



**Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg**

**Fakultät Life Science**

Bioverfügbarkeit und toxische Wirkung von ausgewählten Arzneimitteln unter limnischen,  
Brackwasser und marinen Bedingungen im Algentest

Bachelorarbeit

im Studiengang Umwelttechnik

vorgelegt von

**Wiebke Matthias**

**1959120**

Hamburg

am 31.08.2012

**Gutachterin:** Prof. Dr. Carolin Floeter (HAW Hamburg)

**Gutachterin:** Prof. Dr. Gesine Witt (HAW Hamburg)

## Zusammenfassung

Durch den hohen Verbrauch an Human- und Veterinärpharmazeutika werden jährlich große Mengen an Arzneimittel verkauft. Durch die bestimmungsgemäße Anwendung können die Muttersubstanzen oder deren Metabolite über den Transport über Flüsse oder durch Erosionen im Küstenbereich in die marine Umwelt gelangen.

Arzneimittel sind biologisch hoch aktive Substanzen und können in Wechselwirkung mit aquatischen Organismen treten. Zur Beurteilung des Umweltrisikos der Arzneimittel werden ökotoxikologische Effekte auf Organismen ermittelt. Sie sind u.a. abhängig vom aquatischen Milieu in dem sich die Arzneimittel befinden. Im marinen Bereich herrschen, besonders aufgrund der höheren Salinität, andere physikalisch-chemische Bedingungen als in der limnischen Umwelt. Diese wirken sich auf das Schicksal und die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln aus. Daher ist es wichtig, das ökotoxikologische Verhalten unter limnischen und marinen Bedingungen zu erfassen. Nur so können umfassende und konkrete Aussagen über das Risikopotential gemacht werden. Ökotoxizitätsdaten von Arzneimittel gegenüber marinen Organismen sind nur in begrenztem Umfang vorhanden und selten veröffentlicht. Zur Beurteilung werden dann Daten von Süßwasserorganismen herangezogen und die Sensitivität von marinen Organismen durch Extrapolation mithilfe von Sicherheitsfaktoren abgeschätzt. Untersuchungen von Floeter et al. (2006) haben jedoch für Substanzen mit einem unspezifischen Wirkmechanismus (unpolare und polare Narkotika) gezeigt, dass die marinen Algen signifikant sensitiver als die mithilfe des Extrapolationsfaktors berechnete *Predicted No Effect Concentration* (PNEC) für marine Algen ist. Es stellte sich deshalb die Frage, wie die Sensitivität der marinen Algen im Vergleich zu den Süßwasseralgeln für spezifische Substanzen, insbesondere für Arzneimittel ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Toxizität und Bioverfügbarkeit von den Arzneimitteln Diclofenac, Carbamazepin und Fluoxetin im Algentest unter limnischen, Brackwasser und marinen Bedingungen untersucht. Dafür wurde der marine Algentest zuerst für Mikrotiterplatten validiert.

Die marinen und Brackwassertestergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit experimentell ermittelt und mit limnischen Algentestdaten aus öffentlich zugänglichen Datenbanken verglichen. Die Auswertung ergab, dass der limnische Grünalgentest mit *Desmodesmus*

*subspicatus* sensitiver auf Diclofenac und Fluoxetin reagierte als die marine Diatomae *Phaeodactylum tricornutum*. Carbamazepin konnte nicht hinreichend untersucht werden, da es schwer in dem Verdünnungswasser mit einer Salinität von 31 PSU bzw. 20 PSU zu lösen war und die gelöste Konzentration keinen toxischen Effekt hervorgerufen hat. Aufgrund dieser Arbeit ist anzunehmen, dass sich Arzneimitteln in marinen Sedimenten anreichern können und entsprechend benthische Organismen hauptsächlich betroffen wären.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Verkaufsmengen Arzneimittel in Deutschland	9
1.1.1	Humanpharmaka	10
1.1.2	Veterinärpharmaka	10
1.2	Eintrittspfade der Arzneimittel in die aquatische Umwelt	11
1.2.1	Humanpharmaka	11
1.2.2	Veterinärpharmaka und Futtermittelzusatzstoffe	13
1.2.3	Transformationsprozesse	14
1.2.3.1	Metabolismus im Körper	14
1.2.3.1.1	Pharmakokinetik	15
1.2.3.2	Biologischer Abbau in Klärwerken und in der aquatischen Umwelt	17
1.2.3.3	Sorption	18
1.2.3.4	Photolyse	19
1.2.3.5	Hydrolyse	20
1.3	Vergleich der Bioverfügbarkeit von AM in limnischen und marinen Ökosystemen	20
1.3.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	20
1.3.1.1	Dissoziationskonstante $pK_a$	21
1.3.1.1.1	Abhängigkeit der Toxizität und Bioakkumulation vom pH-Wert	22
1.3.1.2	Wasserlöslichkeit	24
1.3.1.3	1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $K_{OW}$	24
1.3.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften des Meerwassers und Süßwassers	26
1.3.2.1	Lebensraum Nordsee	30
1.3.2.2	Lebensraum Ostsee	30
1.3.2.3	Zusammenfassung der Bioverfügbarkeit im marinen Ökosystem	31
1.3.3	Aufbau Zellwand Kieselalge und Grünalge	32
1.3.3.1	Diatomeen	33
1.3.3.1.1	Zellwandaufbau Diatomeen	33
1.3.3.1.2	Die Zellwand der Diatomae <i>Phaeodactylum tricorutum</i>	34
1.3.3.2	Grünalge	35
1.3.3.2.1	Die Zellwand der Grünalge <i>Desmodesmus subspicatus</i>	36
1.3.4	Biomembran	36
1.3.5	Biomembran-Toxizität	38
1.4	Auswahl AM	40

1.4.1	Übersicht Eigenschaften der ausgewähltem AM	44
1.4.2	Carbamazepin	46
1.4.2.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	46
1.4.2.2	Ökotoxizität	47
1.4.3	Diclofenac	47
1.4.3.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	48
1.4.3.2	Toxikokinetik	48
1.4.3.3	Ökotoxizität	49
1.4.4	Fluoxetin	49
1.4.4.1	Physikalisch-chemische Eigenschaften	49
1.4.4.2	Ökotoxizität	50
2.	Material und Methoden	51
2.1	Der limnische und der marine Algentest	51
2.1.1	Prinzip	51
2.1.1.1	Algenkultur	52
2.1.1.2	Methodik	52
2.1.1.3	Inkubation	53
2.1.1.4	Auswertung	53
2.1.1.5	Interpretation der Ergebnisse	55
2.1.1.5.1	Exponentielles Wachstum	55
2.1.1.5.2	Berechnung der prozentualen Hemmung	55
2.1.1.6	Ergebnisdarstellung	56
2.2	Versuchsaufbau mariner Algentest	57
2.2.1	Laborinterne Methodenvalidierung des marinen Algentests auf Mikrotiterplatte	57
2.2.1.1	Voruntersuchungen zur Filterkombination und Verstärkung	57
2.2.1.2	Methodenvalidierung mit der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol	58
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl zum Testbeginn	59
2.2.2	Methodenvalidierung laborübergreifend – Teilnahme an dem Ringtest des DIN AK 5.3	
	Marine Biotests	60
2.2.3	Versuchsdurchführung AM	61
3.	Ergebnisse	63
3.1	Ergebnisse der laborinternen Voruntersuchung zur Filterkombination und Verstärkung	63

3.1.1	Ergebnisse der laborinternen Validierung auf Mikrotiterplatte mit der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol	65
3.2	Ergebnisse der Methodenvalidierung laborübergreifend – Teilnahme an dem Ringtest des DIN AK 5.3 Marine Biotests	67
3.2.1	Zusammenfassung Validierung des marinen Algentests auf Mikrotiterplatte	69
3.3	Ergebnisse der Arzneimittelversuche	69
3.4	Referenztest 3,5-Dichlorphenol	69
3.4.1	Gültigkeitskriterien	69
3.4.2	Darstellung Wachstumskurve	70
3.4.3	Ergebnisse	71
3.5	Diclofenac	72
3.5.1	Gültigkeitskriterien	72
3.5.1.1	Darstellung der Wachstumskurven	72
3.5.2	Ergebnisse	73
3.6	Carbamazepin	74
3.6.1	Gültigkeitskriterien	74
3.6.1.1	Darstellung der Wachstumskurven	74
3.7	Fluoxetin	76
3.7.1	Gültigkeitskriterien	76
3.7.1.1	Darstellung Wachstumskurve	76
3.7.2	Ergebnisse	77
4.	Diskussion und Ausblick	79
4.1	Methodenbewertung Algentest	79
4.2	Bioverfügbarkeit und Toxizität im Vergleich Süßwasser/ Salzwasser	80
	Literaturverzeichnis	82
	Diagrammverzeichnis	87
	Formelverzeichnis	88
	Tabellenverzeichnis	89
	Abbildungsverzeichnis	90

## 1. Einleitung

In der Human- sowie in der Veterinärmedizin werden jährlich große Mengen an Arzneimitteln (AM) verkauft und angewendet. Allein für die Humanpharmaka lag die Verkaufsmenge 2009 bei 7.089.481 kg (UBA 2011). Durch die bestimmungsgemäße Anwendung bei Menschen und Tieren gelangen sie über das kommunale Abwasser oder über den Boden in die aquatische Umwelt. Untersuchungsprogramme von der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Chemikaliensicherheit (BLAC) und dem Umweltbundesamt (UBA) konnten in Oberflächengewässern, Fließgewässern und Küstengewässern Konzentrationen von AM im µg-Bereich nachweisen. AM sind biologisch hoch aktiv. Die Muttersubstanzen oder deren Metabolite können durch ihren Einsatz in marinen Aquakulturen, durch den Transport über Flüsse oder durch Erosion im Küstenbereich in die marine Umwelt gelangen. Bei einem von dem Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH) durchgeführten Monitoringprogramm wurde eine Konzentration von 0,8 ng/l Carbamazepin in der deutschen Bucht nachgewiesen. Des Weiteren konnten auch Konzentrationen von Diclofenac, Clofibrinsäure, Primidon und Oxazepam nachgewiesen werden.

Die Transformationsprozesse entlang des Eintrittspfades sind sehr komplex und kaum geklärt (Kümmerer 2008b). Zur Beurteilung des Umweltrisikos werden auch die ökotoxikologischen Wirkungen (Effekte) auf Organismen ermittelt. Sie sind u.a. abhängig vom aquatischen Milieu in dem es sich befindet. Im marinen Bereich herrschen, besonders aufgrund der höheren Salinität, andere physikalisch-chemische Bedingungen als in der limnischen Umwelt (Wheeler et al. 2001). Diese wirken sich auf das Schicksal und die Bioverfügbarkeit von AM aus. Daher ist es wichtig, das ökotoxikologische Verhalten unter limnischen und marinen Bedingungen zu erfassen. Nur so können umfassende und konkrete Aussagen über das Risikopotential gemacht werden.

Da es sich bei AM um sogenannte „neue Schadstoffe“ handelt, wurden für sie bisher kaum rechtlich verbindliche Grenzwerte für die Umweltkompartimente (Umweltqualitätsnormen) in Richtlinien und Verordnungen implementiert. Jedoch hat die Europäische Kommission am 31.01.2012 Vorschläge zur Erweiterung der Liste der Prioritären Stoffen der EU Wasserrahmenrichtlinie vorgelegt. Erstmals wurden auch Pharmazeutika mit aufgeführt (17α-Ethinylestradiol (EE2), 17β-Estradiol (E2) und Diclofenac) und für diese AM

Umweltqualitätsnormen vorgeschlagen. Diese Änderungen sollen als Teil einer Richtlinie zur Änderung der Wasserrahmenrichtlinie und der Richtlinie über Umweltqualitätsnormen dienen (EK 2012).

Ein weiterer Aspekt sind die Zulassungsverfahren von Tier- und Humanarzneimitteln (HAM und TAM). Neben der Prüfung auf Wirksamkeit, Qualität und Sicherheit für die menschliche Gesundheit wird auch eine Umweltrisikoprüfung durchgeführt.

Die Umweltrisikoprüfung erfolgt auf der Basis von Leitfäden der europäischen Arzneimittelagentur EMA. 1996 wurde der Leitfaden EMA/CVMP/055/96-Final zur Umweltbewertung von TAM verabschiedet und 2006 die "Guideline on the Environmental Risk Assessment of medicinal products for Human use" (EMA/CHMP/SWP/4447/00) (LANUV 2007).

