxicological studies. For the experiment with citalopram CRED were previously published and provided by Ziegler *et al.* (2020) and, for the experiments with venlafaxine, CRED are provided in Ziegler *et al.* (2021).

## Results

### *Histopathology*

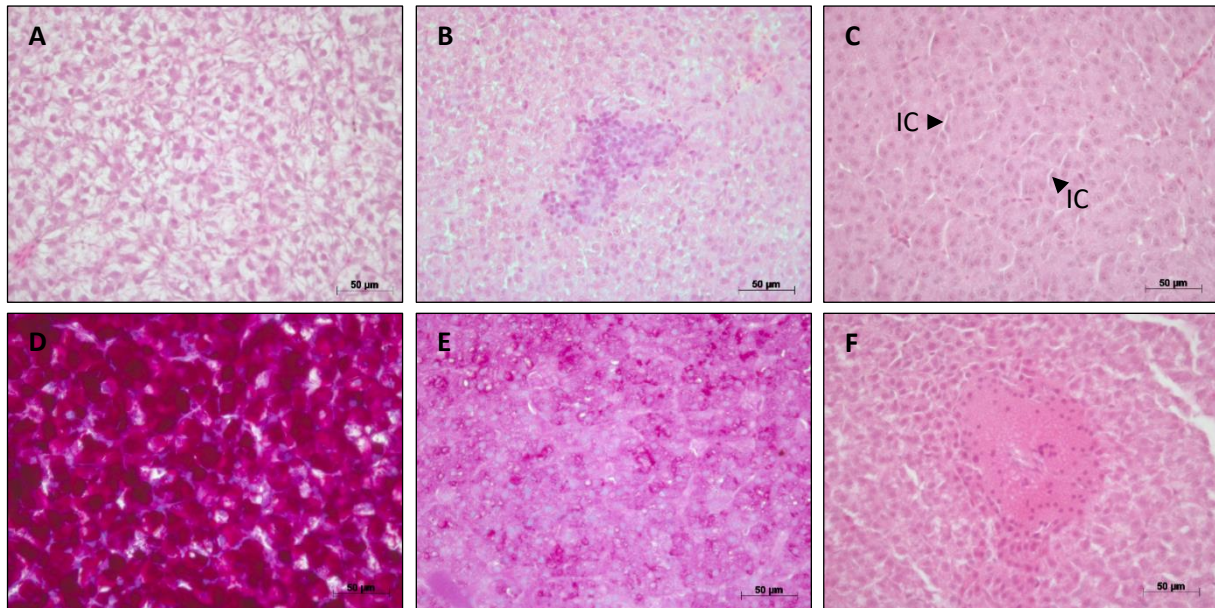


Figure 1: Histological status of brown trout livers:

**A:** control status, HE-stain, **B:** reaction status: inflammation, HE-stain, **C:** reaction status: smaller and darker hepatocytes with extended intercellular spaces (IC), HE-stain, **D:** high glycogen content in the liver of control fish, alcian-blue-PAS-stain, **E:** low glycogen content, alcian-blue-PAS-stain, **F:** destruction status: necrosis, HE-stain. All pictures show livers of brown trout larvae, but also represent adequately the depicted pathological changes in juvenile fish.

Generally, the health status of the liver was negatively affected by an exposure in the experimental setup. In the citalopram experiments, livers of the control and the 1 and 10 µg/L-exposed animals were characterised by large hepatocytes with a bright cytoplasm (Figure 1 A). In contrast, brown trout exposed to 100- and 1000 µg/L citalopram had darker cells and regularly showed hyperplasia of hepatocytes (Figure 1 C). In livers of fish exposed to 1000 µg/L citalopram, inflammations occurred more frequently (Figure 1 B). Additionally, livers of fish exposed to the highest treatment showed reduced glycogen contents compared to the control fish (Figure 1 D, E). In juvenile fish treated with 100 or 1000 µg/L citalopram, vacuolisation was more pronounced than in the controls. In all treatments, dilated capillaries, necrosis and macrophages occurred (Figure 1 C, F). When comparing the overall health status of the larvae, those animals exposed at 11 °C generally were in a worse condition than fish exposed at 7 °C. Livers of larvae exposed to 1000 µg/L citalopram at 11 °C and those exposed to 100 µg/L citalopram at 7 °C, as well as juvenile brown trout exposed to 1000 µg/L citalopram were in a significantly worse condition than livers of control fish (Figure 2 A – C) (brown trout larvae 11 °C: likelihood-ratio  $\chi^2$  test:  $df = 16$ ,  $\chi^2 = 30.986$ ,  $p = 0.0135$ , pairwise comparison [control|1000 µg/L]  $p = 0.0036$ ; brown trout larvae 7 °C: likelihood-ratio  $\chi^2$  test:  $df = 16$ ,  $\chi^2 = 40.467$ ,  $p = 0.0007$ , pairwise comparison [control|1000 µg/L]  $p = 0.0047$ ; juvenile brown trout: likelihood-ratio  $\chi^2$  test:  $df = 16$ ,  $\chi^2 = 30.706$ ,  $p = 0.0147$ , pairwise comparison [control|1000 µg/L]  $p = 0.0095$ ). Furthermore, brown trout larvae treated with 1000 µg/L citalopram had a significantly decreased

glycogen content when exposed at 11 °C (Figure 2 D) (brown trout larvae 11 °C: likelihood-ratio  $\chi^2$  test:  $df = 8$ ,  $\chi^2 = 48.951$ ,  $p < 0.0001$ , pairwise comparison [control|1000  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.0008$ ). Both, brown trout larvae exposed to 1000  $\mu\text{g/L}$  at 7 °C and juvenile brown trout exposed to 1000  $\mu\text{g/L}$  had tendentially a lower glycogen content than the control (Figure 2 E, F). However, this effect was not significant (brown trout larvae 7 °C: likelihoodratio  $\chi^2$  test:  $df = 8$ ,  $\chi^2 = 19.807$ ,  $p = 0.0111$ , pairwise comparison revealed no difference to control; juvenile brown trout: likelihood-ratio  $\chi^2$  test:  $df = 8$ ,  $\chi^2 = 8.804$ ,  $p = 0.3591$ ). Generally, the glycogen content appeared to be lower in juvenile brown trout than in brown trout larvae. With regard to the liver condition, however, no distinct differences between larvae and juveniles were observed (Figure 3).

After exposure to venlafaxine as well as in control fish larvae, livers were characterised by large hepatocytes with a bright cytoplasm (Figure 1 A). Throughout all treatment groups at 11 °C, inflammations and macrophage infiltration occurred more frequently (Figure 1 B) compared to larvae exposed at 7 °C (and the respective controls). In fish exposed at 11 °C, necrosis and fibrosis were more abundant than in fish exposed at 7 °C; however, no difference between the control and venlafaxine- treated groups were detected. The liver conditions of venlafaxine-exposed juvenile brown trout ranged between category 1 and 5. In most cases, the cytoplasm of the hepatocytes did

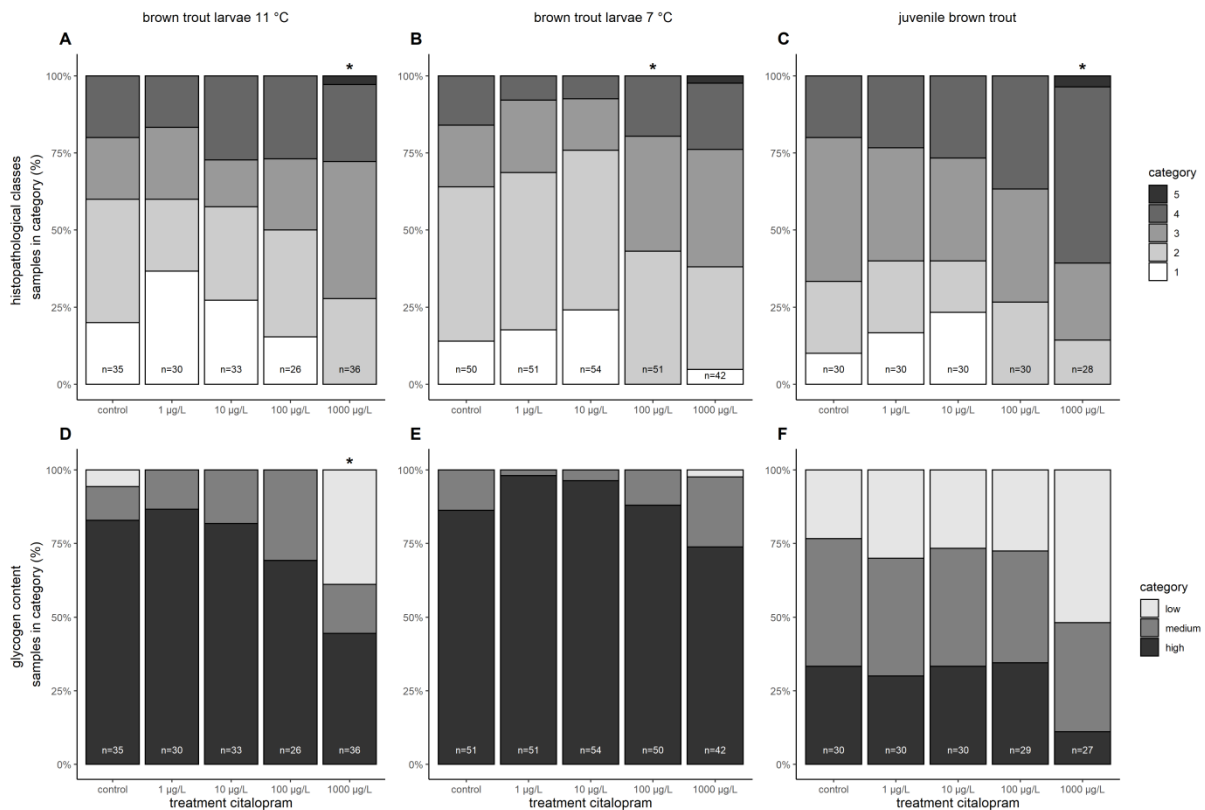


Figure 2: Semi-quantitative assessment of the liver status in citalopram-exposed brown trout. A + D Brown trout larvae at 11 °C, B + E brown trout larvae at 7 °C, C + F juvenile brown trout; A – C assessment of the histopathological symptoms classified in categories 1 to 5; D – F assessment of the glycogen content in the liver classified in categories low, medium and high; asterisks represent significant differences to the respective controls at  $p \leq 0.05$

not appear bright (Figure 1 C) and the cells were medium sized. In livers of juvenile fish exposed to 10 and 1000 µg/L, inflammations were observed more frequently than in the other treatments (Figure 1 B). Dilated capillaries, intercellular spaces, vacuolisation, irregular shaped nuclei and necrosis occurred equally throughout all treatments (Figure 1 C, F). The semiquantitative assessment revealed no difference in the health status between controls and venlafaxine-exposed fish (Figure 3) (brown trout larvae 11 °C: likelihood-ratio  $\chi^2$  test:  $df = 16$ ,  $\chi^2 = 10.701$ ,  $p = 0.8275$ ; brown trout larvae 7 °C: likelihood-ratio  $\chi^2$  test:  $df = 16$ ,  $\chi^2 = 15.494$ ,  $p = 0.4888$ ; juvenile brown trout: likelihood-ratio  $\chi^2$ - test:  $df = 16$ ,  $\chi^2 = 19.575$ ,  $p = 0.24$ ). Likewise, the glycogen content of fish did not differ significantly from the respective controls at both temperatures (brown trout larvae 11 °C: likelihood-ratio  $\chi^2$  test:  $df = 8$ ,  $\chi^2 = 9.941$ ,  $p = 0.2692$ ; brown trout larvae 7 °C: likelihood-ratio  $\chi^2$  test:  $df = 8$ ,  $\chi^2 = 6.98$ ,  $p = 0.5388$ ; juvenile brown trout: likelihood-ratio  $\chi^2$  test:  $df = 8$ ,  $\chi^2 = 9.911$ ,  $p = 0.2713$ ). However, livers of venlafaxine-exposed brown trout larvae showed a lower glycogen content than the livers from fish in all other experiments.

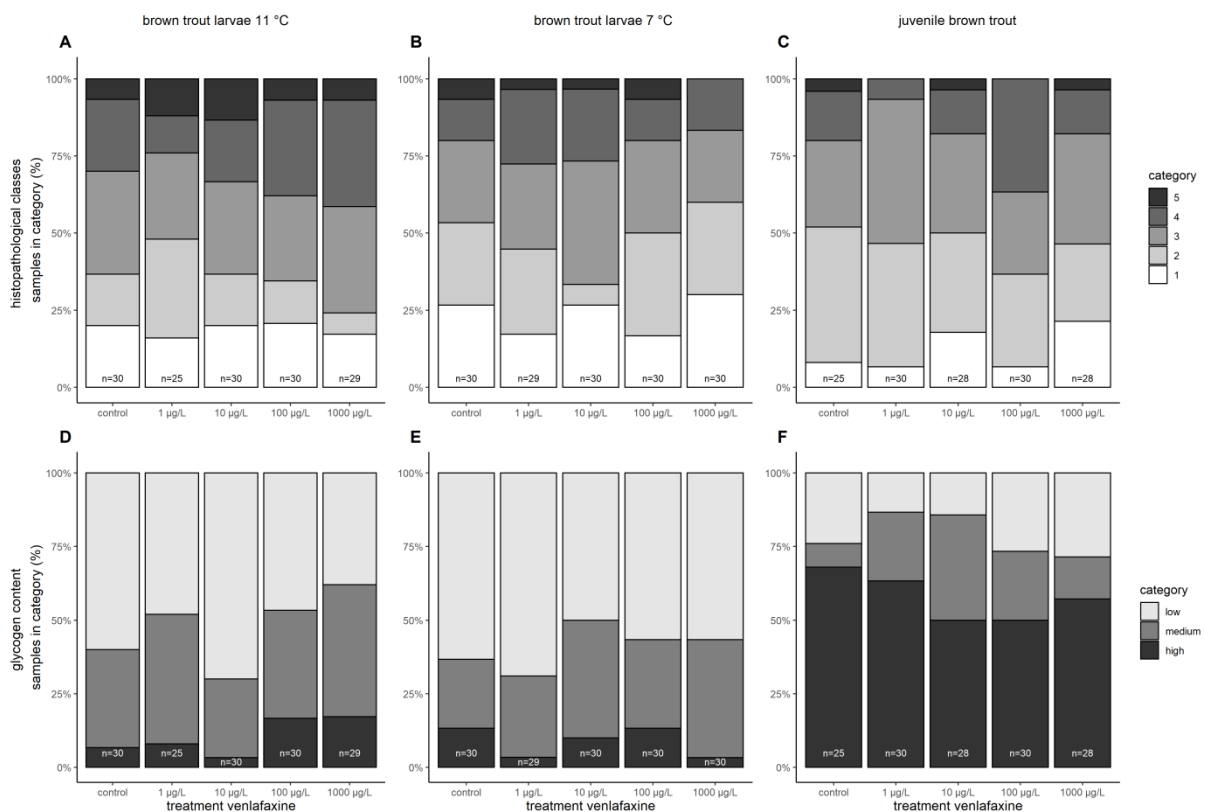


Figure 3: Results for the semi-quantitative assessment of the liver status in venlafaxine-exposed brown trout. A + D Brown trout larvae at 11 °C, B + E brown trout larvae at 7 °C, C + F juvenile brown trout, A – C assessment of the histopathological symptoms classified in categories 1 to 5. D – F Assessment of the glycogen content in the liver classified in categories low, medium and high, asterisks represent significant differences to their respective controls



## Biochemical biomarkers

Table 1: Biochemical biomarkers in brown trout larvae exposed to citalopram.