Kernstück des Konzepts zur Bewertung des Umweltrisikos eines AMs im Rahmen des Zulassungsverfahrens ist ein umweltspezifischer Schwellenwert („Trigger“), der eine zunächst grob abschätzende Stoff- und Expositionsbeurteilung (Phase I) von einer vertieften Umweltbewertung (Phase II) trennt: Nur in den Fällen, in denen eine vorab rechnerisch vorhergesagte Umweltkonzentration (Predicted Environmental Concentration - PEC) eines zuzulassenden AMs den Triggerwert überschreitet, wird eine Risikobewertung auf der Basis weiterführender Studien zum Verbleib und zu den Auswirkungen auf die Umwelt durchgeführt (BLAC 2003).

Die weiterführenden Studien sind in der Phase II Tier A angegeben. Anhand von aquatischen und terrestrischen Effektstudien wird die Konzentration abgeschätzt, bei der keine signifikanten Effekte bei aquatischen und terrestrischen Organismen zu erwarten sind (Predicted No Effect Concentration, PNEC). Bei den aquatischen Effektstudien kommt unter anderem der Algentest (OECD 201) zur Anwendung (EMA 2006).

Diese Untersuchungen beschränken sich aber häufig auf den limnischen Bereich, da es nur wenige nach DIN EN ISO oder OECD standardisierte Testverfahren für marine Spezies gibt und der Fokus in der Umweltrisikobewertung häufig auf den limnischen Bereich gelegt wird. Lediglich bei der Umweltrisikobewertung von TAM für die Anwendung in marinen Aquakulturen werden marine Biotestverfahren rechtlich gefordert. Ökotoxizitätsdaten von AM gegenüber marinen Organismen sind deshalb nur in begrenztem Umfang vor-

handen und selten veröffentlicht. Zur Beurteilung werden dann Daten von Süßwasserorganismen herangezogen und die Sensitivität von marinen Organismen durch Extrapolation mithilfe von Sicherheitsfaktoren abgeschätzt (Leung et al. 2001, Floeter 2006).

Untersuchungen von Floeter et al. (2006) haben jedoch bereits für Substanzen mit einem unspezifischen Wirkmechanismus (unpolare und polare Narkotika) gezeigt, dass die marinen Algen signifikant sensitiver als der mithilfe des Extrapolationsfaktors vorhergesagte PNEC für marine Algen ist. Es stellt sich deshalb die Frage, wie die Sensitivität der marinen Algen im Vergleich zu den Süßwasseralgen für spezifische Substanzen, insbesondere für AM ist.

Ziel dieser Arbeit ist die Ökotoxizität von drei verschiedenen AM im limnischen Grünalgentest nach DIN EN ISO 8692 (2004) sowie unter Brackwasser und marinen Bedingungen im marinen Algentest nach DIN EN ISO 10256 (2006) zu untersuchen, um Aussagen über die Bioverfügbarkeit und Toxizität von AM für limnische und marine Organismen treffen zu können.

Im Folgenden wird der Eintrittspfad der HAM und TAM erläutert. Des Weiteren wird auf die Bioverfügbarkeit und Transformationsprozesse von AM im marinen und limnischen Ökosystem eingegangen, indem die physikalisch-chemischen Eigenschaften von AM und des limnischen und marinen Ökosystems erläutert und verglichen werden. Dies soll die Differenz der Ökosysteme und die daraus resultierenden unterschiedlichen Bioverfügbarkeiten erklären. Es folgt eine Validierung des marinen Algentests auf Mikrotiterplatten. Anschließend werden Diclofenac, Carbamazepin und Fluoxetin unter limnischen, Brackwasser und marinen Bedingungen im Algentest gefahren und die Hemmwirkung unter den unterschiedlichen Bedingungen verglichen.

### **1.1 Verkaufsmengen Arzneimittel in Deutschland**

Anhand der Verkaufsmengen von AM in Deutschland wird deutlich, wie viele Kilogramm AM kontinuierlich in die Umwelt gelangen. Im Auftrag des UBA hat das IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser Beratungs- und Entwicklungsgesellschaft (IWW) eine Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von AM durchgeführt. In diesem Bericht wurden Verkaufsdaten von Humanpharmaka mit einem jährlichen Verkauf von > 5 t in den Jahren 2002 und 2006 bis 2009 veröffentlicht, die von der Firma

Intercontinental Marketing Services Health AG (IMS Health AG) erhoben wurden (UBA 2011).

Aus diesen Werten kann auf die am häufigsten verkauften Wirkstoffgruppen und die Veränderung der Verkaufsmengen geschlossen werden.

### 1.1.1 Humanpharmaka

Insgesamt wurden demnach in Deutschland im Jahr 2009 7.089.481 kg der eingesetzten 133 Arzneiwirkstoffe verkauft, dagegen betrug im Jahr 2002 die Menge noch 5.532.695 kg. Das ergibt eine Umsatzsteigerung von etwa 22%.

Die meistverkauften Wirkstoffgruppen sind nach den Erhebungen die Analgetika (2.646.851 kg), Antidiabetika (1.309.534 kg), Antibiotika (571.000 kg), Röntgenkontrastmittel (364.677 kg) und Antiepileptika (247.361 kg) (UBA 2011).

Tabelle 1 Ausschnitt Verkaufsmengen Humanpharmaka (UBA 2011)

Wirkstoffgruppe	Verbrauchsmenge [kg]				
	2002	2006	2007	2008	2009
Analgetika	2.101.787	2.393.087	2.557.436	2.635.613	2.646.851
Antidiabetika	595.269	972.259	1.078.049	1.205.376	1.309.534
Antibiotika	438.397	499.096	523.004	536.071	571.000
Röntgenkontrastmittel	335.202	376.925	364.072	359.098	364.677
Antiepileptika	173.011	207.097	220.433	235.556	247.361
Antihypertensiva	144.276	177.621	183.111	201.528	218.301
Betablocker	210.009	214.062	212.365	211.705	204.088
Urikostatika	141.839	155.796	157.946	160.995	157.842
Antikonvulsiva	32.812	72.078	83.273	94.872	102.719

### 1.1.2 Veterinärpharmaka

In dem Fachbericht „Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt Literaturstudie“ vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (2007) wurden Daten zu den Verbrauchsmengen von TAM erhoben. Bundesweite Erhebungen zu den abgesetzten Mengen von TAM standen nicht zur Verfügung. Eine Abschätzung von in den Handel gebrachten Mengen an Einzelwirkstoffen von TAM erfolgte auf der Basis verschiedener, nur im regionalen Maßstab durchgeführter Untersuchungen (Winckler und Grafe (2001); Linke und Kratz (2001); Klein-Goedicke (2005)). In Tabelle 2 sind die TAM entsprechend ihrer Verkaufsmenge zusammengefasst. Aus der Tabelle ergibt sich, dass die Tetracycline mit Abstand die am meist verbrauchten Antibio-

tika in der Veterinärmedizin sind. Als zweitwichtigster Stoff ist das Sulfonamid zu nennen (UBA 2011). Durch den hohen Einsatz von Antibiotika als Futtermittelzusatz bei der Tierhaltung sind Antibiotikaresistenzen entstanden. Als Gegenmaßnahme wurde am 01.01.2006 die EU-weite Verordnung erlassen, die besagt, dass Antibiotika in Futtermitteln künftig nur noch zu veterinärmedizinischen Zwecken zugesetzt werden dürfen (Richtlinie 70/524/EWG).

Tabelle 2 Ausschnitt Verkaufsmengen Veterinärpharmaka (UBA 2011)

	Winckler & Grafe (2000) 6 Landkreise in Niedersachsen [kg/Jahr 1997]	Linke & Kratz (2001) 14 Landkreise in Brandenburg [kg/Jahr 1998/99]
<b>Antibiotika</b>		
<i>Tetracycline</i>	39.832	4.600
Tetracyclin	14.072	1.196
Chlortetracyclin	24.130	3.347
Oxytetracyclin	1.630	46
<i>Sulfonamide/Trimethoprim</i>	13.166	900
Sulfadiazin	6.218	412
Sulfadimidin	5.863	277
Trimezhoprim	1.264	82

## 1.2 Eintrittspfade der Arzneimittel in die aquatische Umwelt

HAM und TAM gelangen über verschiedene Eintrittswege in die Umwelt. Die Eintrittswege von HAM und TAM werden getrennt aufgeführt, da aus der unterschiedlichen Anwendung eine unterschiedliche Betroffenheit der Umweltkompartimente resultiert.

### 1.2.1 Humanpharmaka

Industrielle Punktquellen sind bei dem Eintrag von AM in die Umwelt nur von untergeordneter Bedeutung. Aufgrund der rechtlichen Regelungen zur guten Herstellungspraxis, deutlichen Verbesserungen in der Abwasserreinigung und des hohen Wertes einzelner Wirkstoffe, bei denen auch der Verlust von geringen Mengen kostspielig ist, sind die Emissionen von AM während der Produktion sehr gering. Nur im Fall von Unfällen kann es zu einer Freisetzung größerer Mengen von Arzneimittelwirkstoffen oder deren Zwischenprodukten kommen (SRU 2007).

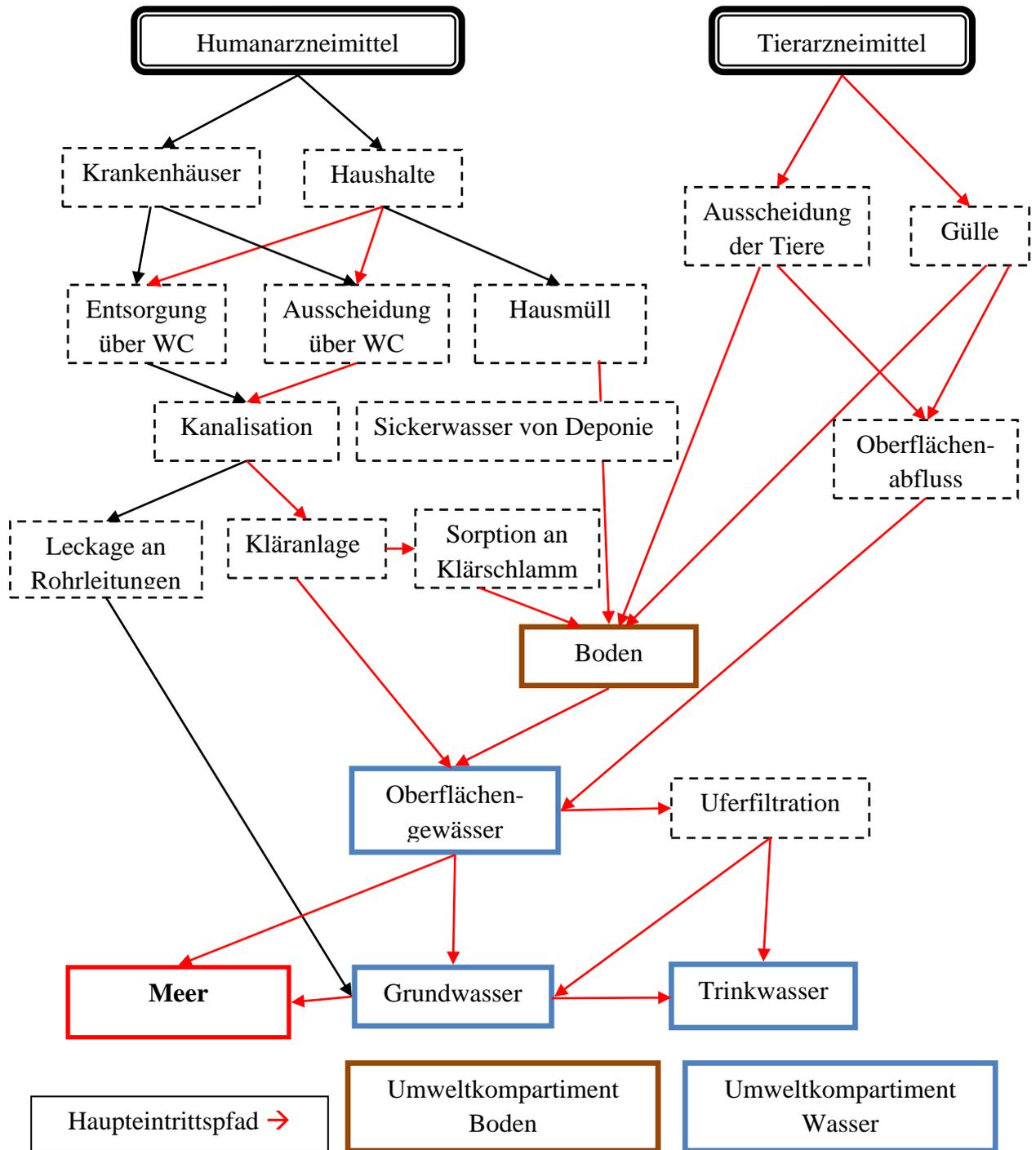


Abbildung 1 Eintrittspfade von Human- und Veterinärpharmaka in die Umwelt, (modifiziert SRU 2007)

HAM können über Haushalts- oder Krankenhausabwasser in die Kanalisation gelangen (siehe Abbildung 1). Hier können zwei Fälle unterschieden werden. Der erste Fall ist die Ausscheidung von AM durch die therapeutische Anwendung. Sie gelangen entweder unverändert oder als Metaboliten über Urin oder Faeces in das kommunale Abwasser. Der

andere Fall ist die unsachgemäße Entsorgung über die Toilette oder das Spülbecken. In diesem Fall gelangt das Medikament, ohne vorher gegangene Metabolisierung in die aquatische Umwelt (UBA 20011).

Über die Kanalisation gelangt das Abwasser in die Kläranlagen. Ein geringer Anteil kann aber über Leckagen an den Abflussrohren direkt ins Grundwasser gelangen. In den Kläranlagen wird ein Teil der Substanzen eliminiert und/oder am Klärschlamm absorbiert. Die hier stattfindenden Prozesse sind der biologische Abbau durch Bakterien und die Sorption am Klärschlamm. Nicht eliminierte Stoffe gelangen über den Vorfluter ins Oberflächengewässer. Wenn auch dort kein weiterer biologischer Abbau stattfindet, können sie weiter über das Uferfiltrat ins Grundwasser und sogar Trinkwasser gelangen. Ein weiteres Problem stellt der Klärschlamm dar. Klärschlamm wird teilweise auf Agrarflächen verteilt und die am Klärschlamm absorbierten AM gelangen so in den Boden und weiter ins Grundwasser und durch Oberflächenabflüsse ins Oberflächengewässer (LANUV 2007).

AM, die im Oberflächengewässer und im Grundwasser angelangen, sind meist aufgrund ihrer persistenten Eigenschaften nicht weiter metabolisierbar. Sie können somit über Flüsse in die marine Umwelt gelangen und sich dort anreichern (ARGE 2003).

### **1.2.2 Veterinärpharmaka und Futtermittelzusatzstoffe**

Die TAM gelangen aufgrund ihrer Anwendung zuerst in das Kompartiment Boden. Laut BLAC wird der größte Teil der TAM in Form von Antibiotika in der Tiermast verwendet. Seit dem 1. Januar 2006 gilt ein EU-weites Verbot zur Verwendung von Antibiotika als Wachstumsförderer in Futtermitteln (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003). Die belasteten Ausscheidungsprodukte der Tiere werden als Dünger verwendet und auf die Felder aufgetragen. Während der Lagerung oder Behandlung der Wirtschaftsdünger können Wirkstoffe abgebaut oder an organischer Substanz sorbiert werden (UBA 2011).

Ein weiterer Eintrag erfolgt über die Weidehaltung. Hier erfolgt die Ausscheidung direkt auf den Boden. Die Arzneimittelstoffe werden vom Boden absorbiert oder abgebaut und die nicht abgebauten Anteile und Metabolite können anschließend über Erosion in die Oberflächengewässer verfrachtet werden oder sie passieren die Böden und gelangen ins Grundwasser (SRU2007).

### 1.2.3 Transformationsprozesse

Entlang ihres Eintrittspfades durchlaufen die AM unterschiedliche Transformationsprozesse und ändern ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften.

Durch die Vielzahl der Transformationsprozesse und die daraus immer neu entstehenden Metaboliten ist es kaum möglich auf die Umweltrelevanz der einzelnen AM und ihre Metaboliten zu schließen (Kümmerer 2009). Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 2 dargestellt.

Es wird zwischen biotische (enzymatische) und abiotische Transformationsprozesse unterschieden. Das Ausmaß der Transformationsprozesse ist abhängig von den Umweltbedingungen in der sich die Substanz befindet.

Der gewichtigste Transformationsprozess ist die Metabolisierung im menschlichen oder tierischen Körper, da AM für die Anwendung im oder am Körper entwickelt wurden.

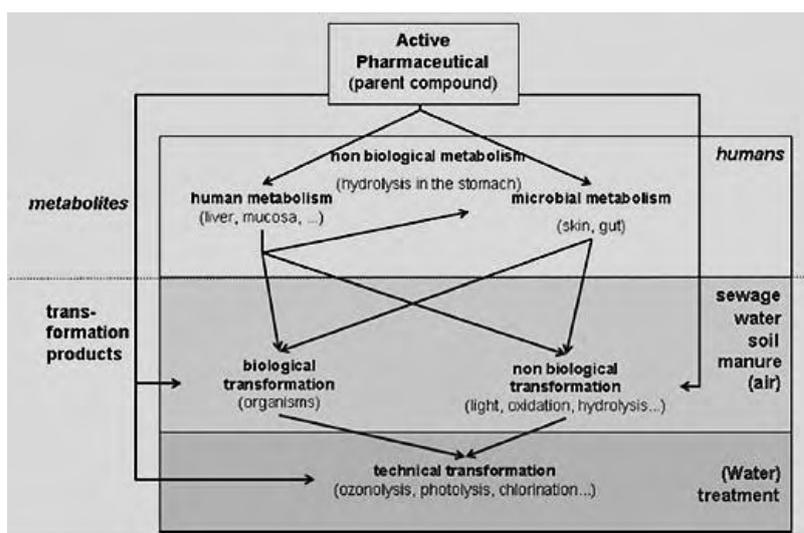


Abbildung 2 Metabolite und Transformationsprodukte, Kümmerer 2008b

#### 1.2.3.1 Metabolismus im Körper

AM werden für unterschiedliche therapeutische Zwecke oder zur Prophylaxe eingesetzt. Die Arzneimittelgruppe wird bestimmt durch die Art und den Ort der Wirkung eines AMs.

Es gibt AM mit einem breiten, unspezifischen Wirkmechanismus (z.B. Paracetamol) und welche die Interaktionen mit spezifischen Zielstrukturen in Zellen und Geweben aufweisen (SRU 2004).

### 1.2.3.1.1 Pharmakokinetik

#### Applikation

AM werden am häufigsten oral appliziert und gelangen so direkt in den Magen-Darm-Kanal. Weitere Applikationswege sind unter anderem nasal (durch die Nase), rektal (in den After), transdermal (auf die Haut) intravenös (in die Vene) oder inhalativ (über die Lunge) (Herdegen 2010).

#### Verteilung

Die spezifisch wirkenden AM werden so konzipiert, dass sie im Organismus mit den

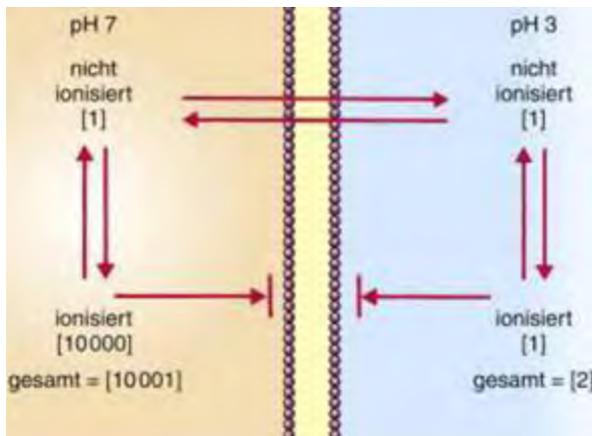


Abbildung 3 pH-abhängige Verteilung eines ionisierbaren Pharmakons ("Ionenfalle-Prinzip") (Lüllmann et al. 2010)

Zielrezeptoren in Wechselwirkung treten können, um einen therapeutischen Effekt auszuüben. Dafür müssen AM im Körper in hoher Konzentration vorliegen und resorbiert werden, das bedeutet, sie müssen in der Lage sein die Zellmembran zu passieren. Die Zellmembran besteht aus einer Lipiddoppelmembran und lässt bevorzugt sehr kleine Moleküle und lipophile Stoffe durch. Des Weiteren müssen AM bis zum Wirkungsort stabil bleiben

und benötigen deshalb eine Struktur, die so angeordnet ist, dass sie sich nur langsam metabolisieren lässt (BLAC 2003). Die meisten AM sind schwache Säuren oder Basen. Die Polarität behindert in der Regel Diffusion und Transport durch biologische Membranen. Doch durch den Mechanismus der Ionenfalle (*ion trapping*) können auch polare AM die Biomembran passieren (Abbildung 3). Im Magen herrscht ein saures Milieu (pH 3) und schwache Säuren mit einem  $pK_a$  von 5 liegen zum Teil ionisiert vor. Ein kleiner Teil kann die Magenschleimhaut passieren. Im Plasma wiederum herrscht ein neutrales Milieu und dort liegt das Gleichgewicht auf der nicht-ionisierten Seite. Die Substanz kann vom Plasma in den Magen in der nicht-ionisierten Form wieder zurückdiffundieren und sammelt sich so im Magen an. Sie gelangen in den Dünndarm, wo ein pH-Wert von 8 vorliegt und können dort resorbiert werden.

AM, die im Dünndarm resorbiert werden gelangen über die Pfortader direkt in die Leber und werden dort metabolisiert. Dieser Vorgang wird als First-Pass-Effekt bezeichnet. Nach der ersten Leberpassage gelangen die AM dann in den systematischen Kreislauf und werden im hepatischen Kreislauf weiter metabolisiert und eliminiert (Herdegen 2010).

### **Metabolismus/Elimination**

Körperfremde Stoffe werden vom Körper entweder renal (mit Urin), intestinal (mit Faeces) oder pulmonal (über die Lunge) ausgeschieden.

Diese Elimination erfolgt durch:

- Primäre Elimination der unveränderten Wirkstoffe und/oder
- Sekundäre Elimination der Biotransformationsprodukte (Metaboliten)

(Müller et al. 1987)

Hydrophile AM werden direkt renal eliminiert. Lipophile AM sind über die Niere und den Darm nur schwer ausscheidbar, da sie immer wieder rückresorbiert werden. Bei der Biotransformation finden im Körper enzymatische Reaktionen statt, bei denen lipophile AM in hydrophile Verbindungen umgewandelt werden.

Die Elimination durch den hepatischen Metabolismus erfolgt in zwei Phasen (siehe Abbildung 4).

Phase I:

Sie umfasst vor allem enzymatische Oxidationen durch die Cytochrom P-450 – Isoenzyme, aber auch Reduktionen und Hydrolysen. Hierbei werden funktionelle Gruppen wie -OH, -SH, -NH<sub>2</sub> und -COOH eingeführt bzw. freigesetzt.

Phase II:

Die in Phase I entstandenen Metabolite werden in den Phase II-Reaktionen in noch hydrophilere Verbindungen umgewandelt. Durch Konjugationsreaktionen werden organische Reste an die Metabolite gekoppelt (Fent 2003).

Die Biotransformationsprodukte sind vielfach weniger toxisch, bzw. biologisch aktiv als die Muttersubstanzen. Es gibt aber auch Umwandlungen, die zu einer höheren Toxizität

führen. In diesem Fall wird von der biologischen Aktivierung gesprochen (Müller et al. 1987).

Die nach der Phase II ausreichend hydrophilen Stoffe werden nicht mehr rückresorbiert und können aus dem Organismus ausgeschieden werden. Die Ausscheidungsrate der Muttersubstanz ist substanzspezifisch (Herdegen 2010).