Results are given as arithmetic means and standard deviations. AChE = acetylcholinesterase, CbE = carboxylesterase, NPA = 4-nitrophenylacetate, NPV = 4-nitrophenylvalerate.

concentration citalopram ( $\mu\text{g/L}$ )	11 °C					7 °C				
	0	1	10	100	1000	0	1	10	100	1000
AChE activity (mU/mg Protein)	45.4 $\pm$ 8.4	43.8 $\pm$ 9.1	47.8 $\pm$ 10.4	42.8 $\pm$ 8.6	47.0 $\pm$ 10.4	43.3 $\pm$ 8.4	45.3 $\pm$ 10.8	41.7 $\pm$ 9.1	44.7 $\pm$ 7.9	43.9 $\pm$ 6.7
CbE activity (NPA substrate) (mU/mg Protein)	112.3 $\pm$ 26.7	121.5 $\pm$ 19.1	120.9 $\pm$ 28.1	123.0 $\pm$ 21.8	125.0 $\pm$ 26.7	94.6 $\pm$ 12.9	98.8 $\pm$ 20.0	91.7 $\pm$ 15.3	96.5 $\pm$ 21.4	96.2 $\pm$ 16.0
CbE activity (NPV substrate) (mU/mg Protein)	82.1 $\pm$ 25.0	95.8 $\pm$ 21.5	97.6 $\pm$ 28.4	96.4 $\pm$ 28.0	94.6 $\pm$ 28.3	71.2 $\pm$ 16.4	71.2 $\pm$ 26.5	66.0 $\pm$ 19.1	73.4 $\pm$ 23.5	74.8 $\pm$ 19.7

Table 2: Biochemical biomarkers in brown trout larvae exposed to venlafaxine.

Results are given as arithmetic means and standard deviations. AChE = acetylcholinesterase, CbE = carboxylesterase, NPA = 4-nitrophenylacetate, NPV = 4-nitrophenylvalerate, SOD = superoxide dismutase; asterisks represent significant differences to the respective control (\* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

concentration venlafaxine ( $\mu\text{g/L}$ )	11 °C					7 °C				
	0	1	10	100	1000	0	1	10	100	1000
AChE activity (mU/mg Protein)	63.0 $\pm$ 8.0	64.4 $\pm$ 11.1	59.9 $\pm$ 16.5	61.6 $\pm$ 16.4	57.1 $\pm$ 14.5	70.8 $\pm$ 14.8	71.0 $\pm$ 11.0	71.5 $\pm$ 15.1	69.3 $\pm$ 15.9	64.1 $\pm$ 12.0
CbE activity (NPA substrate) (mU/mg Protein)	141.8 $\pm$ 23.3	146.5 $\pm$ 26.6	143.2 $\pm$ 27.9	130.2 $\pm$ 29.6	129.9 $\pm$ 22.9	142.3 $\pm$ 22.4	145.5 $\pm$ 22.9	143.8 $\pm$ 19.5	139.5 $\pm$ 16.0	135.5 $\pm$ 23.9
CbE activity (NPV substrate) (mU/mg Protein)	104.2 $\pm$ 28.9	108.2 $\pm$ 28.0	105.1 $\pm$ 32.8	94.5 $\pm$ 36.9	93.0 $\pm$ 22.9	92.2 $\pm$ 23.7	92.8 $\pm$ 20.1	90.1 $\pm$ 19.4	85.2 $\pm$ 13.7	84.2 $\pm$ 20.1
SOD activity (U/mL)	166.0 $\pm$ 29.3	149.3 $\pm$ 31.7	148.2 $\pm$ 40.4	158.8 $\pm$ 51.6	161.1 $\pm$ 29.3	133.9 $\pm$ 37.5	140.2 $\pm$ 37.1	<b>158.2 <math>\pm</math> 36.0</b> *	<b>165.6 <math>\pm</math> 36.1</b> **	155.7 $\pm$ 34.9

Table 3: Biochemical biomarkers in juvenile brown trout exposed to citalopram and venlafaxine.

Results are given as arithmetic means and standard deviations. AChE = acetylcholinesterase, CbE = carboxylesterase, NPA = 4-nitrophenylacetate, NPV = 4-nitrophenylvalerate, Hsp70 = 70 kDa stress protein family, SOD = superoxide dismutase, n.a. = not assessed.

concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	citalopram					venlafaxine				
	0	1	10	100	1000	0	1	10	100	1000
AChE activity (mU/mg Protein)	48.6 $\pm$ 13.8	54.6 $\pm$ 14.6	48.0 $\pm$ 9.6	48.6 $\pm$ 9.0	58.3 $\pm$ 16.0	70.6 $\pm$ 13.4	73.6 $\pm$ 12.5	73.1 $\pm$ 10.9	71.2 $\pm$ 11.6	69.6 $\pm$ 9.0
CbE activity (NPA substrate) (mU/mg Protein)	66.6 $\pm$ 16.6	64.9 $\pm$ 17.7	63.4 $\pm$ 16.8	65.7 $\pm$ 17.7	61.6 $\pm$ 17.4	104.7 $\pm$ 20.2	111.4 $\pm$ 26.2	114.0 $\pm$ 19.0	113.1 $\pm$ 18.1	107.5 $\pm$ 19.6
CbE activity (NPV substrate) (mU/mg Protein)	55.6 $\pm$ 23.3	50.1 $\pm$ 25.6	50.1 $\pm$ 24.7	51.2 $\pm$ 26.4	42.7 $\pm$ 24.7	94.7 $\pm$ 29.2	102.8 $\pm$ 32.4	106.1 $\pm$ 26.0	106.8 $\pm$ 24.6	97.3 $\pm$ 22.9
SOD activity (U/mL)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	88.4 $\pm$ 31.4	100.4 $\pm$ 38.9	91.6 $\pm$ 32.5	100.4 $\pm$ 31.1	107.9 $\pm$ 35.2
Hsp70 level (relative greyvalue)	2.10 $\pm$ 0.35	2.21 $\pm$ 0.58	1.95 $\pm$ 0.43	2.02 $\pm$ 0.44	1.93 $\pm$ 0.41	2.06 $\pm$ 0.24	2.02 $\pm$ 0.24	2.06 $\pm$ 0.23	2.13 $\pm$ 0.31	1.90 $\pm$ 0.22

#### Superoxide dismutase activity

Regarding the activity of the superoxide dismutase (SOD) in brown trout larvae exposed at 11 °C to venlafaxine, no differences between controls and chemical-treated fish were observed (brown trout larvae 11 °C: nested ANOVA:  $df = 4,10$ ,  $F = 1.5387$ ,  $p = 1946$ ). However, at 7 °C, the SOD activity of venlafaxine-exposed larvae was increased up to 24 % in relation to the control. Brown trout larvae exposed to 10 and 100  $\mu\text{g/L}$  venlafaxine at 7 °C showed a significantly increased SOD activity compared to the respective controls, and for larvae exposed to 1000  $\mu\text{g/L}$ , the same trend became obvious (Table 1)(brown trout larvae 7 °C: nested ANOVA:  $df = 4,10$ ,  $F = 3.7377$ ,  $p = 0.0064$ , post hoc Dunnett's Test [control|10  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.0442$ , [control|100  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.0048$ , [control|1000  $\mu\text{g/L}$ ]  $p = 0.082$ ). Comparing the SOD activity between the two temperatures, the activity in control larvae exposed at 11 °C ( $165.96 \pm 29.32$  U/mL) was remarkably higher (24 %) than in larvae exposed at 7 °C ( $133.86 \pm 37.49$ ). Regarding the SOD activity of juvenile brown trout, the activity of fish treated with venlafaxine was on average higher than the SOD activity of control fish. The activity of the SOD in juvenile fish exposed to the highest treatment was increased by 22 % compared to the respective controls; however, the difference was not statistically significant (juvenile brown trout: nested ANOVA:  $df = 4,10$ ,  $F = 1.5804$ ,  $p = 0.1834$ ).

### B-esterase activity

The b-esterase activity did not differ between antidepressant- treated fish and the respective controls in all experiments (Table 1, Table 2, Table 3). Thus, the b-esterase activity was neither influenced by citalopram nor venlafaxine and, furthermore, did not depend on the life stage or temperature (statistical details in Additional file 1).

### Stress protein level

Hsp70 levels of juvenile brown trout were neither influenced by citalopram nor venlafaxine (Table 3) (juvenile brown trout + citalopram: nested ANOVA:  $df = 4,10$ ,  $F = 1.7073$ ,  $p = 0.1522$ ; juvenile brown trout + venlafaxine: nested ANOVA:  $df = 4,10$ ,  $F = 3.2671$ ,  $p = 0.0138$ , post hoc Dunnett's test revealed no difference to control).

## Discussion

Histopathological analyses made evident that the health status of the liver was negatively affected by citalopram in fish exposed to 100 µg/L or 1000 µg/L of the pharmaceutical. The most prominent symptoms were hyperplasia of the hepatocytes and inflammations, which occurred in larvae exposed at both temperatures, as well as in juvenile brown trout. The impaired health status of the fish liver is plausibly related to the accumulation of citalopram in the tissue of exposed fish (Ziegler *et al.*, 2020) which might be responsible for an increased biotransformation activity and metabolism rate. High metabolism rates in the liver are likely reflected by a reduction of glycogen in the fish liver and hyperplasia of hepatocytes (Spina *et al.*, 2008). Additionally, oxidative stress could also have contributed to the depicted damages (Ahmadian *et al.*, 2017; Zlatković *et al.*, 2014). According to previous studies, antidepressants in general were shown to have the potential for inducing negative effects in liver tissue. Although Schultz *et al.* (2011) did not observe any liver alterations in response to either fluoxetine, sertraline or venlafaxine in fathead minnow, Nowakowska *et al.* (2020), however, reported a decrease in hepatocyte proliferation in zebrafish exposed to 10 µg/L of the SSRIs sertraline, paroxetine and the antidepressant mianserin. Rats exposed to the SSRI fluoxetine revealed histopathological liver injury, with symptoms like, e.g., increased numbers of Kupffer and inflammatory cells as well as focal necrosis (Özden *et al.*, 2005; Zlatković *et al.*, 2014). Likewise, rats exposed to 20 mg/kg citalopram showed increased inflammation in their livers, higher numbers of Kupffer cells and liver lymphocytes as well as an increased activity of liver enzymes (Ahmadian *et al.*, 2017; Mohammadi *et al.*, 2013). Additionally, isolated rat hepatocytes exposed to 500 µM citalopram showed cell death, oxidative stress and mitochondrial toxicity (Ahmadian *et al.*, 2017). Also in humans, exposure to citalopram resulted in acute liver damage and increased levels of liver enzymes, indicating hepatitis (Hunfeld *et al.*, 2010; Neumann *et al.*, 2008). The observed reduction of glycogen in brown trout exposed to 1000 µg/L very likely went along with the observed reduced food uptake.

A reduced food uptake may directly cause a decrease in glycogen storage in the liver (Driedzic & Short, 2007; Vijayan & Moon, 1992) and might be responsible for the lower growth rate in brown trout exposed to 1000 µg/L citalopram, compared to the controls (Ziegler *et al.*, 2020). Venlafaxine exposure did not cause severe liver damage in brown trout. Only in juveniles exposed to 10 and 1000 µg/L venlafaxine, slightly more inflammations became evident than in control fish. The lacking cellular reactions in the fish livers might be due to the fact that tissue concentrations of venlafaxine were up to 500-fold lower than those for citalopram in citalopram-exposed fish (Ziegler *et al.*, 2020; Ziegler *et al.*, 2021), resulting in lower metabolic and biotransformation activity. Similarly, Schultz *et al.* (2011) did not find any evidence of venlafaxine-dependent histopathological alterations in fathead minnow livers. Furthermore, venlafaxine had no effect on the glycogen storage in the liver of exposed brown trout. Moreover, it has to be mentioned that also in control fish, slight histopathological changes became obvious which might be due to the artificial exposure conditions in the aquaria which, however, were kept as appropriate as possible during the experiments. As previously stated by (Schwarz *et al.*, 2017), this might be a general physiological response of the fish to the laboratory exposure. Additionally, differences between the glycogen content between the experiments can originate from the different parental generations and the batch of eggs as well as differences in growing and between the years. Furthermore, the liver status was generally impacted by temperature. Livers of larvae exposed at 11 °C were in a worse condition with increased inflammations and necrosis than livers of larvae exposed at 7 °C. The diminished health condition might be related to the higher metabolism of fish exposed at 11 °C. In a study with Japanese flounder also a reduced liver health status could be shown in relation to higher temperature (Liu *et al.*, 2014). Additionally, data for SOD activity suggested a higher oxidative stress when exposed to the higher temperature with SOD values being 24 % higher at 11 °C than at 7 °C. This difference in SOD activity might be influenced by the higher temperature of 11 °C, but differences due to different exposure time cannot be excluded. Additionally, larvae exposed at 11 °C showed a higher mortality rate compared to larvae exposed at 7 °C substantiating the poorer health condition at 11 °C (Ziegler *et al.*, 2021). The higher temperature might have increased the overall SOD activity which could possibly result in the worse health status and the elevated mortality. This temperature dependency is also of importance with regard to climate change. In several studies, it has become evident that oxidative stress responses are in general temperature sensitive (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017; Madeira *et al.*, 2013; Vinagre *et al.*, 2012). Possibly, the relatively high basic level of SOD in controls at 11 °C prevented a further induction by venlafaxine, which became obvious in fish exposed at 7 °C, with more pronounced responses in larvae than in juveniles. In larvae, this effect appeared in individuals exposed to at least 10 µg/L, with a maximum increase of 24 %; while, in juveniles, the maximum SOD activity was 22 % higher than in the control, however not significant. Along this line, effects of

different antidepressants on oxidative stress were previously published. Elevated oxidative stress indicated by changes in catalase, peroxidase, glutathione-S-transferase (GST) and SOD activity has been shown in meagre exposed to venlafaxine (Maulvault *et al.*, 2019), zebrafish exposed to amitriptyline (Yang *et al.*, 2014), goldfish exposed to sertraline (Xie *et al.*, 2015) and daphnids exposed to citalopram (Yang *et al.*, 2017). In a multi-stressor experiment, temperature effects on the anti-oxidant defence have been shown and potential deleterious effects of venlafaxine on the anti-oxidant defence mechanism of zebrafish were indicated (Mehdi *et al.*, 2019). However, in one study, fluoxetine-exposed *Pomatoschistus microps* did not show a change in SOD activity (Duarte *et al.*, 2019). In general, both the vast majority of literature results and our own data indicate that venlafaxine and other antidepressants can induce oxidative stress in fish. In both life stages of brown trout, neither citalopram nor venlafaxine did alter the AChE or CbE activity; thus, no neurotoxic effect of venlafaxine or citalopram on brown trout was detected. Different enzyme activity between the years can derive from differences between the parental generation and the batch of eggs as well as growth differences between the years. Nevertheless, effects of antidepressants on AChE have been reported before: decreased AChE activity could be detected in a marine clam species exposed to low  $\mu\text{g/L}$  fluoxetine (Munari *et al.*, 2014), *Pomatoschistus microps* exposed to 1 mg/L fluoxetine (Duarte *et al.*, 2019) and *Daphnia magna* exposed to 1 mg/L citalopram (Yang *et al.*, 2017). In contrast, goldfish exposed to low- $\mu\text{g/L}$  sertraline showed an increased AChE activity, which could not be detected at higher concentrations (Xie *et al.*, 2015). Concerning the impact of antidepressants on carboxylesterases, to our knowledge, no data are published for fish so far. Likewise, neither citalopram nor venlafaxine exposure induced a response of the Hsp70 system; thus, no proteotoxic effects became evident in juvenile brown trout. However, (Maulvault *et al.*, 2019) observed an increased heat shock response in meagre exposed to 20  $\mu\text{g/L}$  venlafaxine. As Hsp70 is a rather unspecific biomarker, which is induced by various types of stressors, differences might be attributed to different exposure conditions or to species specificity. Generally, with climate change in mind, temperature plays an important role in our scenarios, because it can have an impact on many physiological responses in fish (Liu *et al.*, 2014; Madeira *et al.*, 2013; Mehdi *et al.*, 2019; Vinagre *et al.*, 2012). We could see that fish exposed at 11 °C revealed an overall higher SOD activity; however, differences between larvae exposed at 11 °C and 7 °C cannot solely be attributed to temperature effects, because of different exposure times. Furthermore, it could be shown that effects in larvae were more pronounced than in juveniles; however, these differences can also not solely be accredited to different sensitivities of the life stages but can also result from longer exposure times of larvae. A comparison of the presented biomarker data with previously published results obtained for endpoints like behaviour and growth impairment from the same experiments (Ziegler *et al.*, 2020; Ziegler *et al.*, 2021) makes evident that the effect concentrations for behavioural and growth effects

are in the same range as those for the biomarker responses shown here. The lowest observed effect concentration (LOEC) in citalopram-exposed brown trout was 100 µg/L reflected by histopathological as well as behavioural alterations. Similarly, in venlafaxine-exposed brown trout, behavioural and growth endpoints show similar LOECs of 10 µg/L as the biochemical biomarker SOD activity. This demonstrates that citalopram and venlafaxine can induce effects on cellular and biochemical markers in equivalent concentrations as it affects growth and behavioural endpoints. As a result, the no-observed-effect concentrations (NOEC) in these experiments are just an order of magnitude above environmentally relevant concentrations and, thus, reasonably call for increased vigilance towards these pharmaceuticals in the environment.

## Conclusion

Combining the results for histopathology, neurotoxicity, proteotoxicity and oxidative stress with previously published data, it became evident that effects and side effects of citalopram and venlafaxine in brown trout are similar to those known for humans. LOECs were at 10 µg/L for venlafaxine and at 100 µg/L for citalopram, matching LOECs previously recorded for behavioural and growth endpoints. Although the NOECs for citalopram and venlafaxine are at least a decimal power higher than environmentally relevant concentrations, in consideration of safety factors and additive effects, both antidepressants have necessarily to be considered in environmental risk assessment.

## Additional Informations and declarations

### *Supplementary Information*

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00437-z>

Additional file 1. Biochemical and cellular biomarkers in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*) in response to the antidepressants citalopram and venlafaxine.

### *Acknowledgements*

The authors thank the Ministry of Science, Research and Arts Baden-Württemberg for funding the Water Research Network Baden-Württemberg (Wassernetzwerk Baden-Württemberg), in which the Effect-Net (Effect Network in Water Research) project is embedded. Particular thanks go to our project coordinator, Thomas Braunbeck. Furthermore, we want to thank Stefanie Jacob, Stefanie Kraiss, Elisabeth May, Katharina Peschke, Hannah Schmiege and Sabrina Wilhelm for laboratory support and technical assistance. Thanks also go to Stefanie Dietz and Mona Schweizer for constructive comments on the manuscript.

### *Authors' contributions*

MZ conceived, designed and performed the experiments, analysed the data and prepared the figures and tables and wrote the first draft of the paper and edited according to the coauthors. HE, SO, LR and SS analysed part of the Data and approved the final draft. H-RK and RT conceived and designed the experiments and contributed reagents/materials/analysis tools as well as reviewed the first draft of the paper and approved the final draft. All authors read and approved the final manuscript.

### *Funding*

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This study is part of the Effect-Net project (Effect Network in Water Research), which is part of the Water Research Network Baden-Württemberg (Wassernetzwerk Baden-Württemberg) and is funded by the Ministry of Science, Research and Arts of Baden-Württemberg. The authors received support from the Open Access Publishing Fund of University of Tübingen. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### *Availability of data and materials*

The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the effectnet-seek repository, <https://effectnet-seek.bioquant.uni-heidelberg.de/investigations/9>.

### *Ethics approval*

All animals were approved by the animal welfare committee of the Regional Council of Tübingen, Germany (ZO 2/16).

*Consent for publication*

Not applicable.

*Competing interests*

The authors declare that they have no competing interests.



## References

- Ahmadian, E., Eftekhari, A., Fard, J. K., Babaei, H., Nayebi, A. M., Mohammadnejad, D., Eghbal, M. A. 2017.** In vitro and in vivo evaluation of the mechanisms of citalopram-induced hepatotoxicity, *Archives of Pharmacal Research* 40(11):1296-1313; DOI: 10.1007/s12272-016-0766-0.
- Aldridge, W. N. 1952.** Serum Esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination, *Biochemical Journal* 1:110-117; DOI: 10.1042/bj0530110.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. 1995.** Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing, *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* 57(1):12; DOI: 10.2307/2346101.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. 1999.** Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution, *Journal of Fish Diseases* 22:25-34; DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x.
- Bezchlibnyk-Butler, K., Aleksic, I., Kennedy, S. H. 2000.** Citalopram - a Review of Pharmacological and Clinical Effects, *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 25(3):241-254; PMCID: PMC1407724.
- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., Willmore, W. G. 2017.** A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review, *Fish and Fisheries* 18(5):928-942; DOI: 10.1111/faf.12215.
- Bradford, M. M. 1976.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* 72:248-254; DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Jonsson, M. 2014.** Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 369(1656); DOI: 10.1098/rstb.2013.0580.
- Burnett, F., Dinan, T. G. 1998.** Venlafaxine. Pharmacology and Therapeutic Potential in the Treatment of Depression, *Human Psychopharmacology* 13:153-162; DOI: 10.1002/(SICI)1099-1077(199804)13:3<153::AID-HUP973>3.0.CO;2-S.
- Carr, R. L., Chambers, J. E. 1991.** Acute Effects of the Organophosphate Paraoxon on Schedule-Controlled Behavior and Esterase Activity in Rats: Dose-Response Relationships, *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 40:929-936; DOI: 10.1016/0091-3057(91)90108-E.
- Chanda, M. S., Mortensen, S. R., Moser, V. C., Padilla, S. 1997.** Tissue-Specific Effects of Chlorpyrifos on Carboxylesterase and Cholinesterase Activity in Adult Rats: An in Vitro and in Vivo Comparison, *Fundamental and Applied Nematology* 38(2):148-157; DOI: 10.1093/toxsci/38.2.148.

- Dieterich, A., Troschinski, S., Schwarz, S., Di Lellis, M. A., Henneberg, A., Fischbach, U., Ludwig, M., Gärtner, U., Triebkorn, R., Köhler, H.-R. 2015.** Hsp70 and lipid peroxide levels following heat stress in *Xeropicta derbentina* (Krynicky 1836) (Gastropoda, Pulmonata) with regard to different colour morphs, *Cell Stress and Chaperones* 20(1):159-168; DOI: 10.1007/s12192-014-0534-3.
- Driedzic, W. R., Short, C. E. 2007.** Relationship between food availability, glycerol and glycogen levels in low-temperature challenged rainbow smelt *Osmerus mordax*, *Journal of Experimental Biology* 210(Pt 16):2866-2872; DOI: 10.1242/jeb.003749.
- Duarte, I. A., Pais, M. P., Reis-Santos, P., Cabral, H. N., Fonseca, V. F. 2019.** Biomarker and behavioural responses of an estuarine fish following acute exposure to fluoxetine, *Marine Environmental Research* 147:24-31; DOI: 10.1016/j.marenvres.2019.04.002.
- Dußling, U., Berg, R. 2001.** Fische in Baden-Württemberg, *Ministry for Food and Agriculture Baden-Württemberg*, Stuttgart.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. 1961.** A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Biochemical Pharmacology* 7:88-95; DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
- EU. 2006.** Council Directive 2006/88/EC of 24 October 2006 on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals, *Official Journal of the European Union L 328/14*, Luxembourg.
- Feder, M. E., Hofmann, G. E. 1999.** Heat-Shock Proteins, Molecular Chaperones, and the Stress Response: Evolutionary and Ecological Physiology, *Annual Review of Physiology* 61:243-282; DOI: 10.1146/annurev.physiol.61.1.243.
- Ferrer, I., Thurman, E. M. 2012.** Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1259:148-157; DOI: 10.1016/j.chroma.2012.03.059.
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M., Larsson, D. G. J. 2009.** Contamination of Surface, Ground, and Drinking Water from Pharmaceutical Production, *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12):2522-2527; DOI: 10.1897/09-073.S1.
- Fink, A. L. 1999.** Chaperone-Mediated Protein Folding, *Physiological Reviews* 79(2):425-449.
- Golovko, O., Kumar, V., Fedorova, G., Randak, T., Grabic, R. 2014.** Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant, *Chemosphere* 111:418-426; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.132.
- Grabicova, K., Grabic, R., Fedorova, G., Fick, J., Cerveny, D., Kolarova, J., Turek, J., Zlabek, V., Randak, T. 2017.** Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in an effluent dominated stream, *Water Research* 124:654-662; DOI: 10.1016/j.watres.2017.08.018.
- Himmelsbach, M., Buchberger, W., Klampfl, C. W. 2006.** Determination of antidepressants in surface and waste water samples by capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection after preconcentration using off-line solid-phase extraction, *Electrophoresis* 27(5-6):1220-1226; DOI: 10.1002/elps.200500693.
- Holliday, S. M., Benfield, P. 1995.** Venlafaxine. A Review of its Pharmacology and Therapeutic Potential in Depression, *Drugs* 49(2):280-294; DOI: 10.2165/00003495-199549020-00010.

- Hunfeld, N. G. M., ten Berge, R. L., LeBrun, P. P. H., Smith, S. J., Melief, P. H. G. J. 2010.** Hepatotoxicity related to citalopram intake: A case report, *International Journal of Risk and Safety in Medicine* 22(1):1-5; DOI: 10.3233/jrs-2010-0486.
- Jacob, S., Dötsch, A., Knoll, S., Köhler, H.-R., Rogall, E., Stoll, D., Tisler, S., Huhn, C., Schwartz, T., Zwiener, C., Tribskorn, R. 2018.** Does the antidiabetic drug metformin affect embryo development and the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*)?, *Environmental Sciences Europe* 30(1):48; DOI: 10.1186/s12302-018-0179-4.
- Jacob, S., Knoll, S., Huhn, C., Köhler, H.-R., Tisler, S., Zwiener, C., Tribskorn, R. 2019.** Effects of guanlylurea, the transformation product of the antidiabetic drug metformin, on the health of brown trout (*Salmo trutta f. fario*), *PeerJ* 7:e7289; DOI: 10.7717/peerj.7289.
- Kellner, M., Porseryd, T., Porsch-Hällström, I., Hansen, S. H., Olsén, K. H. 2015.** Environmentally relevant concentrations of citalopram partially inhibit feeding in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Aquatic Toxicology* 158:165-170; DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.11.003.
- Kellner, M., Porseryd, T., Hallgren, S., Porsch-Hällström, I., Hansen, S. H., Olsén, K. H. 2016.** Waterborne citalopram has anxiolytic effects and increases locomotor activity in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Aquatic Toxicology* 173:19-28; DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.12.026.
- Kellner, M., Porseryd, T., Porsch-Hällström, I., Borg, B., Roufidou, C., Olsén, K. H. 2017.** Developmental exposure to the SSRI citalopram causes long-lasting behavioural effects in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), *Ecotoxicology* 27(1):12-22; DOI: 10.1007/s10646-017-1866-4.
- Klemetsen, A., Amundsen, P.-A., Dempson, J. B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M. F., Mortensen, E. 2003.** Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories, *Ecology of Freshwater Fish* 12:1-59; DOI: 10.1034/j.1600-0633.2003.00010.x.
- 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, *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8:261-279; DOI: 10.1023/A:1012935931161.
- Laguerre, C., Sanchez-Hernandez, J. C., Köhler, H.-R., Tribskorn, R., Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C. 2009.** B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: an enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure, *Environmental Pollution* 157(1):199-207; DOI: 10.1016/j.envpol.2008.07.003.
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., Sauvé, S. 2008.** Determination of Basic Antidepressants and Their N-Desmethyl Metabolites in Raw Sewage and Wastewater Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry (Washington)* 80(14):5325-5333; DOI: 10.1021/ac800162q.
- Lajeunesse, A., Smyth, S. A., Barclay, K., Sauvé, S., Gagnon, C. 2012.** Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada, *Water Research* 46(17):5600-5612; DOI: 10.1016/j.watres.2012.07.042.

- Larsson, D. G., de Pedro, C., Paxeus, N. 2007.** Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals, *Journal of Hazardous Materials* 148(3):751-755; DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.07.008.
- Liu, Q., He, H., Yang, J., Feng, X., Zhao, F., Lyu, J. 2020.** Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study, *Journal of Psychiatric Research* 126:134-140; DOI: 10.1016/j.jpsychires.2019.08.002.
- Liu, Y., Ma, D., Xiao, Z., Xu, S., Wang, Y., Wang, Y., Xiao, Y., Song, Z., Teng, Z., Liu, Q., Li, J. 2014.** Histological change and heat shock protein 70 expression in different tissues of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in response to elevated temperature, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 33(1):11-19; DOI: 10.1007/s00343-015-4028-7.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951.** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry*:265-275; ISSN: 0021-9258.
- Mackul'ak, T., Mosný, M., Škubák, J., Grabic, R., Birošová, L. 2015.** Fate of psychoactive compounds in wastewater treatment plant and the possibility of their degradation using aquatic plants, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 39(2):969-973; DOI: 10.1016/j.etap.2015.02.018.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Vinagre, C., Diniz, M. S. 2013.** Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish, *Comparative Biochemistry and Physiology* 166(2):237-243; DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.06.008.
- Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., Tolbert, N. E. 1978.** A Modification of the Lowry Procedure to Simplify Protein Determination in Membrane and Lipoprotein Samples, *Analytical Biochemistry* 87:206-210; DOI: 10.1016/0003-2697(78)90586-9.
- Maulvault, A. L., Santos, L., Paula, J. R., Camacho, C., Pissarra, V., Fogaça, F., Barbosa, V., Alves, R., Ferreira, P. P., Barceló, D., Rodriguez-Mozaz, S., Marques, A., Diniz, M., Rosa, R. 2018.** Differential behavioural responses to venlafaxine exposure route, warming and acidification in juvenile fish (*Argyrosomus regius*), *Science of the Total Environment* 634:1136-1147; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.015.
- Maulvault, A. L., Camacho, C., Barbosa, V., Alves, R., Anacleto, P., Pousão-Ferreira, P., Rosa, R., Marques, A., Diniz, M. S. 2019.** Living in a multi-stressors environment: An integrated biomarker approach to assess the ecotoxicological response of meagre (*Argyrosomus regius*) to venlafaxine, warming and acidification, *Environmental Research* 169:7-25; DOI: 10.1016/j.envres.2018.10.021.
- Mehdi, H., Bragg, L. M., Servos, M. R., Craig, P. M. 2019.** Multiple Stressors in the Environment: The Effects of Exposure to an Antidepressant (Venlafaxine) and Increased Temperature on Zebrafish Metabolism, *Frontiers in Physiology* 10:1431; DOI: 10.3389/fphys.2019.01431.
- Melvin, S. D. 2017.** Effect of antidepressants on circadian rhythms in fish: Insights and implications regarding the design of behavioural toxicity tests, *Aquatic Toxicology* 182:20-30; DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.11.007.
- Mohammadi, Z., Azarnia, M., Mirabolghasemi, G., Shiravi, A., Mohammadi, Z. 2013.** Histological changes in the liver of fetuses of pregnant rats following citalopram administration, *Indian Journal of Pharmacology* 45(5):517-521; DOI: 10.4103/0253-7613.117726.