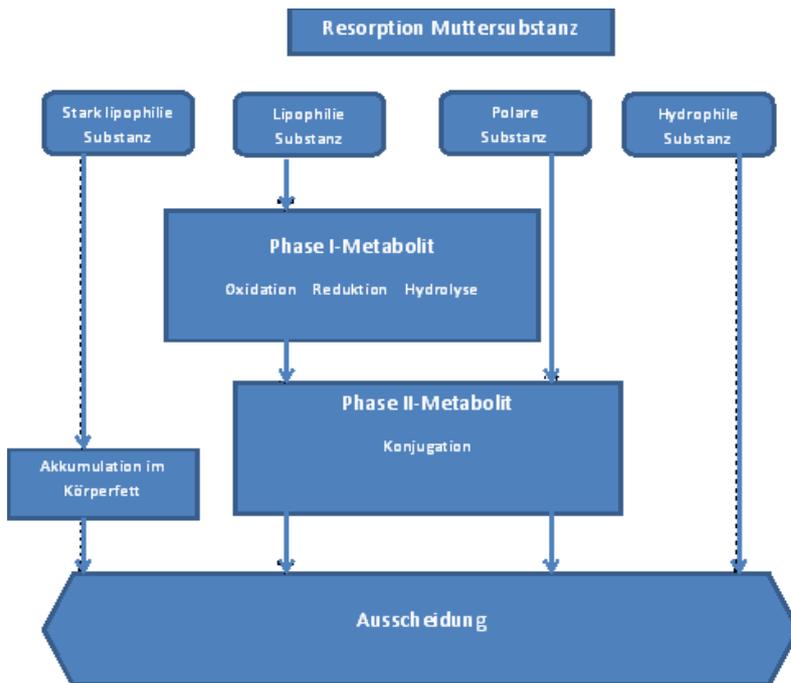


Abbildung 4 Stoffwechselwege von AM im Körper (nach Herdegen 2010)

### 1.2.3.2 Biologischer Abbau in Klärwerken und in der aquatischen Umwelt

Bakterien und Pilze sind die Organismen, die organische Substanzen am besten abbauen können. Die biologische Abbaubarkeit in den Kläranlagen, im Oberflächen- und Grundwasser, sowie im marinen Bereich obliegt primär den Bakterien (Kümmerer 2009), wobei die Bakteriendichte von der Kläranlage bis zum Meer immer weiter abnimmt. Folglich nimmt auch die biologische Abbaubarkeit ab. Der biologische Abbau ist demnach abhängig von der Temperatur, Salinität, organischer Nährstoffangebot und Struktur des Stoffes (Floeter 2006). In Flussmündungen und Küstenbereichen verhält sich das Wasser turbulenter als im offenen Meer. Das kann zu einer höheren Eutrophierung führen, da Nährstoffe in die Wassersäule aufgewirbelt werden und eine stärkere Interaktion zwischen Partikeln und Wasser hervorgerufen wird. Dadurch kann wiederum die biologische Abbaubarkeit positiv beeinflussen (ECETOC 2001). Auch die Abbaugeschwindigkeit und die Sinkgeschwindigkeit

keit geben Auskunft über die biologische Abbaubarkeit. Mit zunehmender Sinkzeit bzw. Seetiefe werden Stoffe immer Abbauresistenter und das C/N-Verhältnis nimmt zu (Schwoerbel 2010). Demzufolge ist anzunehmen, dass die Abnahme der Abbaugeschwindigkeit von organischen Schadstoffen im Meerwasser zu einer verstärkten Anreicherung in den marinen Sedimenten führt (Floeter 2006).

Bakterien haben eine hohe Affinität für gelöste Stoffe (Schwoerbel 2010), deshalb ist der biologische Abbau ein wichtiger Transformationsprozess für gelöste AM in der Abwasserbehandlung (Fent 2006). Der biologische Abbau kann an organischen AM durch Enzyme und Bakterien erfolgen. Bei einem vollständigen Abbau wird von Mineralisation zu Wasser, Kohlendioxid und anorganischen Salzen gesprochen. Häufig findet der Abbau aber nicht vollständig statt und es entstehen unbekannte Transformationsprodukte, die wiederum ein Gefahrpotential für die Umwelt beherbergen können (Kümmerer 2007). Diese neuen Abbauprodukte können stabiler und toxischer als die Muttersubstanz sein (Kümmerer 2009).

Besonders wichtig ist die Prüfung der biologischen Abbaubarkeit von Stoffen dessen Wirkung gezielt Bakterien töten, zum Beispiel Antibiotika und Desinfektionsmitteln. Sie wirken gegen Mikroorganismen und verhindern dadurch den biologischen Abbau (Kümmerer 2009). So haben Untersuchungen von Kümmerer eine schlechte biologische Abbaubarkeit für Antibiotika in Laborversuchen gezeigt (Kümmerer 2008b).

### **1.2.3.3 Sorption**

Eine andere Möglichkeit der Eliminierung stellt die Sorption an Klärschlamm, Sedimente und (biologische) Kolloide dar. Vor allem lipophile Verbindungen und polare Stoffe, wie z.B. Schwermetalle tendieren zur Sorption an Feststoffen. Durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkung wird die Substanz an der Oberfläche der Partikel adsorbiert und dadurch immobilisiert (Fent 2003).

Mit Hilfe des  $\log K_{OW}$ -Wertes kann auf eine eventuelle Lipophilität des Stoffes und somit auf die Sorptionsfähigkeit hydrophober Verbindungen an Klärschlamm, Sedimente und Kolloide geschlossen werden.

Der Gehalt an mineralischen Stoffen im Sediment und Klärschlamm ist gering. Im Vergleich ist die Lipidkonzentration im Klärschlamm höher als im Sediment (Kümmerer 2008b).

Saure AM, wie zum Beispiel Diclofenac, mit einem  $pK_a$ -Wert von  $\sim 4,2$  (Mersmann 2003) sind im neutralen pH-Bereich ionisiert und adsorbieren eher schlecht an Partikel. Sie sind überwiegend in der wässrigen Phase zu finden. Mit sinkendem pH-Wert steigt die Adsorption. Gegensätzlich dazu verhalten sich leicht basische AM. Sie adsorbieren im neutralen Bereich im maßgeblichen Umfang an Partikel. Folglich kann es zu einer Anreicherung von basischen AM in Sedimenten führen. Im marinen Bereich ist der pH-Wert, im Vergleich zum limnischen Ökosystem, leicht basisch, was zu einer signifikanteren Sorption an Feststoffen und somit stärkeren Anreicherung im Sediment führt.

Am Klärschlamm adsorbierte AM werden nicht oder nur teilweise abgebaut und sind biologisch noch aktiv. Bei Austragung von Klärschlamm auf Feldern, können sie durch Auswaschung ins Grund- oder Oberflächengewässer gelangen (Fent 2006).

### **1.2.3.4 Photolyse**

Für lichtempfindliche AM ist die Photolyse, d.h. die Spaltung von Molekülen durch Licht, ein entscheidender Eliminations- bzw. Transformationsprozess. Es gilt, je kürzer die Wellenlänge, desto energiereicher das Licht und desto stärker die photolytische Zersetzung. Entsprechend findet in aquatischen Ökosystemen die Photolyse hauptsächlich in klaren Oberflächengewässern statt (Fent 2006).

Innerhalb eines Gewässers führen unterschiedliche Prozesse zu einer vertikalen Lichtattenuation (Lichtabschwächung). Sonnenstrahlen werden an der Wasseroberfläche absorbiert und reflektiert, so dass nur ein Teil des Lichts in das Wasser eindringt. Innerhalb des Wasserkörpers kommt es zu einer Absorption durch das Wasser und seine gelösten und partikulären Inhaltsstoffe (Sommer 2005). Je nach der optischen Transparenz ist die Strahlungsschwächung bei verschiedenen Wellenlängen verschieden stark. Im trüben und zum Teil turbulenten Wasser von Flussmündungen und im Wattenmeer ist es bereits einen Meter unter der Wasseroberfläche dunkel. In Küstengewässer, welche durch Humusstoffe (organische Substanzen, „Gelbstoffe“) gefärbt sind, dringt das energiearme gelbe Licht (560-580 nm) am Tiefsten ein. In Küstengewässer der Nord- und westlichen Ostsee liegt die

Untergrenze der euphotischen Zone (Wasserschicht mit positiver Photosynthese) bei 10 bis 20 m Wassertiefe (Gerlach 1994) und in den klarsten Meeresgebieten bis zu 200 m (Sommer 2005). Der Abbau von AM ist somit in Küstengewässer, Flussmündungen und im Wattenmeer aufgrund der Lichtabschwächung durch aufgewirbelte organische Stoffe am niedrigsten.

### **1.2.3.5 Hydrolyse**

Bei der Hydrolyse reagieren Substanzen mit Wasser oder Hydroxyl-Ionen und es bilden sich z.B. aus C,C- bzw. C,Cl-Einfachbindungen C-OH-Bindungen oder es kommt zur Spaltung einer C-O-Doppelbindung. Bei der Hydrolyse organischer Verbindungen entstehen im Allgemeinen weniger toxische Produkte (Fent 2003). Die Hydrolyse ist stark von der Temperatur und dem pH-Wert abhängig (Kümmerer 2007). Im marinen Bereich herrschen niedrigere Temperaturen, was zu einer Herabsenkung der Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse führen kann.

## **1.3 Vergleich der Bioverfügbarkeit von AM in limnischen und marinen Ökosystemen**

AM gelangen entlang ihres Eintrittspfades meistens vom limnischen Bereich über Brackwasserbedingungen in die marine Umwelt. Für die Verteilung der AM in der Umwelt und ihrer Bioverfügbarkeit für Organismen sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der AM und die Umweltbedingungen maßgeblich (Roberts et al. 2002). Im Folgenden werden als erstes die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanzen beschrieben, die einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit auf Organismen im Allgemeinen haben. Im Anschluss werden die physikalisch-chemischen Unterschiede zwischen limnischen und marinen Ökosystemen und ihre Auswirkung auf die Bioverfügbarkeit von AM dargestellt.

### **1.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften**

Wie sich die Arzneimittelwirkstoffe in der Umwelt verhalten, hängt von ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften ab. Hierbei sind am Wichtigsten die Persistenz, ihre Wasserlöslichkeit und ihre Adsorbierbarkeit (ARGE 2003).

AM sind große, chemisch komplexe Moleküle. Sie bilden keine homogene Verbindungsgruppe, da sie sich in Größe, Struktur und funktionellen Gruppen unterscheiden. Aktive AM und ihre Salze sind meistens Feststoffe, die dazu tendieren Polymorphe<sup>1</sup> zu bilden. Polymorphe können sich in ihrer Bioverfügbarkeit, Löslichkeit, Stabilität etc. unterscheiden, was die Durchführung von Versuchen erschweren und die Ergebnisse verfälschen kann (Cunningham 2004).

Durch ihre Größe und Komplexität kann aber allgemein gesagt werden, dass AM polare, ionisierbare Moleküle bilden und ihre Eigenschaften abhängig vom pH- Wert sind. Die meisten AM sind schwache Säuren oder Basen.

Die Konstanten, welche die Verteilung und das Verhalten in der Umwelt beschreiben sind die Dissoziationskonstante  $pK_a$  und der Verteilungskoeffizient  $K_{ow}$ .

### 1.3.1.1 Dissoziationskonstante $pK_a$

Die Gleichgewichtskonstante  $K_a$  von sauren AM wird über das Massenwirkungsgesetz abgeleitet.

Es gilt:  $HA + H_2O \leftrightarrow A^- + H_3O^+$

$$K_a = \frac{c(A^-) \times c(H_3O^+)}{c(HA)}$$

Formel 1 Gleichgewichtskonstante

$K_a$  = Säurekonstante,  $c(A^-)$  = Konzentration der Anionen,  $c(H_3O^+)$  = Konzentration Hydroxonium-Ionen,  $c(HA)$  = Konzentration der Säure

Wenn  $K_a = c(H_3O^+)$ , dann ist die Hälfte der Verbindung dissoziiert und der resultierende  $pK_a$  -Wert (negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichtskonstante) ist die Dissoziationskonstante der Verbindung. Analog gilt es für basische Verbindungen mit  $pK_b = 14 - pK_a$  (Küster & Thiel 2003).

---

<sup>1</sup> Polymorphie: Unterschiedliche Anordnung der Moleküle in der festen Phase.

<sup>2</sup> Verbindungen, die sowohl ionisiert als auch neutral vorkommen können (Mortimer 2006)

<sup>3</sup> Steht für getrocknetes Kieselgel, mit ungeordnetem verknäueltem Netzwerk, bei dem noch einzelne OH-

Um den Grad der Ionisation bei speziellen pH-Werten zu ermitteln, wird die Henderson-Hasselbalch - Gleichung angewendet (Tramp 2004).