- Munari, M., Marin, M. G., Matozzo, V. 2014.** Effects of the antidepressant fluoxetine on the immune parameters and acetylcholinesterase activity of the clam *Venerupis philippinarum*, *Marine Environmental Research* 94:32-37; DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.11.007.
- Neumann, H., Csepregi, A., Evert, M., Malfetheriner, P. 2008.** Drug-Induced Liver Disease Related to Citalopram, *Journal of Clinical Psychopharmacology* 28(2):254-255; DOI: 10.1097/JCP.0b013e318167b8e1.
- Noble, S., Benfield, P. 1997.** Citalopram, *CNS Drugs* 8(5):410-431; DOI: 10.2165/00023210-199708050-00009.
- Nödler, K., Licha, T., Bester, K., Sauter, M. 2010.** Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples, *Journal of Chromatography A* 1217(42):6511-6521; DOI: 10.1016/j.chroma.2010.08.048.
- Nowakowska, K., Giebułtowski, J., Kamaszewski, M., Adamski, A., Szudrowicz, H., Ostaszewska, T., Solarska-Dzięciołowska, U., Naęcz-Jawecki, G., Wroczyński, P., Drobniowska, A. 2020.** Acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: Bioaccumulation, physiological and histological changes, *Comparative Biochemistry and Physiology* 229:108670; DOI: 10.1016/j.cbpc.2019.108670.
- Özden, H., Bildirici, K., Üstüner, D., Cengiz, B. P., Tülay, A., Yılmaz, V. 2005.** Histopathological examination of rat liver after experimental application of fluoxetine, *Türkiye Ekopatoloji Dergisi* 11(1):9-15; ISSN: 1300-7939
- Painter, M. M., Buerkley, M. A., Julius, M. L., Vajda, A. M., Norris, D. O., Barber, L. B., Furlong, E. T., Schultz, M. M., Schoenfuss, H. L. 2009.** Antidepressants at Environmentally Relevant Concentrations affect Predator Avoidance Behavior of Larval Fathead Minnows (*Pimephales promelas*), *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(12):2677-2684; DOI: 10.1897/08-556.1.
- Pedrajas, J. R., Peinado, J., López-Barea, J. 1995.** Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers, *Chemico-Biological Interactions* 98:16; DOI: 10.1016/0009-2797(95)03651-2
- Rault, M., Collange, B., Mazzia, C., Capowiez, Y. 2008.** Dynamics of acetylcholinesterase activity recovery in two earthworm species following exposure to ethyl-parathion, *Soil Biology & Biochemistry* 40(12):3086-3091; DOI: 10.1016/j.soilbio.2008.09.010.
- Regoli, F., Giuliani, M. E. 2014.** Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms, *Marine Environmental Research* 93:106-117; DOI: 10.1016/j.marenvres.2013.07.006.
- Rey Vázquez, G., Da Cuña, R. H., Dorelle, L. S., Lo Nostro, F. L. 2020.** Immunohistological Biomarkers of Toxicity by a Pharmaceutical Antidepressant in the Freshwater Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Cichliformes), *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 104(2):180-184; DOI: 10.1007/s00128-019-02770-3.
- Rodriguez, E. d. L., Fanta, E. 1998.** Liver Histopathology of the Fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after Acute Exposure to Sublethal Levels of the Organophosphate Dimethoate 500, *Revista Brasileira de Zoologia* 15(2):441-450; DOI: 10.1590/S0101-81751998000200014

- Sanchez-Hernandez, J. C., Mazzia, C., Capowiez, Y., Rault, M. 2009.** Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: Potential (eco)toxicological implications, *Comparative Biochemistry and Physiology* 150(4):503-511; DOI: 10.1016/j.cbpc.2009.07.009.
- Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L. B., Blazer, V. S., Norris, D. O., Vajda, A. M. 2010.** Antidepressant Pharmaceuticals in Two U.S. Effluent-Impacted Streams: Occurrence and Fate in Water and Sediment, and Selective Uptake in Fish Neural Tissue, *Environmental Science and Technology* 44:1918-1925; DOI: 10.1021/es9022706.
- Schultz, M. M., Painter, M. M., Bartell, S. E., Logue, A., Furlong, E. T., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L. 2011.** Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows, *Aquatic Toxicology* 104(1-2):38-47; DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.03.011.
- Schwabe, U., Paffrath, D., Ludwig, W.-D., Klauber, J. 2019.** Arzneiverordnungsreport 2019, *Springer-Verlag GmbH*, Berlin, ISBN: 978-3-662-59045-4.
- Schwarz, S., Schmiege, H., Scheurer, M., Köhler, H.-R., Triebkorn, R. 2017.** Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta f. fario*, *Science of the Total Environment* 607-608:1026-1036; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.042.
- Sehonova, P., Svobodova, Z., Dolezelova, P., Vosmerova, P., Faggio, C. 2018.** Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: A review, *Science of the Total Environment* 631-632:789-794; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.076.
- Silva, L. J., Pereira, A. M., Meisel, L. M., Lino, C. M., Pena, A. 2014.** A one-year follow-up analysis of antidepressants in Portuguese wastewaters: occurrence and fate, seasonal influence, and risk assessment, *Science of the Total Environment* 490:279-287; DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.131.
- Šinko, G., Čalić, M., Bosak, A., Kovarik, Z. 2007.** Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes, *Analytical Biochemistry* 370(2):223-227; DOI: 10.1016/j.ab.2007.07.023.
- Spina, E., Santoro, V., D'Arrigo, C. 2008.** Clinically Relevant Pharmacokinetic Drug Interactions with Second-Generation Antidepressants: An Update, *Clinical Therapeutics* 30(7):1206-1227; DOI: 10.1016/j.clinthera.2008.07.009.
- Triebkorn, R., Casper, H., Scheil, V., Schwaiger, J. 2007.** Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*), *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4):1405-1416; DOI: 10.1007/s00216-006-1033-x.
- Triebkorn, R., Telcean, I., Casper, H., Farkas, A., Sandu, C., Stan, G., Colărescu, O., Dori, T., Köhler, H.-R. 2008.** Monitoring pollution in River Mures, Romania, part II: metal accumulation and histopathology in fish, *Environmental Monitoring and Assessment* 141(1-3):177-188; DOI: 10.1007/s10661-007-9886-9.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. 2006.** Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64(2):178-189; DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.

- Vijayan, M. M., Moon, T. W. 1992.** Acute Handling Stress Alters Hepatic Glycogen Metabolism in Food-Deprived Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49(11):7; DOI: 10.1139/f92-247.
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Diniz, M. 2012.** Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*, *Ecological Indicators* 23:274-279; DOI: 10.1016/j.ecolind.2012.04.009.
- Vutukuru, S. S., Chintada, S., Radha Madhavi, K., Venkateswara Rao, J., Anjaneyulu, Y. 2006.** Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*, *Fish Physiology and Biochemistry* 32(3):221-229; DOI: 10.1007/s10695-006-9004-x.
- Wittchen, H. U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jönsson, B., Olesen, J., Allgulander, C., Alonso, J., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Jennum, P., Lieb, R., Maercker, A., van Os, J., Preisig, M., Salvador-Carulla, L., Simon, R., Steinhausen, H. C. 2011.** The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010, *European Neuropsychopharmacology* 21(9):655-679; DOI: 10.1016/j.euroneuro.2011.07.018.
- Xie, Z., Lu, G., Li, S., Nie, Y., Ma, B., Liu, J. 2015.** Behavioral and biochemical responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to sertraline, *Chemosphere* 135:146-155; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.031.
- Yang, H., Lu, G., Yan, Z., Liu, J., Ma, B., Dong, H. 2017.** Biological effects of citalopram in a suspended sediment-water system on *Daphnia magna*, *Environmental Science and Pollution Research International* 24(26):21180-21190; DOI: 10.1007/s11356-017-9763-1.
- Yang, M., Qiu, W., Chen, J., Zhan, J., Pan, C., Lei, X., Wu, M. 2014.** Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline, *Aquatic Toxicology* 151:68-76; DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.12.029.
- Ziegler, M., Knoll, S., Köhler, H.-R., Tisler, S., Huhn, C., Zwiener, C., Triebkorn, R. 2020.** Impact of the antidepressant citalopram on the behaviour of two different life stages of brown trout, *PeerJ* 8(e8765); DOI: 10.7717/peerj.8765.
- Ziegler, M., Banet, M., Bauer, R., Köhler, H.-R., Stepinski, S., Tisler, S., Huhn, C., Zwiener, C., Triebkorn, R. 2021.** Behavioural and Developmental Changes in Brown Trout After Exposure to the Antidepressant Venlafaxine, *Frontiers in Environmental Science* 8(586584); DOI: 10.3389/fenvs.2020.586584.
- Zlatković, J., Todorović, N., Tomanović, N., Bošković, M., Djordjević, S., Lazarević-Pašti, T., Bernardi, R. E., Djurdjević, A., Filipović, D. 2014.** Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: a histopathological study, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 59:20-30; DOI: 10.1016/j.ejps.2014.04.010.

## Kapitel IV:

### The role of behavioural toxicology in environmental protection: A consensus statement

Alex T. Ford,\* Marlene Ågerstrand, Bryan W. Brooks, Joel Allen, Michael G. Bertram, Tomas Brodin, ZhiChao Dang, Sabine Duquesne, René Sahm, Frauke Hoffmann, Henner Hollert, Stefanie Jacob, Nils Klüver, James M. Lazorchak, Mariana Ledesma, Steven D. Melvin, Silvia Mohr, Stephanie Padilla, Gregory G. Pyle, Stefan Scholz, Minna Saaristo, Els Smit, Jeffery A. Steevens, Sanne van den Berg, Werner Kloas, Bob B.M. Wong, Michael Ziegler, and Gerd Maack

Environmental Science and Technology, DOI: [10.1021/acs.est.0c06493](https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06493)

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.0c06493>

Notice to readers: further permissions related to the material excerpted should be directed to the American Chemical Society. Reproduced with permission from Environmental Science and Technology. Copyright 2021 American Chemical Society.

#### Abstract

For decades, we have known that chemicals affect human and wildlife behavior. Moreover, due to recent technological and computational advances, scientists are now increasingly aware that a wide variety of contaminants and other environmental stressors adversely affect organismal behavior and subsequent ecological outcomes in terrestrial and aquatic ecosystems. There is also a groundswell of concern that regulatory ecotoxicology does not adequately consider behavior, primarily due to a lack of standardized toxicity methods. This has, in turn, led to the exclusion of many behavioral ecotoxicology studies from chemical risk assessments. To improve understanding of the challenges and opportunities for behavioral ecotoxicology within regulatory toxicology/risk assessment, a unique workshop with international representatives from the fields of behavioral ecology, ecotoxicology, regulatory (eco)toxicology, neurotoxicology, test standardization, and risk assessment resulted in the formation of consensus perspectives and recommendations, which promise to serve as a roadmap to advance interfaces among the basic and translational sciences, and regulatory practices.



## Introduction

Behavioral ecotoxicology is the study of behavioral responses to determine the potential effects of toxicants and other stressors on individuals, populations, and communities (Peterson *et al.*, 2017). It is the combination of an understanding of adaptive responses of individuals to stressors present in their environment, particularly chemical contaminants, and the resulting impacts of these behavioral changes at the individual, population, and community levels of ecological organization. The field of behavioral toxicology can be traced back to the 1960s (Dell'Omo, 2002; Ruffin, 1963; Zenick & Reiter, 1977) with behavioral responses in historic environmental legislation (Box 1). However, there is concern that regulatory ecotoxicology does not adequately consider behavior, primarily due to a lack of standardized toxicity methods. More recently, technological advances are allowing for the detection and quantification of subtle changes in the behaviors of animals and the increasing environmental occurrence of neuroactive compounds (e.g., neuroendocrine disruptors, pharmaceuticals), which has led to growing concerns surrounding the disruption of wildlife behavior by chemical contaminants (Melvin & Wilson, 2013; Pyle & Ford, 2017). Moreover, there is mounting evidence that environmental risk assessment of chemicals does not adequately incorporate or consider behavioral data (discussed in ref Ågerstrand *et al.* (2020)).

With growing concerns over human behavioral health and contaminants (Sanders *et al.*, 2015; Tyler & Allan, 2014), there may be a need for greater cross-disciplinary integration of environmental and human health risk assessments. Indeed, in the 1990s, it was highlighted that the general public is largely unaware of the potential effects of toxicants on behaviour (Weiss, 1990). However, despite recent studies suggesting growing public interest and understanding of environmental issues (Niankara & Zoungrana, 2018), awareness that contaminants might be affecting wildlife and human behavior is still, despite decades of research, broadly lacking. This reality exists despite well-known cases of behavioral toxicants leading to changes in legislation, such as the removal of lead from fuels (Benson *et al.*, 2017), limitations or prohibitions placed on alcohol consumption, and the operation of motor vehicles (Martin *et al.*, 2013). The objectives of this paper are, therefore, to examine, through development of consensus perspectives, interfaces among behavioral ecology, ecotoxicology, and chemical risk assessment and to provide recommendations to improve integration of behavioral end points in risk assessment, criteria development, and the regulation of chemical contaminants.

#### Box 1. Behavioural (eco)toxicology in historical environmental legislation

Behavioural (eco)toxicology emerged during the 1970s, driven by the merging of behavioural pharmacology and neurotoxicology. What followed was a string of litigation regarding workforce exposure to a wide range of toxicants. Weiss (1990), reflecting on the development of behavioural toxicology, highlighted that during the 1970s legislators in the U.S. were already drafting requirements that behavioural disturbances could be included among criteria of adverse effects (p403-404) in what later became the Toxic Substances Control Act. In 1986, the U.S. EPA's Guidelines for Deriving Ambient Water Quality Criteria for Protection of Aquatic Life stated '*Pertinent information that could not be used in earlier sections might be available concerning adverse effects on aquatic organisms and their uses. The most important of these are data on cumulative and delayed toxicity, flavour impairment, reduction in survival, growth, or reproduction, or any other adverse effect that has been shown to be biologically important. Especially important are data for species for which no other data are available. Data from behavioural, biochemical, physiological, microcosm, and field studies might also be available.*' A number of chemical regulations now include behaviour internationally with respect to risk assessment. Furthermore, inclusion of neurobehavioral endpoints in the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) test guidelines (TG) (e.g. (OECD, 1997, 2007, 2018) mean that they can be used in European Union (EU) regulatory frameworks such as regulations for medicinal products (27/2004), REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (EC) No. 1907/2006), Plant Protection Products Regulation ((EC No. 11)07/2009), and Biocidal Products Regulation (528/2012).

While environmental risk assessment does not preclude behavioral toxicity test results, such tests are seldom included (Ågerstrand *et al.*, 2020). There have also been perceptions that behavioral ecotoxicology test end points are less reliable and not repeatable or that behavioral responses are hard to extrapolate to the population level (Legradi *et al.*, 2018; Peterson *et al.*, 2017; Pyle & Ford, 2017).

#### Box 2. Reliability and relevance of (eco)toxicology data in the EU

The European Chemicals Agency (ECHA) defines reliability as '*the inherent quality of a test report or publication relating to preferably standardized methodology and the way the experimental procedure and results are described to give evidence of the clarity and plausibility of the findings*'<sup>16</sup>. Relevance is '*the extent to which data and tests are appropriate for a particular hazard identification or risk characterization*' ECHA has strict guidance on the assessment of relevance and reliability of (eco)toxicity studies used for human and environmental risk assessment (ECHA, 2011). Reliability of the information in (eco)toxicological studies is categorized as 1) reliable without restrictions, 2) reliable with restrictions, 3) not reliable, or 4) not assignable (Klimisch *et al.*, 1997).

As noted in Box 2, specific (eco)toxicological considerations for data reliability and relevance are defined in the EU. For convenience, we used the term (eco)toxicology when referring to both human toxicology and ecotoxicology. In behavioral studies, it may not be the fundamental findings of the study that are perceived as unreliable but rather the interpretation of relevance and the fact that the experiments are not standardized and thus aligned to national or international accepted and

validated guidelines, as required in regulatory human toxicology and ecotoxicology. These concerns are certainly not new. For example, a workshop held in 1976, entitled “Behavioral Toxicology: An emerging discipline,” brought together experts in toxicology, pharmacology, psychology, physiology, and veterinary health (Zenick & Reiter, 1977). The published proceedings highlight that researchers were acutely aware of the importance of tackling the effects of environmental contaminants on the health of humans and wildlife. It was also evident that the researchers were mindful of the challenges faced by behavioral toxicology in relation to reliability and reproducibility of the experimental systems used. Despite the legacy of behavioral toxicology dating back over half a century, there continues to be very little of this information used in environmental protection. Therefore, judgements cannot currently be made that might otherwise result in improved environmental quality standards, alternative assessments of environment risks, or just fundamental improvements in our understanding of contaminant-induced behavioral effects. To increase understanding of behavioral ecotoxicology and advance its integration into regulatory environmental risk assessments of chemicals, a workshop was organized at the German Environment Agency in Dessau, Germany. International representatives from the fields of behavioral ecology, ecotoxicology, regulatory (eco)toxicology, neurotoxicology, test standardization, and risk assessment were invited to provide contemporary synthesis. Here, we provide consensus perspectives and recommendations to improve use of behavioral end points. We specifically examined a key question: What should be the future role of behavioral ecotoxicology in environmental protection? Therefore, we aimed to address whether there are methodological approaches that need to be improved/developed and/or if regulatory authorities need more confidence in current approaches.

## Consensus Perspectives

### *1. Chemical Contaminants Affect Wildlife and Human Behavior.*

Considerable evidence exists demonstrating that chemical contaminants can impact both wildlife and human behavior. Research from the early 1900s first described altered swimming behaviors in fish exposed to various chemicals (Shelford, 1917; Sollmann, 1906), with numerous studies reporting similar effects having emerged over the past century (Melvin & Wilson, 2013; Saaristo *et al.*, 2018). Examples of behavioral responses reported in fish include effects on learning and memory, reproduction, sociality, aggression, and predator avoidance, as well as a multitude of others (reviewed in ref Scott & Sloman (2004)). Importantly, such effects are not limited to aquatic vertebrates, with a growing number of studies describing similar responses in invertebrates (Boyd *et al.*, 2002) and diverse terrestrial species (Zala & Penn, 2004). That effects are seen across animal taxa is not surprising given the highly conserved nature of biochemical pathways and processes in all living organisms, including those in the brain that ultimately control behavior. Humans share many biochemical pathways with other species. Indeed, pharmaceutical development commonly

incorporates screening of potential novel neuroactive chemicals for effects on animal behaviors (Bruni *et al.*, 2014). When considered in this context, it is not surprising that many bioactive chemicals designed for human use also influence wildlife behavior. Recent studies have linked chemical contaminants with effects on human behavior, cognition, and brain development (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2018). For example, early exposure to many industrial chemicals has been identified as contributing to an increasing frequency of neurobehavioral disabilities in humans (Bennett *et al.*, 2016; Grandjean & Landrigan, 2014). Furthermore, besides direct toxicity, the knowledge that contaminant levels are rising and can cause harmful effects on human health has itself been linked to increased psychological distress in the general population (Evans, 2019).