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$$

Formel 2 Henderson-Hasselbalch-Gleichung,

$\alpha$  = Dissoziationsgrad,  $\text{pK}_a$  = negative dekadischer Logarithmus der Säurekonstante

Wenn die Gleichung nach  $\alpha$  aufgelöst wird ergibt sich für saure Verbindungen:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}_a}}{1+10^{\text{pH}-\text{pK}_a}}$$

Formel 3 Dissoziationskonstante für saure Verbindungen

und für basische Verbindungen:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pK}_a-\text{pH}}}{1+10^{\text{pK}_a-\text{pH}}}$$

Formel 4 Dissoziationskonstante für basische Verbindungen

(Curry et al. 2011)

AM können aber mehr als eine ionisierbare funktionelle Gruppe enthalten. In diesem Fall muss jede Gleichgewichtskonstante getrennt voneinander betrachtet werden (Cunningham 2004).

Ein Stoff der gut wasserlöslich ist, wird im Gewässer hauptsächlich in gelöster Form transportiert und kann so über die Strömung bis in das marine Ökosystem gelangen. Hydrophobe Stoffe dagegen sorbieren eher an Sedimenten und Schwebstoffen und dadurch findet ein weitaus geringerer Stofftransport mit der Strömung statt.

#### 1.3.1.1.1 Abhängigkeit der Toxizität und Bioakkumulation vom pH-Wert

Die Bioakkumulation von Elektrolyten<sup>2</sup> ist sensibel gegenüber pH-Wertänderungen. Säuren liegen bei pH-Werten unter deren  $\text{pK}_a$ -Wert in überwiegend neutraler Form vor. Bei

---

<sup>2</sup> Verbindungen, die sowohl ionisiert als auch neutral vorkommen können (Mortimer 2006)

Basen verhält es sich genau umgekehrt. Die ionisierte Fraktion der Elektrolyten ist polarer und kann schlechter die Biomembran passieren. Daraus kann auf eine höhere Toxizität und Bioakkumulation bei hohem pH-Wert für Basen und bei niedrigen pH-Wert für Säuren gefolgert werden (Rendal et al. 2011). Schwache Elektrolyte können trotzdem durch die Ionenfalle (siehe Kapitel 1.2.3.1.1) in die Zelle gelangen. Die ionisierte Form steht im Gleichgewicht mit der neutralen Form. Diese gelangt durch die Membran. Aufgrund des andern pH-Wertes im Inneren kann sich das Gleichgewicht auf der Seite der Ionen verlagern und die Ionen sind in der Zelle „gefangen“, da sie nicht wieder zurück diffundieren können (Trapp 2004).

Mithilfe der Protonenpumpe wird ein elektrochemisches Potential von 100-200 mV aufgebaut (siehe Abbildung 5). Die äußere Membran ist positiv, die innere Membran negativ geladen. Der pH-Wert innerhalb der Kompartimente ist unterschiedlich. Im Cytoplasma herrscht ein Milieu von pH ~ 7 – 7.5 und in der Vakuole etwas saurer mit einem pH-Wert von ~ 5.5. Durch die höhere H<sup>+</sup>-Konzentration in der Vakuole baut sich an der Membran wieder ein elektrisches Potential von 10 – 30 mV auf. Das Verhalten einer z.B. schwachen Base ist abhängig vom pH-Wert der Umgebung. Sie kann als neutrale Verbindung, Ionenverbindung oder Komplex auftreten. Den Anteil der neutralen Fraktion kann mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (siehe Formel 5) und dem pK<sub>a</sub>-Wert der Base berechnet werden:

$$f_n = \frac{1}{1 + 10^{i(pH-pK_a)}} \quad \text{und} \quad f_i = 1 - f_n$$

**Formel 5** Anteil neutraler Fraktion  $f_n$  berechnet über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung;  $i = 1$  für Säuren und  $i = -1$  für Basen

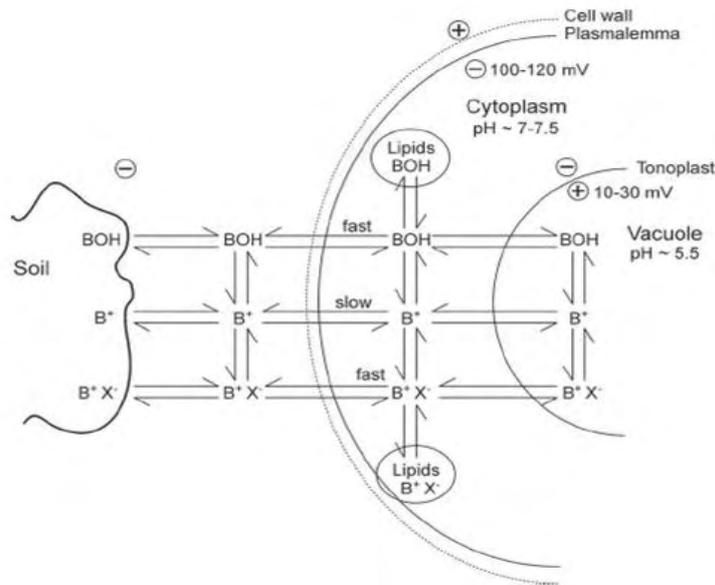


Abbildung 5 Kompartimente, Molekülspezies, pH und Ladung in und um Pflanzenzellen am Beispiel schwache Base (BOH). (Trapp 2004)

### 1.3.1.2 Wasserlöslichkeit

Die Löslichkeit eines Stoffes entspricht der maximalen Stoffmenge, die sich bei gegebener Temperatur unter Bildung eines stabilen Systems in einer bestimmten Menge eines Lösungsmittels lösen lässt. Unpolare und polare Substanzen bilden im Allgemeinen keine Lösungen miteinander (Mortimer 2006). Das bedeutet, unpolare AM besitzen eine geringe Löslichkeit und würden an Partikel oder Kolloide adsorbieren und sedimentieren. Polare AM dagegen sind in Wasser löslich. Die Höhe der Löslichkeit ist abhängig von den polaren funktionellen Gruppen der Substanz und deren Vermögen Wasserstoffbrückenbindungen mit den Wassermolekülen zu bilden (Mortimer 2006).

### 1.3.1.3 1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $K_{OW}$

Der 1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten  $K_{OW}$  wird auch zur Charakterisierung von Arzneimitteln verwendet. Er beschreibt die Lipophilie eines Stoffes und somit seine Neigung zur Sorption an Lipide, Partikel, Sediment oder (biologische) Kolloide (Cunningham 2004). Substanzen mit einem hohem  $K_{OW}$  sorbieren an Kolloiden (Länge von 1 nm – 10.000 nm) und Partikel in der aquatischen Phase. Durch Adsorption an Feststoffen kann die Mobilität in der aquatischen Phase gesteigert werden. Zu den Kolloiden gehören anorganische Stoffe, wie z.B. Silikate und Karbonate und organische Stoffe wie z.B. Ruß oder Huminstoffe. Algen, Viren und Bakterien in dieser Größenordnung werden als Bio-

Kolloide bezeichnet (Hofmann et al. 2003). Kolloide und Partikel befinden sich im limnischen und im marinen Bereich, sodass die Adsorption in beiden Bereichen als bedeutend betrachtet werden kann. Wie die Wasserlöslichkeit wird auch der  $K_{OW}$  durch Elektrolyten beeinflusst. Die Absenkung der Löslichkeit von unpolaren Verbindungen im Meerwasser führt somit auch zu einer Steigerung des  $K_{OW}$  um den Faktor 2 (ECETOC 2001).

Für polare Verbindungen wird ein geringerer Anstieg des  $K_{OW}$  erwartet, da die Löslichkeit durch die polaren funktionellen Gruppen weniger abgesenkt wird. Ein wichtiger Aspekt der zu beachten ist, ist aber die Verschiebung des Gleichgewichts durch Ionenpaar-Bildung auf die Seite der nicht-ionisierten Verbindungen (ECETOC 2001).

In der Ökotoxikologie gilt er auch als ausschlaggebender Parameter für die Bioakkumulation in Organismen (Fent 2003).

$$K_{ow} = \frac{c_o}{c_w}$$

### Formel 6 1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten

$c_o$  = Konzentration der Substanz in der 1-Octanolphase

$c_w$  = Konzentration der Substanz in der Wasserphase

1-Octanol wird als Referenz verwendet, da er wegen der Hydroxy-Gruppe (OH-Gruppe) und der Länge der Kohlenstoffkette ähnliche Eigenschaften aufweist wie natürliche organische Stoffe. Der  $K_{OW}$  wird häufig als  $\log K_{OW}$  angegeben (Fent 2003). Die Adsorbierbarkeit kann in folgende Gruppen unterteilt werden:

$\log K_{OW} < 2,5$  geringes Adsorptionspotential (hydrophile Substanz)

$\log K_{OW} > 2,5$  und  $< 4,0$  mittleres Adsorptionspotential

$\log K_{OW} > 4,0$  hohes Adsorptionspotential (lipophile Substanz)

(ARGE 2003)

In einem Report der Environment Canada wird ein Modell vorgestellt, dass die Verhältnisse zwischen dem  $\log K_{OW}$ , dem Bioakkumulationsfaktor (BAF), dem Biokonzentrationsfaktor (BCF) und dem Biomagnifikationsfaktor (BMF) für nicht-metabolisierende Substanzen in niedrigen und hohen aquatischen Trophie-Ebenen darstellt.

Das Diagramm 1 zeigt diese Zusammenhänge. Die Grenzwerte BCF bzw. BAF = 5000 (log BCF bzw. BAF = 3,7) und BMF = 1 wurden eingezeichnet, da angenommen wird, dass ab diesen Grenzwerten wahrscheinlich die Biomagnifikation, d.h. die Anreicherung von Schadstoffen über die Nahrungskette, eintritt. Das Diagramm zeigt, dass ab einem hohen log  $K_{OW}$ -Wert von  $\sim 7$  der chemische Adsorptionswirkungsgrad abnimmt, da die Chemikalien stärker an der Nahrungsmatrix sorbieren und deshalb nicht mehr im Organismus absorbiert werden (Environment Canada 2006). Daraus folgt, dass für AM mit einem log  $K_{OW} > 7$ , obwohl sie stark lipophil sind, die Bioverfügbarkeit für aquatische Organismen abnimmt.

Darüber hinaus wird aus dem Diagramm deutlich, dass es bei niedrigen trophischen Ebenen, den hier im Vordergrund stehenden Algen, bereits bei log  $K_{OW}$ -Werten  $> 2$  zur Überschreitung des BMF Grenzwertes kommt. Der BAF bzw. BCF-Grenzwert für Algen an sich wird bei nicht-metabolisierenden Substanzen bei log  $K_{OW}$ -Werten von 5-9 überschritten.

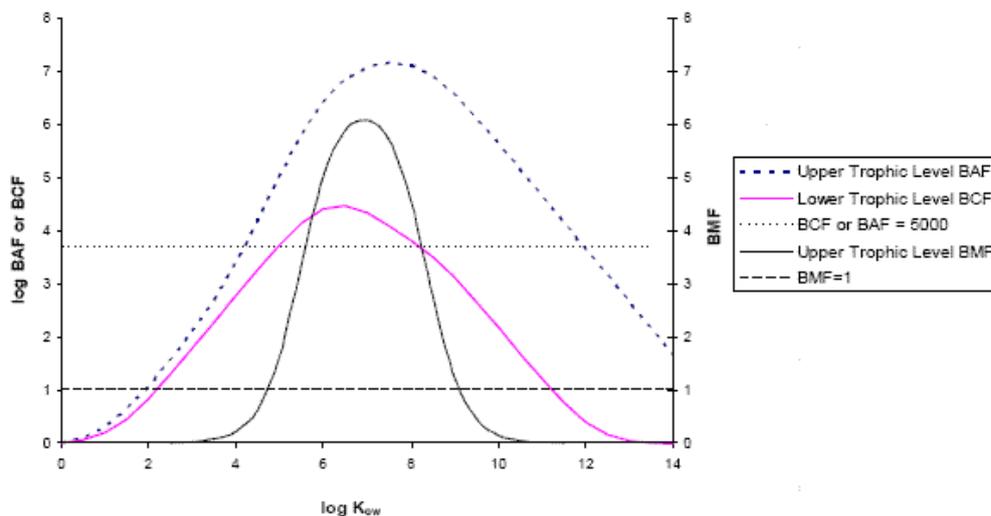


Diagramm 1 Das Verhältnis zwischen BAF, BCF und BMF für hohe und niedrige trophische Ebenen, vorhergesagt über das BAF-QSAR-Modell für hydrophobe, nicht-metabolisierte Substanzen, Environment Canada 2006

### 1.3.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften des Meerwassers und Süßwassers

Das Verhalten von AM ist abhängig von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Umgebungsmatrix. In Tabelle 3 sind die unterschiedlichen Eigenschaften von Meer- und Süßwasser dargestellt.