## *2. Behavior Is Connected to Fundamental Ecological Processes (e.g., Population Health and Fitness).*

Behavior can profoundly impact individual fitness, with consequences for population dynamics, species interactions, and ecosystem function (reviewed in refs Saaristo *et al.* (2018) and Candolin & Wong (2019)). Behavioral responses can affect individual fitness by influencing reproductive success, feeding, growth, and survival. For example, selection of a mating partner or location of nest sites can have a direct bearing on the quality and quantity of offspring produced (Jennions & Petrie, 1997), while behavioural responses to predators can be a matter of life or death (Sih, 1984; Sih *et al.*, 1998). These types of individual-level behavioral responses can, in turn, have population-level consequences by altering demographic parameters, such as birth, death, and migration rates. The interplay between individual behavior and population dynamics is complex. In seeking to maximize fitness, individuals can engage in behaviors that are beneficial to themselves but are potentially detrimental to the population (Haldane, 1932). Conversely, changes to population dynamics can also affect individual behavior, for example, through density-dependent effects on foraging, mate searching, aggression, and competition (Kokko & López-Sepulcre, 2007; Robert *et al.*, 2012). Due to the complex interactions that exist among different organisms within their environment, behaviors that lead to population changes in one species can affect the strength and nature of its interactions with others (Hoover & Tylanakis, 2012; Sih, 2013; Wong & Candolin, 2014). The structure and complexity of these interactions can have important community- and ecosystem-level effects (Janetski *et al.*, 2009). This is because changes in one part of the system can drive changes throughout, with consequences for biodiversity, ecosystem function, and stability. For instance, the abundance and behavior of apex predators can induce top-down effects (Eriksson *et al.*, 2009; Estes *et al.*, 1998), while the complexity of the networks connecting different species can act as a potential safeguard, buffering species against the risk of extinction (Traveset *et al.*, 2013).

### 3. Laboratory-Derived Behavioral Data Can Be Linked to Individual, Population, and/or Ecosystem Processes in the Field.

Laboratory-based research is widely employed to investigate the causes and consequences of animal behaviour (Campbell *et al.*, 2009). Well-designed experimental studies in the laboratory allow researchers to explicitly control for myriad interacting variables present in characteristically complex and dynamic natural systems. In turn, these also yield insights that can be directly linked to individual, population, and ecosystem processes. There is strong evidence, for instance, that data collected in the laboratory can predict variation in ecologically important behaviors in the field, including activity (e.g., Boon *et al.* (2008) and Fisher *et al.* (2015)), boldness (e.g., Fraser *et al.* (2001) and Yuen *et al.* (2016)), exploration (e.g., Fisher *et al.* (2015) and Herborn *et al.* (2010)), and aggression (e.g., Boon *et al.* (2008) and Yuen *et al.* (2016)). Further, research has demonstrated that variation in behavioral traits measured in the laboratory can predict the fitness of individuals in the wild (reviewed in ref Moiron *et al.* (2020)). For example, in great tits (*Parus major*), the degree of exploratory behavior exhibited in the laboratory is related to annual adult survival, as well as offspring survival to breeding age, measured in the field (Dingemanse *et al.*, 2004). Moreover, behavioral data derived from laboratory assays can be linked to fundamental ecosystem and evolutionary processes at the population and community levels (reviewed in ref Wong & Candolin (2014)). For instance, in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*), female preference for male nuptial coloration, which is readily quantifiable in the laboratory (e.g., ref Houde (1987)), shapes evolutionary trajectories in the wild due to a trade-off in males between attractiveness to females and vulnerability to predation (Reznick *et al.*, 1990).

In ecotoxicology, laboratory-based studies are fundamentally important in achieving a mechanistic understanding of contaminant-induced behavioral changes under controlled experimental conditions and have revealed that a wide variety of fitness-related behaviors are vulnerable to disruption (reviewed in refs Melvin & Wilson (2013), Brodin *et al.* (2014), Saaristo *et al.* (2018), Zala & Penn (2004) and Aulsebrook *et al.* (2020)). Where field studies have been carried out to validate behavioral effects of contaminant exposure observed in the laboratory, a variety of effects observed in the laboratory have been shown to accurately predict those seen in the field. For example, Klaminder *et al.* (2016) reported that European perch (*Perca fluviatilis*) exposed to the antianxiety medication oxazepam displayed increased boldness and activity both when measured in the laboratory and in an experimental lake system. Furthermore, Hellström *et al.* (2016) found that exposure to oxazepam resulted in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts migrating faster both in large-scale laboratory pools and in a natural river system. Effects seen in the laboratory and the field are not always in alignment, which can be due to incompatibility between behaviors measured in either setting (i.e., activity within a restricted area versus large-scale dispersal). A mismatch between laboratory and field

findings is evident, for instance, in the reporting of inconsistencies in neonicotinoid-induced behavioral changes in honeybees (Godfray *et al.*, 2014; Goulson *et al.*, 2015; Sanchez-Bayo & Goka, 2014). However, such gaps may be remedied by taking a more integrative, multipronged approach involving laboratory, semifield, and field studies (Henry *et al.*, 2015). For example, contaminant-induced effects on behavioral end points measured in semifield and field studies – and/or their consequences at the individual and population levels – can be used to inform the design of laboratory-based studies to elucidate mechanisms of toxic action. Information derived from these mechanistic investigations will be important for establishing adverse outcome pathways from molecular initiating events to population-, community-, and ecosystem-level effects (Ankley *et al.*, 2010).

#### *4. Behavioral Data Can Be Environmentally Relevant but Are Rarely Used in an Environmental Regulatory Context.*

Behavioral (eco)toxicological data are often considered of “low relevance” and do not adhere to the existing paradigm of what constitutes relevant data for regulatory decisions. A recent study identified only six examples of behavioral ecotoxicological data being considered in environmental risk assessment in the EU (Ågerstrand *et al.*, 2020), and these examples vary in the use of behavioral data within the assessment. Differences in the level of inclusion span the specific end points and test design, regulatory framework, and the weight given to behavioral responses. Given the relevance of behavioral ecotoxicological data to environmental risk assessment, why is its use so sparse? One possible reason for the low regulatory use of behavioral studies is the lack of promotion of behavioral end points in legislation and guidance documents. In addition, there have been very few side-by-side comparisons between behavioral tests and (eco)toxicity standard tests. Environmental risk assessments have traditionally been based on standard studies measuring growth, mortality, and fecundity as the key end points linked to population-level effects (ECHA, 2011). There is also a lack of understanding as to how behavioral effects relate to population fitness and ecosystem-level impacts, and which effects should be considered. As such, behavioral studies have been disregarded because often the end point is not considered to be linked to population effects and, hence, is regarded as being of “low relevance.”

Although not explicitly mentioned, several regulatory frameworks do allow for the incorporation of nonstandard end points such as behavior (Box 1). For example, different chemical legislations are in place in the EU, covering industrial chemicals, pesticides, biocides, and pharmaceuticals. Some of them require experimental data performed according to the OECD Test Guidelines (TGs). Behavioral end points are used for validity criteria (e.g., burrowing behavior of worms in ref OECD (2016)), selection of test species (e.g., fish in ref OECD (2012b)), indication of water quality, status of the

experimental animals, and the continuation of the experiment. These TGs require reporting behavioral observations, but in the case of ecotoxicological studies, they are seldom used for making regulatory decisions because these observations are not consistently perceived as relevant at the population level. However, regulatory risk assessment and regulatory bodies are flexible enough to integrate these end points, if the requirements mentioned above are fulfilled (see statements 5 and 6). Quite contrarily, behavioral end points are included in several OECD rat studies recommended for use in human health assessment (e.g., refs (OECD, 1997, 2007, 2018)). Specifically, reproductive and neurobehavioral testing is included in the Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, OECD TG 443 (OECD, 2018), and in the Developmental Neurotoxicity Study, OECD TG 426 (OECD, 2007). Through these studies, behavioral end points have gained regulatory acceptance and consistent use in human health assessments (Makris *et al.*, 2009).

#### *5. For Use in a Regulatory Context, Behavioral Studies Should Incorporate the Elements of Standardized Studies.*

Behavioral ecotoxicity experiments are primarily carried out as nonstandard studies performed by academic researchers and published in the peer-reviewed literature (Ågerstrand *et al.*, 2020). Nonstandard ecotoxicity studies include a wide range of test designs, which reflect differences in available equipment between laboratories but also highlight the diversity of behavioral responses. However, the lack of standardization, such as the lack of analytical verification of nominal treatment levels, the use of too few replicates, or missing information needed for a full evaluation of the reliability of the study, has resulted in nonstandard studies being disregarded for regulatory use (Moermond *et al.*, 2016).

Most test guidelines are written with the understanding that the results are used in a regulatory context and will need to stand up to challenges under various legal systems. Therefore, standard studies share common characteristics, which have been identified through practice to increase replicability across time and laboratories. Typically, they are designed for use with a single species at a specific life stage(s), a single end point class, and require reporting of a base set of experimental and quality assurance data necessary to demonstrate reliability of results. The use of standardized methods ensures that risk assessors have appropriate information required for data reliability assessment and use in a risk assessment.

These specific requirements are not always documented in peer-reviewed published studies and sometimes not even integrated into the planning of the studies (Ågerstrand *et al.*, 2020). Many behavioral studies have been motivated by fundamental (rather than applied) research questions and, therefore, may have been carried out as a proof of principle study or may have been performed as part of a small project on a limited budget that precluded comprehensive chemical analyses.

These studies were never designed and never intended to be used in regulation and therefore often do not fulfill the acceptance criteria. More generally, the authors of such studies also may not be aware of the acceptance criteria nor the significance of guideline studies for regulation. In fact, such a spectrum of fundamental to applied/translational scientific inquiry is not uncommon among disciplines. Therefore, an acceptance for regulatory purposes is often difficult. Results from many behavioral toxicology studies can therefore be used as background information only. Background information in regulation means that this information is used in a weight of evidence approach to explain certain effects or support the identification of a hazard concern but cannot be used for deriving effect levels for a quantitative risk assessment. This could be partly solved with more effective communication and guidance between regulators, industry, and researchers (Ågerstrand *et al.*, 2020). Often, the study design could be quite easily adapted, and sometimes the missing information has been generated but not published. In many cases, Supporting Information from older studies will be inevitably lost.

In a recent review on “An Ecotoxicological View on Neurotoxicity Assessment,” Legradi *et al.* (2018) presented a comprehensive analysis of how behavioral data can be used in a regulatory context. The authors concluded that considering the increasing numbers of environmental contaminants with potential neurotoxic potency, eco-neurotoxicity should be considered in risk assessment. In order to do so, novel test systems are needed that can cope with species differences within ecosystems. For eco-neurotoxicity, methods need to focus on potentially sensitive species in an ecosystem. A test battery using species from different trophic levels might be the best approach and, importantly, using different timing of exposure (e.g., gestation vs adult). To implement eco-neurotoxicity and behavioral assessment into EU risk assessment, cheminformatics and in vitro screening tests could be used as a first approach to identify eco-neurotoxic pollutants. In a second step, a small species test battery could be applied to assess the risks to ecosystems (Legradi *et al.*, 2018).

#### *6. Standardized Ecotoxicity Studies Can Include and Quantify Behavioral End Points.*

The OECD guidelines for testing the effects of chemicals on biotic systems include about 50 ecotoxicity TGs with aquatic and terrestrial animals. In response to legal data requirements and guidance documents, most use mortality, growth, and reproductive outcomes for the derivation of (no) effect concentrations, but almost all TGs reference abnormal behavior as a potential effect caused by exposure to the test chemical. In most cases, the reference to behavior is limited to a note that behavioral changes must be recorded in the study report. No information is provided on what is considered as (ab)normal behavior or the types of behavioral changes that are considered important. Exceptions are TGs for fish and amphibians and for bees and bumblebees, some of which give a



description of behavioral changes that may occur. For example, TG 231 on amphibian metamorphosis (OECD, 2009b) states that abnormal behavior would include floating on the surface, lying on the bottom of the tank, inverted or irregular swimming, lack of surfacing activity, and being unresponsive to a stimulus. Test guideline 203 on acute fish mortality (OECD, 2019) includes an extensive description of clinical signs and a scoring sheet to record these abnormal behaviors.

However, the TGs also state that the purpose of recording behavioral changes is not to include them as regulatory apical end points. Instead, behavioral changes are incorporated in the TGs to optimize test design, to facilitate interpretation of data, or from the perspective of monitoring animal welfare during testing. For example, three fish toxicity TGs (TG 215, 229, and 230 (OECD, 2000, 2009a, 2012a)) provide recommendations to adjust the number of test organisms because territorial behavior may induce stress responses, which could in turn influence the test end points, in this case growth and endocrine effects. Test guidelines 229 (OECD, 2012a) and 230 (OECD, 2009a) require that signs of toxicity should be considered carefully for data interpretation, because they may indicate concentrations at which biomarkers of endocrine activity are not reliable. Behavior observations can aid in the interpretation of data, such as providing information on the potential mode of action (MOA) of a chemical. For example, in zebrafish (*Danio rerio*), the characteristic mating and spawning behavior after morning onset of light is reduced or hindered by exposure to estrogenic or antiandrogenic compounds. Animal welfare is the reason to include abnormal behavior in TG 203 (OECD, 2019) and 210 (OECD, 2013). These TGs specify that fish should be euthanized and treated as mortalities for subsequent data analysis when abnormal behavior is considered so severe that there is considerable suffering to the organism and the organism has reached a point beyond which it will not recover. Similar considerations are made for cladoceran immobility as a surrogate formortality when using EPA methods in the U.S.

Almost all ecotoxicity TGs for fish and mammals require that behavioral changes are recorded. This suggests regulators recognize that chemicals affect behavior and that these altered behaviors should be considered when evaluating test results. Therefore, it would be beneficial to review all TGs so that behavioral end points could be incorporated as quantitative measures of toxicity in addition to their use to optimize test design or as markers of animal welfare.

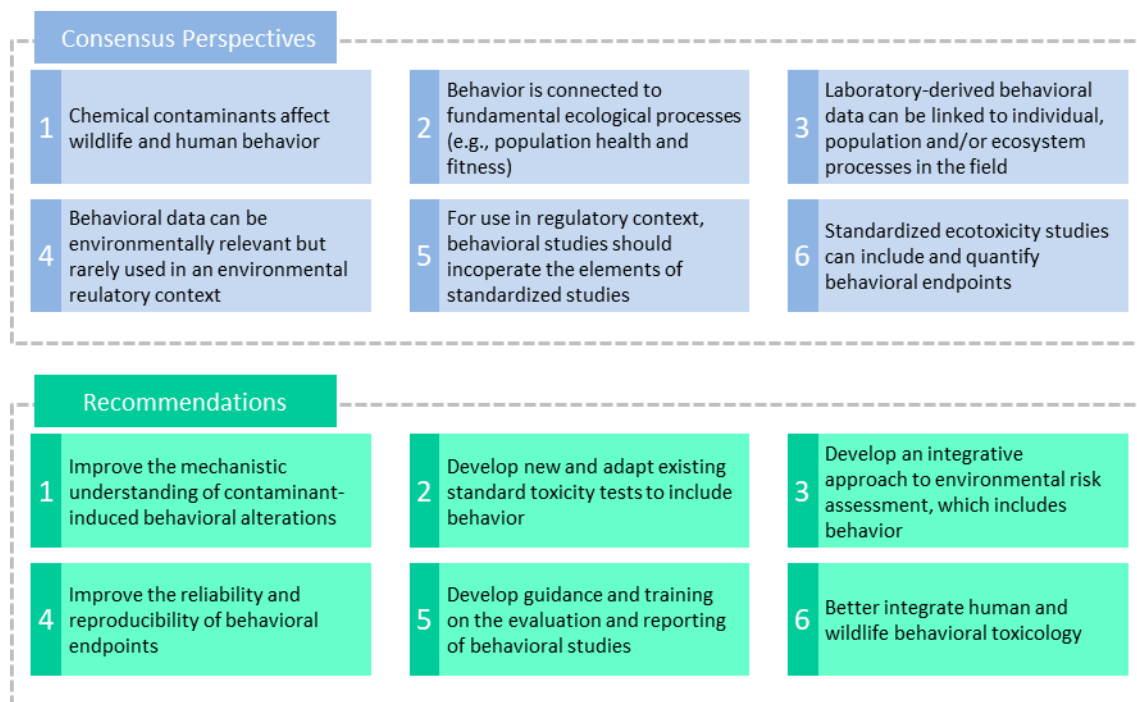


Figure 1. Consensus perspectives and recommendations for the advancement of behavioural ecotoxicology for environmental protection.

## Recommendations

Evident from the workshop was a consistent shared perspective that considerable data exist highlighting that chemical pollutants can impact the behavior of humans and wildlife. Similarly, experts agreed that behavior is a sensitive indicator of disturbance and is linked to fundamental processes that influence individual fitness and can lead to population- and ecosystem-level adverse outcomes. There was also agreement that the field is still evolving and that the current body of research has limitations that will need to be overcome in terms of design, intraspecies variability, cross-species extrapolation, repeatability, and confirming laboratory responses with field collected data. It was also evident that behavior was already incorporated into international regulatory (eco)toxicology either through recorded end points, observational end points, or important factors of consideration within the study design. Further, the commercial sector (e.g., pharmaceutical industry) is making use of behavioral tests during drug development and is increasingly looking toward model aquatic species to replace mammalian species, for reasons of costs and ethics. Hence, based on the consensus perspectives outlined above, the team generated the following recommendations for the improved use of behavioral end points in environmental risk assessment of chemicals (Figure 1).

### *1. Improve the Mechanistic Understanding of Contaminant-Induced Behavioral Alterations.*

In order to obtain a more hypothesis-driven approach to behavioral ecotoxicology, research based on mechanistic (laboratorybased) studies should be promoted. Studies are required that are designed to link behavior to mode of action, so that generalizations can be made on the impact of behavioral change. Furthermore, behavioral ecotoxicologists should explain and emphasize, where possible, the ecological relevance of their recorded end points. A better understanding of the underpinning mechanisms of behavioral ecotoxicology will lead to a more accurate and reliable risk assessment. By providing such robust information on the causality and reliability (quantification, repeatability, etc.), it will also lead to the development and improvements of guidance documents and a better framework for risk assessors.

### *2. Develop New and Adapt Existing Standard Toxicity Tests to Include Behavior.*

Environmental risk assessments are often based on the use of standard studies. There is a need to develop standardized behavioral assays, or to add behavioral end points to already established standard methods. An inventory of established methods in behavioral ecology and ecotoxicology could therefore be used to identify representative, reliable, and sensitive combinations of taxa (model species) and related behaviors (end points). New behavioral end points should be developed for use in risk assessment that are indicative of specific MOAs. Such end points are dependent on improving the mechanistic understanding of behavioral toxicants in wildlife (see recommendation 1). These efforts should initially focus on representative substances with conserved MOAs to develop a reference data system, which can aid studying relationships among behavioral end points, population-relevant effects, and MOA-related end points.<sup>17</sup>

### *3. Develop an Integrative Approach to Environmental Risk Assessment, Which Includes Behavior.*

Currently, environmental risk assessment is fixed around a series of laboratory-based evidence with a limited number of model species and end points. In conjunction with the development of new behavioral end points in standard ecotoxicity tests (see recommendation 2), an integrative approach to risk assessment is required, where impacts of chemicals are assessed using information from laboratory (controlled), mesocosm (semi-realistic), and field (realistic) settings, thus providing more environmentally realistic decision support using multiple lines of evidence. Here, modeling approaches can serve as a cost-effective complementary approach to mesocosm and field studies or monitoring.

#### *4. Improve the Reliability and Reproducibility of Behavioral End Points.*

In order to use behavioral end points in a regulatory framework, there is a need to ensure reliable and reproducible behavioral methods. Each end point will need to establish its single laboratory and multilaboratory variability, and side-by-side testing will need to be conducted with behavioral methods and standard ecotoxicity methods to illustrate how behavioral methods compare with end points assessed within the existing guidelines. Side-by-side method comparisons could begin with chemicals that have a significant ecotoxicological database such as metals and legacy organics and some contaminants of emerging concern. Improved minimum reporting standards (see recommendation 5) would also improve the amount of research available to risk assessment. The use of computer-based analysis has removed questions of subjectivity often impacting confidence in past behavioral studies. The use of “big data” generated from automated recording devices has inevitably come with benefits to both logistics (in experimental design) and accuracy (in terms of eliminating unconscious biases). In time, the use of artificial intelligence (AI) and machine learning will further advance this field to generate new ways of recording and interpreting behavioral data. When working with big data sets and new types of data, there is also a necessity to understand the limitations in the statistical analysis conducted by the scientists. Melvin (2017) highlight the importance of acclimation and recording times in the potential for false positives and negatives in statistical analysis of behavioral data. Therefore, there is a need for scientists to understand their study model organisms and the limitations of their experimental designs and to improve their statistical approaches.

#### *5. Develop Guidance and Training on the Evaluation and Reporting of Behavioral Studies.*

Evaluating the reliability and relevance of behavioral end points can be difficult for novel test designs, end points, test species, and technologies. Therefore, guidance and training on evaluation of behavioral studies for regulatory use is needed. In addition, improving minimum reporting standards in behavioral ecotoxicology would increase the throughput of behavioral studies available for evaluation in risk assessment. Such reporting recommendations are already available for ecotoxicity studies in general (Moermond *et al.*, 2016) and could be adopted for behavioral studies. Providing guidance and training both for risk assessors and researchers within this field could potentially increase data quality and the use of behavioral studies in environmental risk assessment of chemicals.

#### *6. Better Integrate Human and Wildlife Behavioral Toxicology.*

The field of ecotoxicology has always benefited from knowledge transfer from human toxicology aligned to safeguarding public health and the environment. Many of the underlying mechanisms of toxicology have been developed through human toxicology and medicine, which have led to a better

understanding of toxicological modes of action in wildlife. Furthermore, the financial investments supporting medical research have resulted in techniques and technologies that are now commonplace in ecotoxicology. Diverse developments in the field of neurobiology, neuropharmacology, and neurotoxicology over many decades have led to the application of standard toxicity testing (e.g., anxiolytic assays) from rodents to aquatic models. Ecotoxicologists on the other hand have complemented the field of human toxicology by providing sentinel species information and real-world examples of chemical exposures. For example, evidence provided on feminization and reproductive disorders in wildlife complemented the science being generated by human toxicologists and led to decade-long studies of endocrine disruption and subsequent regulatory safeguards for human health and environmental quality. To continue to develop synergies in methodologies and to develop the “one health” initiative, communication among different fields, particularly behavioral ecology, comparative physiology, environmental chemistry, and human toxicology and ecotoxicology, should be encouraged and strengthened further. In doing so, we may capture currently unknown impacts on behavior for both human health and the environment.

## Conclusions

Chemical contaminants can impact the behavior of humans and wildlife. However, our ability to regulate chemicals for these risks, and thus safeguard the environment, is rarely used and is hampered by a lack of understanding and alignment with more traditional end points. Therefore, we must expand the toolbox of behavioral markers and embrace the reliability and robustness of these novel end points. It is evident from human toxicology and pharmaceutical drug development that regulatory authorities and industry have advanced with confidence in the application of behavioral end points for related fields of study and translational applications within regulatory practice. Thus, the perceived hurdles held by some are not insurmountable within behavioral ecotoxicology. In addition, whereas behavioral links with reproduction and growth might seem self-evident within behavioral ecology, there needs to be alignment with standard toxicity methods so that side-by-side comparisons can be made. This progress will allow for robust assessment of their utility as part of the tool kit for ecological risk assessment and regulatory ecotoxicology practice.

## Author Information

### *Corresponding Author*

Alex T. Ford – University of Portsmouth, Portsmouth, United Kingdom; [orcid.org/0000-0001-5202-546X](https://orcid.org/0000-0001-5202-546X); Email: [alex.ford@port.ac.uk](mailto:alex.ford@port.ac.uk)

### *Authors*

Marlene Ågerstrand – Department of Environmental Science, Stockholm University, Stockholm, Sweden

Bryan W. Brooks – Department of Environmental Science, Institute of Biomedical Studies, Baylor University, Waco, Texas 76706, United States; Guangdong Key Laboratory of Environmental Pollution and Health, School of Environment, Jinan University, Guangzhou, China; [orcid.org/0000-0002-6277-9852](https://orcid.org/0000-0002-6277-9852) 597

Joel Allen – U.S. EPA Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 45268, United States

Michael G. Bertram – Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå, Sweden

Tomas Brodin – Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå, Sweden

ZhiChao Dang – National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, Utrecht, The Netherlands

Sabine Duquesne – German Environment Agency (UBA), Dessau, Germany

René Sahn – German Environment Agency (UBA), Dessau, Germany

Frauke Hoffmann – Department of Chemical and Product Safety, German Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany

Henner Hollert – Goethe University Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

Stefanie Jacob – German Environment Agency (UBA), Dessau, Germany

Nils Klüver – Environmental Research Center (UFZ), Leipzig, Germany

James M. Lazorchak – U.S. EPA Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 45268, United States

Mariana Ledesma – Swedish Chemicals Agency (KemI), Sundbyberg, Stockholms Lan, Sweden

Steven D. Melvin – Australian Rivers Institute, Griffith University, Southport, Australia; [orcid.org/0000-0002-5355-4213](https://orcid.org/0000-0002-5355-4213)

Silvia Mohr – German Environment Agency (UBA), Dessau, Germany

Stephanie Padilla – Center for Computational Toxicology and Exposure, U.S. EPA, Durham, North Carolina, United States

Gregory G. Pyle – Environment Protection Authority Victoria (EPA), Carlton, Australia;

[orcid.org/0000-0003-4338-7674](https://orcid.org/0000-0003-4338-7674)

Stefan Scholz – Swedish Chemicals Agency (KemI), Sundbyberg, Stockholms Lan, Sweden

Minna Saaristo – Environment Protection Authority Victoria (EPA), Carlton, Australia; [orcid.org/0000-0002-9632-8611](https://orcid.org/0000-0002-9632-8611)

Els Smit – National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, Utrecht, The Netherlands

Jeffery A. Steevens – U.S. Geological Survey, Columbia Environmental Research Center, Columbia, Missouri 65201, United States; [orcid.org/0000-0003-3946-1229](https://orcid.org/0000-0003-3946-1229)

Sanne van den Berg – Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

Werner Kloas – Leibniz-Institute for Freshwater Ecology and Inland Fisheries, Berlin, Germany

Bob B.M. Wong – School of Biological Sciences, Monash University, Melbourne, Victoria, Australia

Michael Ziegler – Animal Physiological Ecology, University of Tübingen, Tübingen, Germany

Gerd Maack – German Environment Agency (UBA), Dessau, Germany

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.est.0c06493>

### *Notes*

The authors declare no competing financial interest.

### *Biography*

Professor Alex Ford is a Professor of Biology and Deputy Director for the Centre of Blue Governance at the University of Portsmouth (U.K.). His interests and expertise lie within invertebrate biology, parasitology, and environmental toxicology. He is a long serving member of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) and has a passion for cross-disciplinary research and scientific communication.

## Acknowledgements

This workshop was organized by the German Environment Agency (UBA) and financed by UBA and by Stockholm University (Sweden). The authors would also like to thank the following agencies for funding support: the Australian Research Council (DP190100642 and FT190100014 to BMW), the Swedish Research Council Formas (2018-00828 to TB), the Kempe Foundations (SMK-1954), and the Marie-Claire Cronstedt Foundation (to M.G.B.); the Excellence Initiative of the German Federal and State Governments and BMBF (EXC 2186 and FKZ 02WRS1419C to H.H.); and the U.S. Geological Survey Environmental Health Mission Area. The findings and conclusions in this article are those of the authors and do not necessarily represent the views of the U.S. EPA or any agencies/organizations. Any use of trade, firm, or product names is for descriptive purposes only and does not imply endorsement by the U.S. Government.



## References

- Ågerstrand, M., Arnold, K., Balshine, S., Brodin, T., Brooks, B. W., Maack, G., McCallum, E. S., Pyle, G., Saaristo, M., Ford, A. T. 2020. Emerging investigator series: use of behavioural endpoints in the regulation of chemicals, *Environmental Science: Progress and Impacts* 22(1):49-65; DOI: 10.1039/c9em00463g.
- Ankley, G. T., Bennett, R. S., Erickson, R. J., Hoff, D. J., Hornung, M. W., Johnson, R. D., Mount, D. R., Nichols, J. W., Russom, C. L., Schmieder, P. K. 2010. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment, *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 29(3):730-741; DOI: 10.1002/etc.34.
- Aulsebrook, L. C., Bertram, M. G., Martin, J. M., Aulsebrook, A. E., Brodin, T., Evans, J. P., Hall, M. D., O'Bryan, M. K., Pask, A. J., Tyler, C. R. 2020. Reproduction in a polluted world: implications for wildlife, *Reproduction* 160(2):R13-R23; DOI: 10.1530/REP-20-0154.
- Bennett, D., Bellinger, D. C., Birnbaum, L. S., Bradman, A., Chen, A., Cory-Slechta, D. A., Engel, S. M., Fallin, M. D., Halladay, A., Hauser, R., Hertz-Picciotto, I., Kwiatkowski, C. F., Lanphear, B. P., Marquez, E., Marty, M., McPartland, J., Newschaffer, C. J., Payne-Sturges, D., Patisaul, H. B., Perera, F. P., Ritz, B., Sass, J., Schantz, S. L., Webster, T. F., Whyatt, R. M., Woodruff, T. J., Zoeller, R. T., Anderko, L., Campbell, C., Conry, J. A., *et al.* 2016. Project TENDR: Targeting Environmental Neuro-Developmental Risks The TENDR Consensus Statement, *Environmental Health Perspectives* 124(7):A118-122; DOI: 10.1289/EHP358.
- Benson, S. M., Talbott, E. O., Brink, L. L., Wu, C., Sharma, R. K., Marsh, G. M. 2017. Environmental lead and childhood blood lead levels in US children: NHANES, 1999–2006, *Archives of Environmental & Occupational Health* 72(2):70-78; DOI: 10.1080/19338244.2016.1157454.
- Boon, A., Réale, D., Boutin, S. 2008. Personality, habitat use, and their consequences for survival in North American red squirrels *Tamiasciurus hudsonicus*, *Oikos* 117(9):1321-1328; DOI: 10.1111/j.0030-1299.2008.16567.x.
- Boyd, W. A., Brewer, S. K., Williams, P. L. 2002. Altered Behaviour of Invertebrates Living in Polluted Environments, In: Dell'Omo, G., Behavioural ecotoxicology, *John Wiley & Sons, LTD*, pp. 293-336; ISSN: 0471968528.
- Brodin, T., Piovano, S., Fick, J., Klaminder, J., Heynen, M., Jonsson, M. 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 369(1656); DOI: 10.1098/rstb.2013.0580.
- Bruni, G., Lakhani, P., Kokel, D. 2014. Discovering novel neuroactive drugs through high-throughput behavior-based chemical screening in the zebrafish, *Frontiers in Pharmacology* 5:153; DOI: 10.3389/fphar.2014.00153.
- Calderón-Garcidueñas, L., Torres-Jardón, R., Kulesza, R. J., Park, S. B., D'Angiulli, A. 2014. Air pollution and detrimental effects on children's brain. The need for a multidisciplinary approach to the issue complexity and challenges, *Frontiers in Human Neuroscience* 8:613; DOI: 10.3389/fnhum.2014.00613.