Tabelle 3 Vergleich der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Salz- und Süßwasser (nach Wheeler et al. 2001, Floeter 2006)

Parameter	Süßwasser	Meerwasser	Potentieller Einfluss auf die Speziation	Physiologischer Effekt des Parameters auf den Organismus
Salinität	< 0,5 PSU	~ 33 – 38 PSU <sup>a</sup>	Löslichkeit/Aussalzung; Auswirkung auf die Aktivität; Komplexierung von Anionen oder Kationen; Kolloid Stabilität	Hyper/hypo/iso-osmoseregulation
pH	5 - 8	8,1 - 8,5	Molekulare Ionisierung	Protonierung von Zelloberflächen; Transport von Kontaminanten durch Membran
Gelöstes organisches Material	0 - 10 mg C/l <sup>c</sup>	< 0,1 mg C /l	Sorption von Kontaminanten an Kolloiden; Komplexierung	
Härte <sup>b</sup>	10 - 300 mg/l CaCO <sub>3</sub>	413 mg/l	Komplexierung von Anionen und Kationen	Effekte auf die Kiemenpermeabilität (Ca <sup>2+</sup> )
Alkalinität		~2 x 10 <sup>-3</sup> equiv./l <sup>d</sup>	Komplexierung von Kationen	

<sup>a</sup> Bereich für Meereswasser (ohne hydrothermale Quellen). Die Salinität variiert von Brackwasser Standort (z.B. Ostsee < 15 PSU) zu landumschlossene Meere in ariden Gebieten (z.B. Rotes Meer ~ 43 - 45 PSU). Meerwasser hat grundsätzlich eine konstante Zusammensetzung von Ionen, mit Ausnahme der Flussmündungen.

<sup>b</sup> Änderungen der Toxizität werden manchmal fälschlicherweise auf unterschiedliche Härtegrade zurückgeführt obwohl sie auf pH-Änderungen basieren.

<sup>c</sup> an spezifischen Standorten/ verschmutzten Gewässer sind wahrscheinlich höhere Konzentrationen zu finden

<sup>d</sup> Die Alkanität von Wasser ist für Meerwasser komplexer, mit Beiträgen von anderen Ionen inklusive Borate.

<sup>e</sup> geschätzte mittlere Temperatur (Floeter 2006)

Die marine Umwelt kann nicht als ein homogenes Kompartiment angesehen werden. Der signifikanteste Unterschied zwischen dem Süßwasser und der marinen Umwelt ist der Salzgehalt. Der Salzgehalt des Meerwassers schwankt zwischen 32 PSU (Nördliches Eismeer) und 40 PSU (Rotes Meer). Küstengebiete und Flussmündungen, als Schnittstelle

zwischen Süßwasser und der marinen Umwelt haben eine Salinität von weniger als 28 PSU. Das Flusswasser vermischt sich aber in der Regel nicht gleichmäßig mit dem Meerwasser und in dem küstennahen Wassergürtel ist der Oberflächen-Salzgehalt geringer als weiter entfernt von der Küste (Sommer 2005). Im Vergleich hat das limnische Gewässer eine Salinität  $> 0,1$  (Gerlach 1994). Brackwasserbedingungen liegen in Flussmündungsgebieten oder z.B. in der Ostsee, dem weltweit größtem Brackwassergebiet, vor. Die Salinität der Ostsee liegt zwischen 0 - 20 PSU (Floeter 2006). Ein weiterer Aspekt ist die Nährstoffverteilung. Es gibt nährstoffarme Hochseeregionen mit einer Wassertiefe von mehr als 1000 m und die Schelfgebiete mit Tiefen bis 200 m (Gerlach 1994). Die C-14-Primärproduktion beträgt in der nährstoffarmen Hochsee der warmen Meere etwa  $60 \text{ g/m}^2$ , in der kaltgemäßigten Hochsee ungefähr  $100 \text{ g/m}^2$  pro Jahr. Dagegen liegt sie in den Schelfgebieten bei  $200 - 300 \text{ g/m}^2$  pro Jahr (Gerlach 1994). Das Schelfgebiet umfasst die Flussmündungsgebiete, Küstengewässer und Salzwiesen, die als die wichtigsten Zonen der marinen Umwelt gelten. Hier befinden sich die höchste Dichte an marinen Organismen und der höchste Nährstoffgehalt der marinen Umwelt (ECETOC 2001).

Wasser enthält eine Fülle von gelösten anorganischen und organischen Substanzen. Die relative Zusammensetzung des Meerwassers ist, verglichen mit Süßwasser, weitestgehend konstant. Im Allgemeinen ist die Konzentration des DOC (dissolved organic carbon) höher als die Konzentration des POC (particulate organic carbon) (Sommer 2005).

Beim Vergleich der physikalisch-chemischen Eigenschaften vom offenen Meer mit Küstengewässer sowie Flussmündungen gibt es auch Unterschiede. Im offenen Meer sind die Temperatur, die Wasserhärte, die Ionenstärke und der pH-Wert von Meerwasser (8,1 – 8,5) relativ konstant. Im Küstenbereich und Flussmündungen dagegen sind sowohl höhere Trübungen und einen größeren Gradienten der obengenannten physikalisch-chemischen Eigenschaften (MERAG 2004) als auch Unterschiede in der Konzentration von anorganischen Nährstoffen und organischen Substraten infolge der terrestrischen Einleitungen aufzufinden. Diese sind abhängig von der Nähe zu Flussmündungen und die Tiefe des Küstenschelfs (ECETOC 2001).

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Verweilzeit des Wassers innerhalb des Meeres. Am Längsten ist sie bei umschlossenen oder halbumschlossenen Meeren wie z.B. die Ostsee, die eine Verweilzeit von 30 Jahren besitzt. Die Verweilzeit hat direkten Einfluss darauf

wie die AM in der marinen Umwelt zurückgehalten oder akkumuliert werden (ECETOC 2001).

Die Bioverfügbarkeit eines Stoffes und die daraus eventuell resultierende Toxizität hängen von den Substanzeigenschaften und den Eigenschaften der Umgebungsmatrix ab. Im marinen Bereich herrscht ein leicht basisches Milieu (pH-Wert von 8,1 bis 8,5), im Süßwasserbereich ein leicht saures bis neutrales Milieu (pH-Wert von 5 bis 8). Das kann Auswirkungen auf die Ionisierungsrate der Substanzen und deren Verbleib in der Umwelt haben. Für eine Adsorption von AM an marine Sedimente wären theoretisch leicht basische AM von Bedeutung, dessen  $pK_a$  Wert um 8 liegt. Diese AM liegen im neutralen bis leicht basischen Milieu in neutraler Form vor und adsorbieren an Feststoffen. Saure AM liegen im neutralen bzw. leicht basischen Bereich meist vollständig dissoziiert vor und sind hydrophil.

Im Meerwasser ist die Ionen-Konzentration höher als im Süßwasser. Dissoziierte anorganische Salze ändern die Wasserstruktur und senken die Löslichkeit von Substanzen (Aussalzung). Die Löslichkeit von unpolaren Verbindungen sinkt bis zu etwa 10 – 50 % im Vergleich zu deionisiertem Wasser. Bei polaren Verbindungen oder Verbindungen mit polaren funktionellen Gruppen sinkt die Löslichkeit weniger stark, da sie eine geringere hydrophobe Oberfläche besitzen und in Wechselwirkung mit im Wasser gelösten Anionen und Kationen stehen (ECETOC 2001).

Durch Komplexbildung ändert sich die Bioverfügbarkeit dieser Substanzen. Ausgefällene Stoffe sedimentieren und können durch Aufnahme von benthischen Organismen akkumuliert werden und akute sowie chronische toxische Effekte hervorrufen. Gelöste Komplexe können von schwimmenden (Nekton) oder treibenden Organismen (Plankton) über die Zellmembranen aufgenommen und ebenfalls akkumuliert werden und toxische Effekte hervorrufen.

Die Temperatur spielt eine weitere wichtige Rolle. Im Vergleich zum Süßwasserbereich ist der marine Lebensraum als kalt einzustufen, mit einer mittleren Temperatur von 4°C. Aufgrund der niedrigeren Temperaturen ändern sich auch die Schadstoffwirkungen auf marinen Organismen. Zum Beispiel sind marine Säuger großwüchsig, so dass das Verhältnis Oberfläche-Volumen zugunsten des Volumens ausfällt, damit weniger Wärme abgegeben wird (Bergmannsche Regel). Mit der Großwüchsigkeit geht auch eine längere Lebenszeit

einher, die führt wiederum zu einer Schadstoffanreicherung (Bioakkumulation und Biomagnifikation). Weitere Aspekte sind der unterschiedliche Fettgehalt und die Stoffwechselintensität bei Meerwasser- und Süßwasserorganismen. In der Fettschicht können sich lipophile AM anreichern, die in futterarmen Zeiten oder während der Stillzeit mobilisiert werden. Zudem können AM die Stoffwechselaktivität negativ beeinflussen (Floeter 2006).

Die Ökosysteme der Nord- und Ostsee sind durch ihre besondere Beschaffenheit sehr gefährdet als Schadstoffsенke zu enden, deshalb wird kurz auf ihre Besonderheiten eingegangen.

### **1.3.2.1 Lebensraum Nordsee**

Die Nordsee ist ein 520 000 km<sup>2</sup> großes Schelfmeer und gehört zu den produktivsten und fischreichsten Meeresgebieten (Gerlach 1994). Die Meeresfläche der Nordsee nimmt lediglich einen Anteil von 0,002 % der Weltmeere ein, hat aber einen Anteil an der Weltmeeresfischerei von etwa 4 %. Das Einzugsgebiet der Nordsee besitzt eine Größe von 850.000 km<sup>2</sup> und umfasst die dicht besiedelten und hochindustrialisierten Küstenstaaten Belgien, Dänemark, Deutschland, Frankreich, Niederlande, Norwegen, Schweden und das Vereinigte Königreich von Großbritannien sowie Nordirland. Die Verweilzeit des Nordseewassers liegt bei etwa sieben Monaten. Die Umsatzzeit, als Maß der Erneuerung des Wassers, variiert allerdings zwischen einem Monat und 21 Jahren. Aufgrund der bestehenden Strömungsverhältnisse haben Wasserkörper, die an den Küsten mit Schadstoffen belastet werden, eine besonders hohe Verweildauer und werden entlang der Küstenlinie bewegt (SRU 2004). In dieses stark belastete kontinentale Küstengewässer münden die Flüsse Schelde, Maas, Rhein, Ems, Weser und Elbe, außerdem weist dieser Wassergürtel eine verminderte Salinität auf (Gerlach 1994).

Die Besonderheit der Nordsee ist das sich vor den Nordseeküsten der Niederlande, Dänemarks und Deutschlands erstreckende Wattenmeer. Es ist ein auf der Welt einmaliger und sensibler Lebensraum. Er wird sowohl durch den Wasseraustausch mit der Nordsee und einmündenden Flüssen als auch vom Festland her beeinflusst (SRU 2004).

### **1.3.2.2 Lebensraum Ostsee**

Die Ostsee ist ein intrakontinentales Mittelmeer, welches in das Randmeer Nordsee mündet (Gerlach 1994). Bei einer Größe von 400.000 km<sup>2</sup> ist sie eines der größten Brackwas-

sermeere (Mischgewässer aus Meer- und Süßwasser mit einer Salinität von 0 bis 20) der Erde und wird von zahlreichen Flüssen mit einem Zufluss von 420 km<sup>3</sup> bis 550 km<sup>3</sup> pro Jahr gespeist. Knapp die Hälfte der Flusswassermenge wird von sieben Flüssen geliefert: Newa, Weichsel, Düna, Memel, Kemijoki, Oder und Lüleläv (Gerlach 1994). Das Einzugsgebiet erstreckt sich über 1,7 Millionen km<sup>2</sup>. In diesem Abflussgebiet leben rund 80 Millionen Menschen. Beinahe 15 Millionen Menschen leben an dem Küstenverlauf (HELCOM 2010). Der durchschnittliche Wasseraustausch beträgt 25 bis 35 Jahre. Er ist gering, sehr unregelmäßig und von meteorologischen Bedingungen abhängig. Eingetragene Stoffe haben somit eine hohe Verweildauer. Veränderungen in der Wasserqualität müssen deshalb schon sehr früh als Warnsignal erkannt und beachtet werden (SRU 2004).

### **1.3.2.3 Zusammenfassung der Bioverfügbarkeit im marinen Ökosystem**

Die Bioverfügbarkeit von AM im marinen Ökosystem unterscheidet sich von der im limnischen Ökosystem.

Durch den höheren Salzgehalt im marinen Ökosystem sinkt die Löslichkeit von, vor allem unpolaren, AM und die Sorptionsfähigkeit steigt parallel dazu an. Die AM können Komplexe mit den Anionen und Kationen bilden und sedimentieren. Das führt zu einer möglichen Anreicherung von unpolaren AM in marinen Sedimenten.

Der pH-Wert des marinen Ökosystems hat auch Auswirkungen auf den Verbleib von AM. Er bestimmt die Ionisierungsrate der AM. Demnach sind (leicht) saure AM fast vollständig dissoziiert und befinden sich in der Wasserphase, leicht basische AM liegen eher in der neutralen Form vor und adsorbieren an Partikeln und Sedimenten. Somit führt der pH-Wert zu einer Anreicherung von leicht basischen AM in marinen Sedimenten.

Aufgrund des Haupteintragspfades von Nährstoffen über die Landwirtschaft und durch Kläranlagen kommt es in Flussmündungen und Küstengewässer zu einer höheren Eutrophierung als im offenen Meer. Es resultiert eine stärkere biologische Abbaubarkeit von AM, dessen Geschwindigkeit aber bei weiterer Entfernung Richtung Meer absinkt, da zum einen die Bakteriendichte immer weiter abnimmt und zum anderen die Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund der Abnahme der Temperatur reduziert wird. In Flussmündungen und Küstengewässer sinkt die Photolyseleistung aufgrund der Lichtabschwächung durch

die aufgewirbelten organischen Stoffe. Diese Aspekte begünstigen eine Anreicherung von AM in marinen Sedimenten.

Folglich ist anzunehmen, dass der Abbau von AM in der marinen Umwelt aufgrund der oben aufgeführten Faktoren geringer ist als der Abbau im limnischen Ökosystem. Sedi-mentierte AM können durch Aufnahme von benthischen Organismen akkumuliert werden und akute sowie chronische toxische Effekte hervorrufen. Gelöste Komplexe können von schwimmenden oder treibenden Organismen über die Zellmembranen aufgenommen und ebenfalls akkumuliert werden und dann toxische Effekte hervorrufen. Von besonderer Bedeutung ist die Biomagnifikation, d.h. die Anreicherung der AM über die Nahrungskette, wodurch sich auch die zunächst in benthischen Organismen akkumulierenden AM auch in pelagischen (TOP-)Prädatoren anreichern.

### **1.3.3 Aufbau Zellwand Kieselalge und Grünalge**

Zum Verständnis der Bioverfügbarkeit und Toxizität gegenüber Algen wird der Aufbau und die Funktion der Zellwand und der Zellmembran der beiden Testalgen, der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* und der Grünalge *Desmodesmus subspicatus* erläutert.

Die Zellwand dient der Stabilität und als Schutz vor mechanischen Einflüssen (Round 1975). Sie muss aber auch zur Nährstoffaufnahme und Sekretion von zellularen Produkten (Cox 2011) einen Austausch mit der Umgebung gewährleisten. Die Zellwand der Kieselalge und der Grünalge unterscheiden sich stark in deren chemischer Zusammensetzung. Das kann zu einer unterschiedlichen Bioverfügbarkeit der AM, abhängig von den funktionellen Gruppen der AM und der Zellwand, führen.

### 1.3.3.1 Diatomeen

Die Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* (Abbildung 6) gehört zu der Klasse der *Bacillariophyceae* in der Ordnung der *Naviculales* aus der Familie der *Phaeodactylaceae*.

#### 1.3.3.1.1 Zellwandaufbau Diatomeen

Diatomeen werden vor allem durch den einzigartigen Bau ihrer Zellwand charakterisiert. Sie hat die Form einer Schachtel mit darauf passendem Deckel. Das Gehäuse (Frustulum) ist bei den

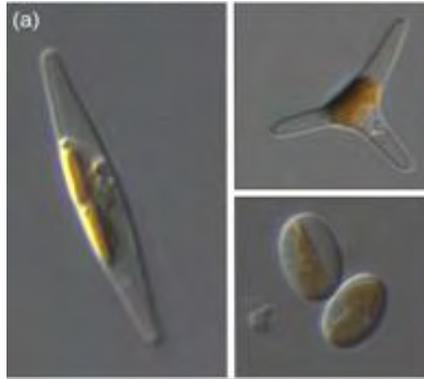


Abbildung 6 Die drei Morphotypen der *Phaeodactylum tricornutum*, l. spindelförmig, r.o. triradial, r.u. oval, Foto: Alessandra De Martino

pennaten Diatomeen langgestreckt und lanzettförmig in der Aufsicht. Es besteht aus der Hypotheka (der unteren Schachtel) und der Epitheka (dem Deckel). Die glasartige Zellwand besteht, im Gegensatz zu anderen Algenklassen, überwiegend aus amorpher,

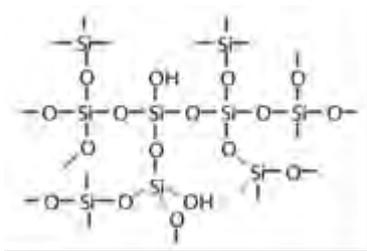


Abbildung 7  $\text{SiO}_2 \cdot \text{aq}$  (Kieselgel), Mortimer 2006

hydratisierter, polymerisierter Kieselsäure ( $\text{SiO}_2 \text{ aq}$ )<sup>3</sup> (siehe Abbildung 7), aber auch Eiweiße, Polysaccharide und fettartige Stoffe (van der Hoek 1978). Der organische Anteil, der bei anderen Algen überwiegt, ist verhältnismäßig gering. Sie ist mit Poren perforierte, um einen Austausch mit der Umgebung zu

gewährleisten. Es gibt auch vollständige, für Flüssigkeiten passierbare Durchbrechungen der Zellwand wie z.B. die Schleim- und Gallertporen (Fott 1971). Es konnte gezeigt werden, dass die Kieselsäurewände negativ elektrisch geladen sind und daher positiv geladene Partikel adsorbieren und speichern können (Round 1975). Die sauren Silanol-Gruppen des  $\text{SiO}_2$  in den Zellwänden können möglicherweise an der Bindung von Kationen beteiligt sein. Weitere wichtige Bindungsstellen sind wahrscheinlich die Carboxyl- und phenolischen Hydroxylgruppen der organischen Zellwandkomponenten (Jones 1978). Durch die

<sup>3</sup> Steht für getrocknetes Kieselgel, mit ungeordnetem verknäueltem Netzwerk, bei dem noch einzelne OH-Gruppen vorhanden sind und wechselnde Mengen von Wasser eingelagert sind.

amorphe poröse Oberfläche hat sie ein hohes Adsorptionsvermögen (Mortimer 2006). Darüber hinaus sondern pennate Diatomeen Expolymere zur Fortbewegung und Anheftung ab, welches das Adsorptionspotential ebenfalls steigert (van der Hoek 1978). Diatomeen weisen folglich ein Adsorptionspotential für Schadstoffe auf.

### 1.3.3.1.2 Die Zellwand der Diatomae *Phaeodactylum tricornutum*

Die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* ist eine besondere Kieselalge mit drei unterschiedlichen Morphotypen: oval, spindelförmig und triradial (Abbildung 6). Welcher Morphotyp auftritt, ist abhängig von den herrschenden Umweltbedingungen (Rouxhet et al. 2009). Untersuchungen haben gezeigt, dass die spindelförmigen und triradialen Zellformen überwiegen, wenn das Wachstum in flüssigen Medien stattfand, die ovalen Formen entstanden bei Zucht auf Agar-Böden (Lewin et al. 1958). Die im Wachstumshemmtest verwendeten Algen werden ebenfalls in flüssigem Nährmedium gezüchtet, weshalb sich die Betrachtung auf spindel- und triradial-förmige Zellen beschränkt. *Phaeodactylum*

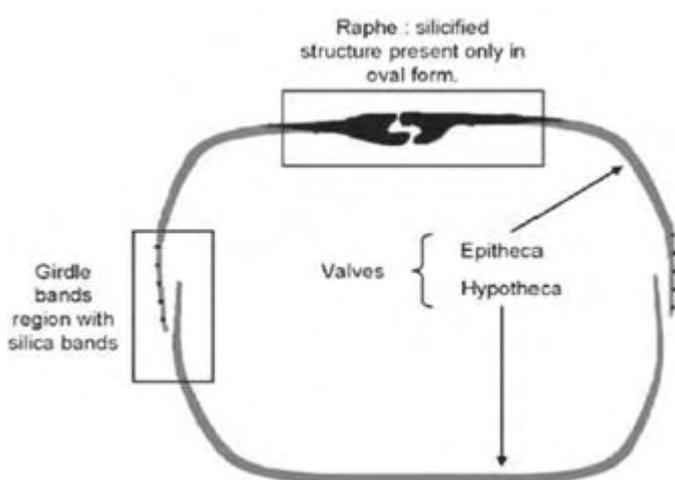
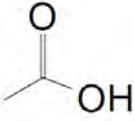
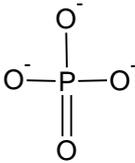
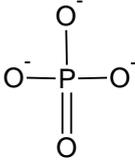
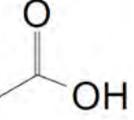


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Zellwand von *Phaeodactylum tricornutum*. Schwarze Punkte stellen verkieselte Strukturen dar, grauen Flächen organischen Komponenten (Rouxhet et al. 2009)

Phospholipide und Phosphorproteine (siehe Abbildung 8). Die Zellwände weisen nur an den Verbindungen der Valven verkieselte Strukturen auf (Rouxhet et al. 2009). Die funktionellen Gruppen der Zellwand der *Phaeodactylum tricornutum* als mögliche Bindestellen für AM sind in Tabelle 4 aufgelistet.

*tricornutum* benötigt, im Gegensatz zu typischen Diatomeen, nicht zwingend Silikat zum Wachstum. Das hat Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Zellwand. Die  $\text{SiO}_2$ -Gruppen werden durch Polysaccharide ersetzt. Die feste Zellwandfraktion besteht überwiegend aus dem strukturbildenden sulfatierten Glucomannan, weitere Bestandteile der Zellwand sind

Tabelle 4 Funktionelle Gruppen der Zellwand von *Phaeodactylum tricornutum* als mögliche Bindungsstellen für AM (nach Rouxhet et al. 2009)

Komponent	Funktionelle Gruppe	Strukturformel
Peptid	Amino-Gruppe	R-NH <sub>2</sub>
	Carboxy-Gruppe	
Phospholipid	Phosphat	
Silanol	Hydroxy-Gruppe	R-OH
Mannan	Hydroxy-Gruppe	R-OH
Phosphoprotein	Phosphat	
	Aminosäurerest: AminoGruppe	R-NH <sub>2</sub>
	Carboxy-Gruppe	

### 1.3.3.2 Grünalge

Die Grünalge *Desmodesmus subspicatus* (siehe Abbildung 9) gehört zu der Klasse der *Chlorophyceae* in der Ordnung der *Sphaeropleales* aus der Familie der *Scenedesmceae*. Die Zellen der Algen sind ellip-tisch bis spindelförmig geformt und kommen in Kolonien, bestehend aus einfachen Reihen aus vier bis 16 Zellen, vor. Unter Kulturbedingungen bilden die Zellen oft keine Kolonien, sondern bleiben frei liegen (Hoeck 1984).