- Campbell, D. L., Weiner, S. A., Starks, P. T., Hauber, M. E. Year.** Context and control: behavioural ecology experiments in the laboratory, in: *Annales Zoologici Fennici*, Year, *BioOne* 46(2):112-123.
- Candolin, U., Wong, B. B. 2019.** Mate choice in a polluted world: consequences for individuals, populations and communities, *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 374(1781):20180055; DOI: 10.1098/rstb.2018.0055.
- Dell'Omo, G. 2002.** Behavioural ecotoxicology, *John Wiley & Sons*, ISBN: 978-0-471-96852-8.
- Dingemans, N. J., Both, C., Drent, P. J., Tinbergen, J. M. 2004.** Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment, *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* 271(1541):847-852; DOI: 10.1098/rspb.2004.2680.
- ECHA. 2011.** Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R. 4: Evaluation of available information *Agency, E. C.*; [https://echa.europa.eu/documents/10162/13643/information\\_requirements\\_r4\\_en.pdf/d6395ad2-1596-4708-ba86-0136686d205e](https://echa.europa.eu/documents/10162/13643/information_requirements_r4_en.pdf/d6395ad2-1596-4708-ba86-0136686d205e) (09.04.2021).
- Eriksson, B. K., Ljunggren, L., Sandström, A., Johansson, G., Mattila, J., Rubach, A., Råberg, S., Snickars, M. 2009.** Declines in predatory fish promote bloom-forming macroalgae, *Ecological Applications* 19(8):1975-1988; DOI: 10.1890/08-0964.1.
- Estes, J. A., Tinker, M. T., Williams, T. M., Doak, D. F. 1998.** Killer whale predation on sea otters linking oceanic and nearshore ecosystems, *Science* 282(5388):473-476; DOI: 10.1126/science.282.5388.473
- Evans, G. W. 2019.** Projected behavioral impacts of global climate change, *Annual Review of Psychology* 70:449-474; DOI: 10.1146/annurev-psych-010418-103023. .
- Fisher, D. N., James, A., Rodríguez-Muñoz, R., Tregenza, T. 2015.** Behaviour in captivity predicts some aspects of natural behaviour, but not others, in a wild cricket population, *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* 282(1809):20150708; DOI: 10.1098/rspb.2015.0708.
- Fraser, D. F., Gilliam, J. F., Daley, M. J., Le, A. N., Skalski, G. T. 2001.** Explaining leptokurtic movement distributions: intrapopulation variation in boldness and exploration, *The American Naturalist* 158(2):124-135; DOI: 10.1086/321307.
- Godfray, H. C. J., Blacquiere, T., Field, L. M., Hails, R. S., Petrokofsky, G., Potts, S. G., Raine, N. E., Vanbergen, A. J., McLean, A. R. 2014.** A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281(1786):20140558; DOI: 10.1098/rspb.2014.0558.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E. L. 2015.** Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers, *Science* 347(6229); DOI: 10.1126/science.1255957.
- Grandjean, P., Landrigan, P. J. 2014.** Neurobehavioural effects of developmental toxicity, *The Lancet Neurology* 13(3):330-338; DOI: 10.1016/s1474-4422(13)70278-3.
- Haldane, J. 1932.** The Causes of Evolution, *Harper's*, New York, ISBN: 0-691-02442-1.

- Hellström, G., Klaminder, J., Jonsson, M., Fick, J., Brodin, T. 2016.** Upscaling behavioural studies to the field using acoustic telemetry, *Aquatic Toxicology* 170:384-389; DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.11.005.
- Henry, M., Cerrutti, N., Aupinel, P., Decourtye, A., Gayraud, M., Odoux, J.-F., Pissard, A., Rüger, C., Bretagnolle, V. 2015.** Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282(1819):20152110; DOI: 10.1098/rspb.2015.2110.
- Herborn, K. A., Macleod, R., Miles, W. T. S., Schofield, A. N. B., Alexander, L., Arnold, K. E. 2010.** Personality in captivity reflects personality in the wild, *Animal Behaviour* 79(4):835-843; DOI: 10.1016/j.anbehav.2009.12.026.
- Hoover, S. E. R., Tylianakis, J. M. 2012.** Species Interaction, In: **Candloin, U. und Wong, B. B. M.,** Behavioural responses to a changing world, mechanisms and consequences, *Oxford University Press, Oxford*, pp. 129-142; ISSN: 9780199602568.
- Houde, A. E. 1987.** Mate choice based upon naturally occurring color-pattern variation in a guppy population, *Evolution* 41(1):1-10; DOI: 10.1111/j.1558-5646.1987.tb05766.x.
- Janetski, D. J., Chaloner, D. T., Tiegs, S. D., Lamberti, G. A. 2009.** Pacific salmon effects on stream ecosystems: a quantitative synthesis, *Oecologia* 159(3):583-595; DOI: 10.1007/s00442-008-1249-x.
- Jennions, M. D., Petrie, M. 1997.** Variation in mate choice and mating preferences: A review of causes and consequences, *Biological Reviews* 72(2):283-327; DOI: 10.1111/j.1469-185X.1997.tb00015.x.
- Klaminder, J., Hellström, G., Fahlman, J., Jonsson, M., Fick, J., Lagesson, A., Bergman, E., Brodin, T. 2016.** Drug-Induced Behavioral Changes: Using Laboratory Observations to Predict Field Observations, *Frontiers in Environmental Science* 4; DOI: 10.3389/fenvs.2016.00081.
- Klimisch, H.-J., Andreae, M., Tillmann, U. 1997.** A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25(1):1-5; ISSN: 0273-2300.
- Kokko, H., López-Sepulcre, A. 2007.** The ecogenetic link between demography and evolution: can we bridge the gap between theory and data?, *Ecology Letters* 10(9):773-782; DOI: 10.1111/j.1461-0248.2007.01086.x.
- Legradi, J. B., Di Paolo, C., Kraak, M. H. S., van der Geest, H. G., Schymanski, E. L., Williams, A. J., Dingemans, M. M. L., Massei, R., Brack, W., Cousin, X., Begout, M. L., van der Oost, R., Carion, A., Suarez-Ulloa, V., Silvestre, F., Escher, B. I., Engwall, M., Nilén, G., Keiter, S. H., Pollet, D., Waldmann, P., Kienle, C., Werner, I., Haigis, A. C., Knapen, D., Vergauwen, L., Spehr, M., Schulz, W., Busch, W., Leuthold, D., *et al.* 2018.** An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment, *Environmental Sciences Europe* 30(1):46; DOI: 10.1186/s12302-018-0173-x.
- Lu, J. G., Lee, J. J., Gino, F., Galinsky, A. D. 2018.** Polluted Morality: Air Pollution Predicts Criminal Activity and Unethical Behavior, *Psychological Science* 29(3):340-355; DOI: 10.1177/0956797617735807.

- Makris, S. L., Raffaele, K., Allen, S., Bowers, W. J., Hass, U., Alleva, E., Calamandrei, G., Sheets, L., Amcoff, P., Delrue, N. 2009.** A retrospective performance assessment of the developmental neurotoxicity study in support of OECD test guideline 426, *Environmental Health Perspectives* 117(1):17-25; DOI: 10.1289/ehp.11447.
- Martin, T. L., Solbeck, P. A., Mayers, D. J., Langille, R. M., Buczek, Y., Pelletier, M. R. 2013.** A review of alcohol-impaired driving: The role of blood alcohol concentration and complexity of the driving task, *Journal of Forensic Sciences* 58(5):1238-1250; DOI: 10.1111/1556-4029.12227.
- Melvin, S. D., Wilson, S. P. 2013.** The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis, *Chemosphere* 93(10):2217-2223; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.07.036.
- Melvin, S. D. 2017.** Effect of antidepressants on circadian rhythms in fish: Insights and implications regarding the design of behavioural toxicity tests, *Aquatic Toxicology* 182:20-30; DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.11.007.
- Moermond, C. T., Kase, R., Korkaric, M., Ågerstrand, M. 2016.** CRED: Criteria for reporting and evaluating ecotoxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(5):1297-1309; DOI: 10.1002/etc.3259.
- Moiron, M., Laskowski, K. L., Niemelä, P. T. 2020.** Individual differences in behaviour explain variation in survival: a meta-analysis, *Ecology Letters* 23(2):399-408; DOI: 10.1111/ele.13438.
- Niankara, I., Zoungrana, D. T. 2018.** Interest in the biosphere and students environmental awareness and optimism: A global perspective, *Global Ecology and Conservation* 16:e00489; DOI: 10.1016/j.gecco.2018.e00489.
- OECD. 1997.** Test No. 424: Neurotoxicity Study in Rodents, *Organisation for Economic Co-operation and Development*; DOI: 10.1787/9789264071025-en.
- OECD. 2000.** Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test, *Organisation for Economic Co-operation and Development*; DOI: 10.1787/9789264070202-en.
- OECD. 2007.** Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study, *Organisation for Economic Co-operation and Development*; DOI: 10.1787/9789264067394-en.
- OECD. 2009a.** Test No. 230: 21-day Fish Assay, *Organisation for Economic Co-operation and Development*; DOI: 10.1787/9789264076228-en.
- OECD. 2009b.** Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay, *Organisation for Economic Co-operation and Development*; DOI: 10.1787/9789264076242-en.
- OECD. 2012a.** Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay, *Organisation for Economic Co-operation and Development*; DOI: 10.1787/9789264185265-en.
- OECD. 2012b.** Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, *Organisation for Economic Co-operation and Development*; DOI: 10.1787/9789264185296-en.
- OECD. 2013.** Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test, *Organisation for Economic Co-operation and Development*; DOI: 10.1787/9789264203785-en.
- OECD. 2016.** Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*), *Organisation for Economic Co-operation and Development*; DOI: 10.1787/9789264264496-en.

- OECD. 2018.** Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, *Organisation for Economic Co-operation and Development*; DOI: 10.1787/9789264185371-en.
- OECD. 2019.** Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2, *OECD Publishing*, Paris; DOI: 10.1787/9789264069961-en.
- Peterson, E. K., Buchwalter, D. B., Kerby, J. L., LeFauve, M. K., Varian-Ramos, C. W., Swaddle, J. P. 2017.** Integrative behavioral ecotoxicology: bringing together fields to establish new insight to behavioral ecology, toxicology, and conservation, *Current Zoology* 63(2):185-194; DOI: 10.1093/cz/zox010.
- Pyle, G., Ford, A. T. 2017.** Behaviour revised: Contaminant effects on aquatic animal behaviour, *Aquatic Toxicology* 182:226-228; DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.11.008.
- Reznick, D. A., Bryga, H., Endler, J. A. 1990.** Experimentally induced life-history evolution in a natural population, *Nature* 346(6282):357-359; DOI: 10.1038/346357a0.
- Robert, K., Garant, D., Pelletier, F. 2012.** Keep in touch: does spatial overlap correlate with contact rate frequency?, *The Journal of Wildlife Management* 76(8):1670-1675; DOI: 10.1002/jwmg.435.
- Ruffin, J. B. 1963.** Functional testing for behavioral toxicity: a missing dimension in experimental environmental toxicology, *Journal of Occupational Medicine* 5:117-121; PMID: 13983199; ISSN: 0096-1736.
- Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M. G., Brooks, B. W., Ehlman, S. M., McCallum, E. S., Sih, A., Sundin, J., Wong, B. B. M., Arnold, K. E. 2018.** Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife, *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences Series B* 285(1885); DOI: 10.1098/rspb.2018.1297.
- Sanchez-Bayo, F., Goka, K. 2014.** Pesticide residues and bees—a risk assessment, *PLoS One* 9(4):e94482; DOI: 10.1371/journal.pone.0094482.
- Sanders, A. P., Henn, B. C., Wright, R. O. 2015.** Perinatal and childhood exposure to cadmium, manganese, and metal mixtures and effects on cognition and behavior: a review of recent literature, *Current environmental health reports* 2(3):284-294; ISSN: 2196-5412.
- Scott, G. R., Sloman, K. A. 2004.** The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity, *Aquatic Toxicology* 68(4):369-392; DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.03.016.
- Shelford, V. E. 1917.** An experimental study of the effects of gas waste upon fishes with especial reference to stream pollution, *Illinois Natural History Survey Bulletin* 11:381-412; DOI: 10.21900/j.inhs.v11.363
- Sih, A. 1984.** The behavioral response race between predator and prey, *The American Naturalist* 123(1):143-150; DOI: 10.1086/284193.
- Sih, A., Englund, G., Wooster, D. 1998.** Emergent impact of multiple predators on prey, *Trends in Ecology & Evolution* 13(9):350-355; DOI: 10.1016/S0169-5347(98)01437-2.
- Sih, A. 2013.** Understanding variation in behavioural responses to human-induced rapid environmental change: a conceptual overview, *Animal Behaviour* 85(5):1077-1088; DOI: 10.1016/j.anbehav.2013.02.017.

- Sollmann, T. 1906.** The effects of a series of poisons on adult and embryonic funduli, *American Journal of Physiology* 16(1):1-46; DOI: 10.1152/ajplegacy.1906.16.1.1.
- Traveset, A., Heleno, R., Chamorro, S., Vargas, P., McMullen, C. K., Castro-Urgal, R., Nogales, M., Herrera, H. W., Olesen, J. M. 2013.** Invaders of pollination networks in the Galápagos Islands: emergence of novel communities, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280(1758):20123040; DOI: 10.1098/rspb.2012.3040.
- Tyler, C. R., Allan, A. M. 2014.** The effects of arsenic exposure on neurological and cognitive dysfunction in human and rodent studies: a review, *Current environmental health reports* 1(2):132-147; ISSN: 2196-5412.
- Weiss, B. Year.** The scope and promise of behavioral toxicology, in: Behavioral measures of neurotoxicity. Report of a symposium, Year, National Academy Press Washington, DC:395-413.
- Wong, B. B. M., Candolin, U. 2014.** Behavioral responses to changing environments, *Behavioral Ecology* 26(3):665-673; DOI: 10.1093/beheco/aru183.
- Yuen, C. H., Pillay, N., Heinrichs, M., Schoepf, I., Schradin, C. 2016.** Personality traits are consistent when measured in the field and in the laboratory in African striped mice (*Rhabdomys pumilio*), *Behavioral Ecology and Sociobiology* 70(8):1235-1246; DOI: 10.1007/s00265-016-2131-1.
- Zala, S. M., Penn, D. J. 2004.** Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges, *Animal Behaviour* 68(4):649-664; DOI: 10.1016/j.anbehav.2004.01.005.
- Zenick, H., Reiter, L. W. 1977.** Behavioral Toxicology: An Emerging Discipline: Proceedings of the Southwest Psychological Association Annual Meeting, April 30, 1976, Albuquerque, New Mexico, *PsycEXTRA Dataset*; DOI: 10.1037/e516362012-001.

## Anhang

### Verwendete Chemikalien

### Histopathologische Untersuchungen

#### *Gewebeinfiltration*

Tabelle 4: Stufen der Infiltration des Gewebes

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

## Hämatoxylin Eosin Färbung

Eosin: 3,75 g Eosin + 750 mL Aqua dest. + 8 Tropfen 100 % Essigsäure

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

Roti®-Histol: Fertiglösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 5: Färbeprotokoll der HE-Färbung

Färbeschritt	Medium	Dauer
1	Roti®-Histol	5 min
2	Roti®-Histol	5 min
3	100 % Ethanol	5 min
4	90 % Ethanol	5 min
5	80 % Ethanol	5 min
6	70 % Ethanol	5 min
7	Aqua dest.	5 min
8	Hämatoxylin nach Mayer	4 min
9	Aqua dest.	4 s
10	fließendes Leitungswasser	20 min
11	Eosin	5 min
12	70 % Ethanol	10 s
13	80 % Ethanol	5 min
14	90 % Ethanol	5 min
15	96 % Ethanol	5 min
16	100 % Ethanol	5 min
17	Roti®-Histol	5 min
18	Roti®-Histol	5 min



### Alcianblau Perjodsäure-Schiffsreagenz Färbung

Alcianblau: 10 g Alcianblau + 1 L 3 % Essigsäure

1 % Perjodsäure: 7,5 g Perjodsäure + 750 mL Aqua dest.

Sulfitwasser: 2227,5 mL Aqua dest. + 22,5 ml 1 M Salzsäure  
+ 11,25 g Natriumdisulfit

Schiffssches Reagenz: Fertiglösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Tabelle 6: Färbeprotokoll der Alcianblau-PAS Färbung

Färbeschritt	Medium	Dauer
1	Roti®-Histol	3 min
2	96 % Ethanol	2 min
3	80 % Ethanol	2 min
4	60 % Ethanol	2 min
5	Aqua dest.	5 min
6	3 % Essigsäure	3 min
7	Alcianblau	30 min
8	3 % Essigsäure	4 s
9	Aqua dest.	5 min
10	1 % Perjodsäure	10 min
11	Aqua dest.	5 s
12	Aqua dest.	5 s
13	Aqua dest.	5 s
14	Schiffssches Reagenz	5 min
15	Sulfitwasser	2 min
16	Sulfitwasser	2 min
17	Sulfitwasser	2 min
18	Fließendes Leitungswasser	15 min
19	Aqua dest.	5 s
20	70 % Ethanol	5 min
21	80 % Ethanol	5 min
22	90 % Ethanol	5 min
23	100 % Ethanol	5 min
24	Roti®-Histol	5 min

## B-Esterasen-Aktivität

### *Homogenisation*

Aprotinin:	5 mg Aprotinin + 1 mL Aqua bidest.
Leupeptin:	5 mg Leupeptin + 1 mL Aqua bidest.
Pepstatin:	5 mg Pepstatin + 500 µL Aqua bidest. + 500 µL 100 % Ethanol
Antipain:	1 mg Antipain + 1 mL Aqua bidest.
Trypsin:	100 mg Trypsin + 1 mL Aqua bidest
Inhibitor Mix:	100 µL Aptotinin + 100 µL Leupeptin + 100 µL Pepstatin + 100 µL Antipain + 100 µL Trypsin
Tris-LS:	1,21 g Tris <sub>base</sub> + 0,584 g Natriumchlorid + 500 mL Aqua bidest., pH auf 7,3 einstellen
Extraktionslösung:	5 ml 2x Tris-LS Puffer + 5 ml Aqua bidest. + 50 µL Inhibitor Mix

### *Lowry Assay*

Lösung A:	20 g Natriumcarbonat + 4 g Natriumhydroxid + 1,6 g Natriumtartrate + 10 g Natriumdodecylsulfat + 1 L Aqua bidest.
Lösung B:	4 g Kupfersulfat-Pentahydrat + 100 mL Aqua bidest.
Lösung C:	19,8 mL Lösung A + 200 µL Lösung B

### *AChE Assay*

Natriumhydrogenphosphat- 34,5 g Natriumhydrogenphosphat-monohydrat  
Puffer:

DTNB Lösung: 594,6 mg 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure  
+ 223 mg Natriumhydrogencarbonat  
+ 4 mL Natriumhydrogenphosphat Puffer + 100 mL Aqua bidest.

Ellman-Puffer: 4 mL Natriumhydrogenphosphatpuffer + 0,5 mL DTNB Lösung  
+ 13,1 mL Aqua bidest.

AcSCh Substratlösung: 867,6 mg Acetylthiocholiniodid + 100 mL Aqua bidest.

### *CbE Assay mit NPA Substrat*

Tris-EDTA Puffer: 1,21 g Trisbase + 0,186 g Ethylendiamintetraessigsäure  
+ 500 mL Aqua bidest., pH auf 8 einstellen

NPA Substratlösung: 181,5 mg 4-Nitrophenylacetat + 10 ml Ethanol

### *CbE Assay mit NPV Substrat*

Tris-HCl Puffer: 3,02 g Trisbase + 500 mL Aqua bidest., pH auf 7,5 einstellen

NPV Substratlösung: 1 g 4-Nitrophenylvalerat + 45 mL Ethanol

## Stressproteinlevel

### *Homogenisierung*

konzentrierter Extraktionspuffer:	3,9 g Kaliumacetat + 540 mg Magnesiumacetat + 2,4 g Hepes + 500 mL Aqua bidest, pH auf 7,5 einstellen
1:10 Extraktionspuffer:	10 mL konzentrierter Extraktionspuffer + 90 mL Aqua bidest.
SDS-Probenpuffer:	20 mL Glycerin + 3 g Natriumdodecylsulfat + 300 µL β-Mercaptoethanol + 140 mg TrisHCl + 20 mg Trisbase + 5 mg Bromphenolblau + 100 mL Aqua bidest.

### *Bradford Assay*

Bradford-Reagenz:	100 mg Coomassie-Brilliantblau G-250 + 50 mL 95 % Ethanol + 100 mL 85 % Phosphorsäure + 1000 mL Aqua bidest.
-------------------	--

### *Gelelektrophorese*

Acrylamid/Bisacrylamid:	30 g Acrylamid + 300 mg N,N'-Bisacrylamid + 100 mL Aqua bidest.
4 × Trenngelpuffer:	18,5 g Tris HCl + 76,95 g Trisbase + 2 g Natriumdodecylsulfat + 500 mL Aqua bidest., pH auf 8,8 einstellen
4 × Sammelgelpuffer:	17,55 g Tris <sub>base</sub> + 1,68 g TrisHCl + 2 g Natriumdodecylsulfat + 500 mL Aqua bidest., pH auf 6,8 einstellen
10 % Ammoniumpersulfat:	1 g Ammoniumpersulfat + 10 mL Aqua bidest.
Trenngel:	2,65 mL Aqua bidest. + 3 mL Acrylamid/Bisacrylamid + 1,87 mL 4 × Trenngelpuffer + 40 µL 10 % Ammoniumpersulfat + 20 µL TEMED
Sammelgel:	1,4 mL Aqua bidest. + 1 mL Acrylamid/Bisacrylamid + 0,6 mL 4 × Sammelgelpuffer, 20 µL 10 % Ammoniumpersulfat + 20 µL TEMED
10 × E-Puffer:	143 g Glycin + 30,3 g Tris <sub>base</sub> + 10 g Natriumdodecylsulfat
1 × E-Puffer:	10 mL 10 × E-Puffer + 90 mL Aqua bidest.

### *Proteintransfer*

10 × Transfer-Puffer: 9,5 g Tris HCl + 63,4 g Tris<sub>base</sub> + 36,3 g Glycin  
+ 4,6 g Natriumdodecylsulfat + 1000 mL Aqua bidest.,  
pH auf 9 einstellen

1 × Transfer-Puffer: 80 ml 10 × Transfer-Puffer + 720 mL Aqua bidest.  
+ 200 mL Methanol

### *Antikörper Inkubation*

10 × TBS: 88 g Natriumchlorid + 63,5 g TrisHCl + 11,8 g Trisbase  
+ 1000 mL Aqua bidest., pH auf 7,5 einstellen

1 × TBS: 10 mL 10 × TBS + 90 mL Aqua bidest.

Absättigungslösung: 5 mL Pferdeserum + 5 mL 1 × TBS

erste Antikörperlösung: 4,5 ml 1 × TBS + 0,5 mL Pferdeserum  
+ 1 µL 1. Antikörper (mouse anti-human Hsp70)

zweite Antikörperlösung: 4,5 ml 1 × TBS + 0,5 mL Pferdeserum  
+ 5 µL 2. Antikörper (goat anti-mouse IgG Peroxidase Konjugat)

### *Membranfärbung*

30mM Tris: 0,6 g TrisHCl + 1,31 g Trisbase + 500 mL Aqua bidest.,  
pH auf 8,5 einstellen

Substratlösung für Nitrocellulosemembran: 4,5 mg 4-Chlor(1)naphtol + 1,5 mL Methanol + 25 mL 30 mM Tris  
+ 40 µL 30 % Wasserstoffperoxid

## Superoxiddismutase-Aktivität

PBS-Puffer:	11,18 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat + 2,62 g Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat + 1000 mL Aqua bidest., pH auf 7,4 einstellen
Hepes-Puffer:	190 mg Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N',N'- tetraessigsäure (EGTA) + 19,127 g Mannitol + 11,981 g Saccharose + 500 mL Aqua bidest., pH auf 7,2 einstellen
Probenpuffer:	7,88 g TrisHCl + 1000 ml Aqua bidest., pH auf 8 einstellen
Assay-Puffer:	7,88 g TrisHCl + 39,3 mg Diethylentriaminpentaessigsäure + 13,6 mg Hypoxanthin + 1000 ml Aqua bidest., pH auf 8 einstellen

## Cortisolgehalt

PBS-Puffer:	12,01 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat + 1,79 g Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat + 1000 mL Aqua bidest., pH auf 7,6 einstellen
-------------	--

## Publikationsliste und Konferenzbeiträge

### Publikationen

- Ford, A. T., Ågerstrand, M., Brooks, B. W., Allen, J., Bertram, M. G., Brodin, T., Dang, Z., Duquesne, S., Sahm, R., Hoffmann, F., Hollert, H., Jacob, S., Klüver, N., Lazorchak, J., Ledesma, M., Melvin, S. D., Mohr, S., Padilla, S., Pyle, G., Scholz, S., Saaristo, M., Smit, E., Steevens, J. A., van den Berg, S., Kloas, W., Wong, B. B.M., Ziegler, M., Maack, G., 2021,** The Role of Behavioral Ecotoxicology in Environmental Protection, *Environmental Science & Technology*, DOI: [10.1021/acs.est.0c06493](https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06493)
- Theilmann, P., Greiner-Perth, K., Jacob, S., Knoll, M., Schäfer, M., Stängle, M., Ziegler, M., Scheurer, M., Köhler, H.-R. und Triebkorn, R., 2017,** Does Waste Water Treatment Plant Upgrading with Powdered Activated Carbon Result in Reduced Water and Sediment Toxicity of the Receiving Stream?, *International Journal of Water and Wastewater Treatment* 3(2), DOI: [10.16966/2381-5299.141](https://doi.org/10.16966/2381-5299.141)
- Wilhelm, S., Jacob, S., Ziegler, M., Köhler, H.-R. und Triebkorn, R., 2018,** Influence of different wastewater treatment technologies on genotoxicity and dioxin-like toxicity in effluent-exposed fish, *Environmental Sciences Europe* 30(25), DOI: [10.1186/s12302-018-0154-0](https://doi.org/10.1186/s12302-018-0154-0)
- Ziegler, M., Banet, M., Bauer, R., Köhler, H.-R., Stepinski, S., Tisler, S., Huhn, C., Zwiener, C. und Triebkorn, C., 2020,** Behavioural changes in brown trout after exposure to venlafaxine, *Frontiers in Environmental Science* 8(586584), DOI: [10.3389/fenvs.2020.586584](https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.586584)
- Ziegler, M., Eckstein, H., Köhler, H.-R., Ottmann, S., Reinelt, L., Stepinski, S. und Triebkorn, R., 2020,** Biochemical and structural biomarkers in brown trout exposed to two different antidepressants, *Environmental Sciences Europe* 32(158), DOI: [10.1186/s12302-020-00437-z](https://doi.org/10.1186/s12302-020-00437-z)
- Ziegler, M., Knoll, S., Köhler, H.-R., Tisler, S., Huhn, C., Zwiener, C. und Triebkorn, R., 2020,** Impact of the antidepressant citalopram on the behaviour of two different life stages of brown trout, *PeerJ* 8(e8765), DOI: [10.7717/peerj.8765](https://doi.org/10.7717/peerj.8765)

## Konferenzbeiträge

- Ziegler, M., Bauer, R., Eckstein, H., Knoll, S., Reinelt, L., Tisler, S., Stepinski, S., Huhn, C., Zwiener, C., Tribskorn, R.,** Impact of the two antidepressants citalopram and venlafaxine on brown trout (*Salmo trutta f. fario*), Posterbeitrag zur *30. Jahrestagung der SETAC-Europe* Onlinekonferenz SciCon 2020
- Ziegler, M., Reinelt, L., Tisler, S., Knoll, S., Huhn, C., Zwiener, C., Tribskorn, R., 2018,** Effekte der Antidepressiva Citalopram und Venlafaxin auf Bachforellen und Posthornschncken, Posterbeitrag zum *Statuskolloquium Wassernetzwerk* in Stuttgart 2018
- Ziegler, M., Reinelt, L., Tisler, S., Tribskorn, R., 2018,** Behavioural endpoints and biochemical biomarkers to investigate effects of Citalopram in brown trout (*Salmo trutta f. fario*), Posterbeitrag zur *28. Jahrestagung der SETAC-Europe* in Rom 2018
- Ziegler, M., Reinelt, L., Tisler, S., Tribskorn, R., 2018,** Einfluss von Citalopram auf das Verhalten der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*) und Reaktionen biochemischer Biomarker, Posterbeitrag zur *23. Jahrestagung der SETAC-GLB* in Münster 2018
- Ziegler, M., Stepinski, S., Tribskorn, R., 2020,** Impact of the two antidepressants citalopram and venlafaxine on brown trout (*Salmo trutta f. fario*) and great ramshorn snail (*Planorbarius corneus*), Posterbeitrag zur *Jahrestagung der Ethologischen Gesellschaft, Etho2020* in Tübingen 2020
- Ziegler, M., Tisler, S., Zwiener, C., Tribskorn, R., 2019,** Impact of the two antidepressants citalopram and venlafaxine on brown trout (*Salmo trutta f. fario*) and great ramshorn snail (*Planorbarius corneus*), Vortrag auf der *Jahrestagung der 29. SETAC-Europe* in Helsinki 2019
- Ziegler, M., Tribskorn, R., 2019,** Impact of the two antidepressants citalopram and venlafaxine on brown trout (*Salmo trutta f. fario*) and great ramshorn snail (*Planorbarius corneus*), Vortrag auf dem *Graduate Meeting: Animal Behaviour* in Plön 2019
- Ziegler, M., Zindler, F., Braunbeck, T., Tribskorn, R., 2018,** Verhaltensänderungen bei Bachforelle und Zebraäbrbling durch das Antidepressivum Citalopram, Posterbeitrag zum *Statuskolloquium Wassernetzwerk* in Stuttgart 2018



## Danksagung

Ich danke dem Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg, das durch das Verbundprojekt Wassernetzwerk Baden-Württemberg das Projekt Effect-Net finanziert und somit diese Arbeit ermöglicht hat.

Weiterhin danke ich ganz besonders meiner Betreuerin Prof. Dr. Rita Triebskorn, die mir die Möglichkeit gab, diese Promotion im Projekt Effect-Net zu verwirklichen. Sie stand mir während der kompletten Zeit mit Rat und Tat zur Seite und half mir bei allen Fragen und Problemen sowie bei der Erstellung der Manuskripte. Einen großen Dank geht auch an Prof. Dr. Heinz-R. Köhler, der mir die Möglichkeit gab, alle Arbeiten im Labor der Arbeitsgruppe *Physiologische Ökologie der Tiere* zu absolvieren und ebenfalls bei der Erstellung der Manuskripte half. Zusätzlich danke ich noch Prof. Dr. Thomas Braunbeck für seine Tätigkeit als Koordinator des Projektes sowie Betreuer und Gutachter meiner Arbeit.

Einen Herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter\*innen der *Physiologischen Ökologie der Tiere*, die mir während meiner ganzen Zeit in der Arbeitsgruppe tatkräftig bei Probennahmen und im Labor zur Seite standen: Dr. Andreas Dieterich, Christine Hepper, Dr. Stefanie Jacob, Stefanie Kraiss, Dr. Carla Lorenz, Elisabeth May, Dr. Katharina Peschke, Dr. Paul Thellman, Hannah Schmiege, Dr. Simon Schwarz, Dr. Mona Schweizer, Dr. Sabrina Wilhelm sowie Helene Eckstein, Kathrin Leinmüller, Lone Kundy, Shannon Ottmann, Lukas Reinelt und Sabine Stepinski.

Ein Großer Dank auch an alle Partner\*innen des Effect-Net Teams, die ich während meiner Zeit kennen lernen durfte. Besonderer Dank gilt den Arbeitsgruppen Huhn und Zwiener, die die chemischen Analysen meiner Proben vorgenommen haben, und mit denen die Zusammenarbeit sehr angenehm war. Vielen Dank auch die Doktorand\*innen des Projekts Sarah Knoll, Susanna Mieck, Siegfried Hohmann, Stefanie Jacob, Eike Rogall, Simon Schaub, Selina Tisler und Florian Zindler, mit denen einige interessante Projekt- und Doktorandentreffen zustande kamen.

Ein spezieller Dank gilt auch meinen Freunden, die ich während der Promotion dazu gewinnen konnte und mir diese durch viel Motivation und Hilfe erleichterten: Andreas Dieterich, Stefanie Jacob, Carla Lorenz, Paul Thellman, Hannah Schmiege, Simon Schwarz und Sabrina Wilhelm.

Weiterhin möchte ich noch meinen Freunden aus der Heimat, Tübingen und überall sonst danken: Die tollkühne Crew, Fummel WG, Poolparty, Schwenningen PP, Tübinger Spackos, Ultimativ WG und Whatschat.

Abschließend möchte ich noch meinen Eltern für die gesamten letzten 29 Jahre der Unterstützung und Hilfe danken. Und einen riesigen Dank auch an meine Freundin Stefanie Dietz, die mich in den Jahren meiner Promotion ertragen hat.

DANKE!

In Gedenken an  
Alois und Margarete Wohnhaas sowie  
Mathilde und Wilhelm Ziegler