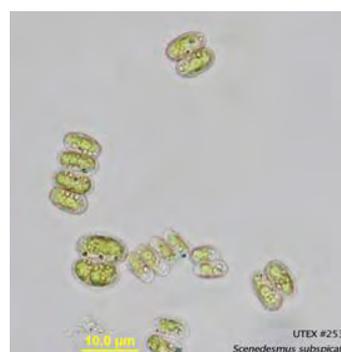


Abbildung 9 *Desmodesmus subspicatus*, The Culture Collection of Algae

### 1.3.3.2.1 Die Zellwand der Grünalge *Desmodesmus subspicatus*

Die Zellwand ist kompliziert aufgebaut und besteht aus zwei Schichten von Poly-

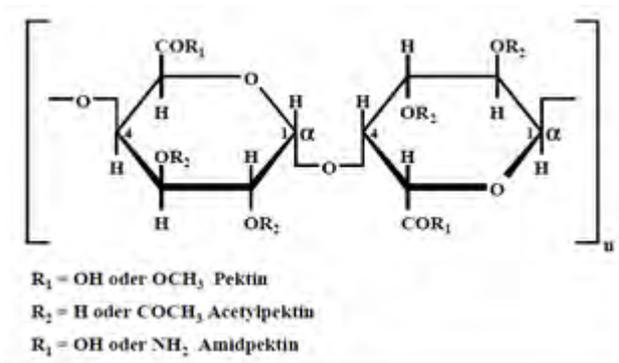


Abbildung 10 Strukturformel Pektin, Fritsch 2000

sacchariden, genauer aus einem Gemisch aus Pektin (siehe Abbildung 10) und Zellulose (Fott 1971). Pektin quillt in Gegenwart von Wasser und besitzt die Fähigkeit der Adsorption. Es ist bekannt, dass AM mit Pektin interagieren (Fritsch 2000). Eine Stützschiicht die Sporopollenin enthält, festigt die Zellwand. Außer-

halb dieser Stützschiicht liegt ein Netz, das über Stangen gespannt ist. Die Zellwand ist ein Produkt des Protoplasten und liegt diesem eng an. Es wurde in Laborversuchen nachgewiesen, dass *Scenedesmus* den Kohlenstoff auch aus organischen Stoffen wie Zucker oder Glukose assimilieren können und es ist wahrscheinlich, dass sie auch andere komplizierte-ere organische Stoffe als Kohlenstoffquelle ausnutzen können (Fott 1971).

### 1.3.4 Biomembran

Die Biomembran dient als Barriere zwischen den Zellkompartimenten, das heißt sie trennt die lebende Zelle von ihrer Umgebung. Sie zeigt das Phänomen der Semipermeabilität. Lipide und Proteine sind die Hauptbestandteile von Membranen, die häufigsten Lipide sind die Phospholipide. Sie haben eine amphiphatische Struktur und bilden eine Doppelschicht aus. Die hydrophilen Regionen stehen mit dem umgebenden Wasser in Kontakt und die hydrophoben Bereiche sind davon abgeschirmt. Zusammen mit den zahlreich eingebetteten Proteinen besitzt die Membran eine Dynamik, ein sogenanntes Fluid-Mosaik-Modell (siehe Abbildung 11). Sie beruht auf der Verschiebbarkeit der Lipid-und Proteinmoleküle, demnach sind sie keine starren Körper. Sie unterliegen der Brown'schen Molekularbewegung und stoßen wieder und wieder mit anderen Molekülen zusammen (Campbell & Reece 2009).

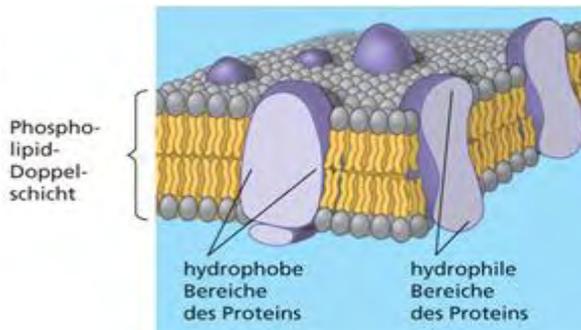


Abbildung 11 Das Fluid-Mosaik-Modell biologischer Membranen (Campbell & Reece 2009)

Durch die Dynamik und Verschiebbarkeit der Membran können sich Schadstoffe in der Membran einbetten und akkumuliert werden. Der extrazelluläre Raum und das Cytoplasma werden durch eine lipophile Zone getrennt, die nur von solchen Molekülen überwunden werden kann, die selbst über eine gewisse Lipophilie

verfügen (Purves et al. 2006) oder über die Transportproteine transportiert werden. Damit ist die Biomembran impermeabel für geladene Atome und Moleküle, größere polare organische Verbindungen sowie für alle Makroverbindungen (Weiler et al. 2008) es sei denn, diese Moleküle werden aktiv über Transportproteine transportiert.

Die Biomembran besitzt unterschiedliche Transportmechanismen für den selektiven Stoffaustausch mit der Umgebung (siehe Abbildung 12 und Tabelle 5).

Tabelle 5 Transportmechanismen der Biomembran (nach Weiler et al. 2008)

<b>Transportmechanismen</b>	
Passiver Transport	Aktiver Transport
Einfache Diffusion	Transport mit Carrier-Proteine unter Energieverbrauch
Erleichterte Diffusion durch Kanalprotein	Endozytose
Erleichterte Diffusion mit Carrier-Protein	Protonenpumpen

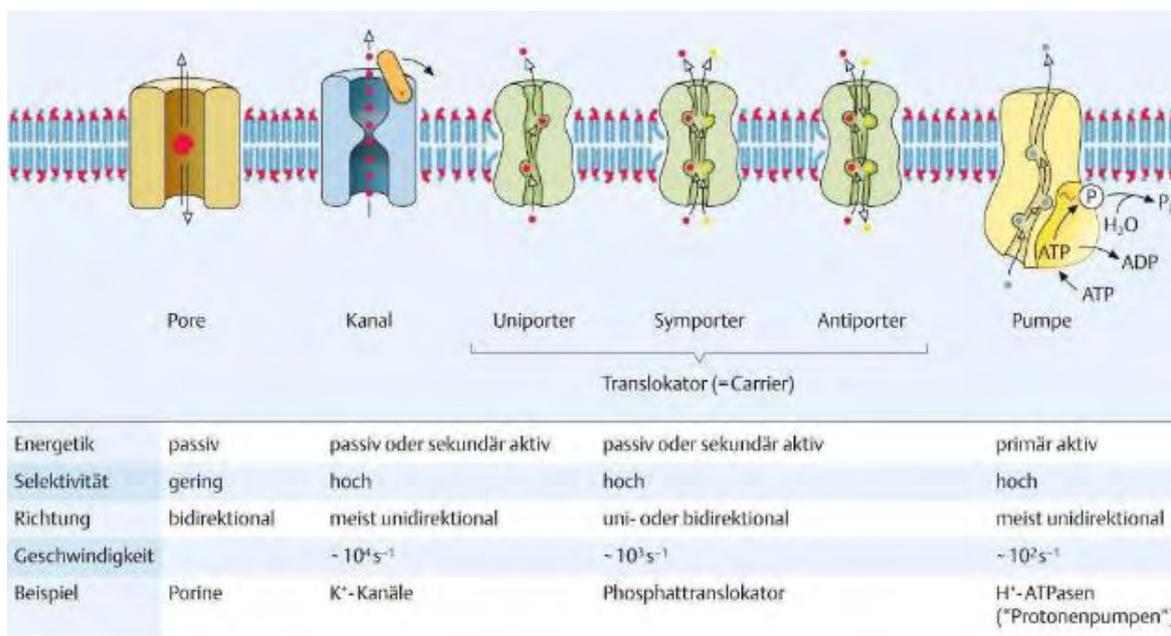


Abbildung 12 Acht Klassen und charakteristische Eigenschaften von Transportproteinen in Biomembranen, Weiler et al. 2008

Die aus den Membranen herausragende integrale Proteine oder angelagerte Kohlenhydrate können mit bestimmten Substanzen aus der Umgebung in Bindung gehen. Diese Bindung kann zu einer Änderung des Proteins führen und ein Signal in der Zelle auslösen (Signaltransduktion) (Purves et al. 2006).

### 1.3.5 Biomembran-Toxizität

Die Zellmembran ist einer der wichtigsten Zielorte von Umweltchemikalien (Fent 2003). Für Schadstoffe, die auf die Zellmembran wirken, sind insbesondere Organismen wie einzellige Mikroalgen, mit einem relativ großen Biomembran-Oberflächen-Volumen-Verhältnis potentiell gefährdet (Floeter 2006).

Die Wirkungen, die Substanzen auf die Membran ausüben können, können spezifisch oder unspezifisch sein. Bei der unspezifischen Toxizität (Basistoxizität) werden hydrophobe Verbindungen in den lipidreichen Kompartimenten der Biomembran („fluid“) eingebaut und können dort wichtige Funktionen der Membran und membrangebundenen Systeme (ihre Barrierewirkung) verhindern oder stören. Die Wirkungsstärke steht mit der Lipophilität ( $K_{OW}$ ) der Verbindung in Beziehung (Fent 2003). Diese Störungen verursachen eine Abnahme der Zellaktivität und eine verringerte Reaktion auf Reize und können zum Tode des Organismus führen. 60 % der industriellen Chemikalien verhalten sich basistoxisch

(van Wezel et al. 1995). Auf die Besonderheit der Bioakkumulation von Schadstoffen bei Mikroalgen wurde bereits unter Kapitel 1.3.1.3 (Diagramm 1) eingegangen.

Treten zusätzlich zu der Basistoxizität Wechselwirkungen mit Rezeptoren, Transportern oder Enzymkomplexen an der Zelloberfläche oder an der Innenseite der Zellmembran auf, wird von spezifischen Wechselwirkungen gesprochen (Fent 2003). Einige hydrophobe organische Verbindungen ermöglichen einen Transport von Ionen, in der Regel Protonen, durch die Membran, was zu einem Kurzschluss des chemiosmotischen Protonenzyklus führt. Dieser stellt die treibende Kraft für die ATP-Synthese und für Transportvorgänge durch die Membran. Letzterer Mechanismus wird als Entkopplung bezeichnet (Hunziger 2001).

AM sind häufig schwach saure oder basische organische Verbindungen und besitzen viele funktionelle Gruppen (siehe Kapitel 1.3.1). Sie können anhand ihres Verteilungsprozesses in drei Gruppen unterteilen werden:

1. Rein wasserlösliche
2. Amphiphile
3. Rein lipidlösliche

Die rein wasserlöslichen AM können nur schlecht resorbiert werden und werden schnell wieder ausgeschieden. Solche AM kommen nur selten vor. Amphiphile AM haben einen hydrophoben und einen hydrophilen Anteil, die in nicht zu großer Entfernung voneinander stehen. Sie sammeln sich an Grenzphasen an, wo ein wässriges Milieu mit einer apolaren Phase zusammentrifft, das ist der Fall für jede Zellmembran. Kationisch amphiphile Pharmaka akkumulieren an Membranen. Anionisch amphiphile AM weisen häufig eine hohe Plasma-Eiweißbindung auf und können sich an den Proteinen in Zellmembranen einlagern. Rein lipidlösliche Pharmaka können sich entsprechend ihres  $K_{OW}$  an Lipiden der zellulären Membran anreichern (Lüllmann et al. 2010).

#### **1.4 Auswahl AM**

Bei der Auswahl der Arzneimittel, die in dieser Arbeit untersucht werden sollen, wurden unterschiedliche Kriterien herangezogen.

Es wurde eine Literaturrecherche nach folgenden Kriterien durchgeführt:

- Prioritärer Stoff (Wasserrahmenrichtlinie und andere Stofflisten aufgrund des Vorkommens in der Umwelt und seiner Wirkung)
- Verkaufsmengen
- gefundenen Konzentrationen in der marinen Umwelt (Küstengewässer).
- Wirkmechanismus
- $E_rC_{50}$ -Wert bei Algen

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6 Übersicht der Ergebnisse Recherche

Wirkstoff	Carbamazepin	Clofibrinsäure	Diclofenac	Ibuprofen	Primidon	Propranolol	Fluoxetin	Propyphenazon
Wirkmechanismus	Blockade Natriumkanäle	Aktivierung PPAR $\alpha$	Hemmung Cox-2 (stärker als Ibuprofen)	Hemmung Cox-2	Hemmung GABA-A	blockiert $\beta_{1+2}$ -Rezeptoren	Serotonin-Wiederaufnahmehemmer	Hemmung Cox-2
Verkaufsmenge [kg/a]	<sup>2)</sup> 87604,9 (2001)	<sup>2)</sup> 2,3	<sup>1)</sup> 85800 (2001)	<sup>1)</sup> 344880 (2001)	<sup>2)</sup> 9996,6 (1999)	<sup>2)</sup> 7316,6 (1999)	-	<sup>2)</sup> 28140,2 (2001)
(Kandidat) prioritärer Stoff	ja	ja	ja	ja	ja	nein	nein	ja
E <sub>t</sub> C <sub>50</sub> [mg/l]	<sup>1)</sup> 74 (3 d) DS <sup>2)</sup> 85 (3 d) DS	<sup>1)</sup> 115 (3 d) DS <sup>6)</sup> 144 (2 d) Chl	<sup>1)</sup> 16,3 (3 d) DS <sup>3)</sup> 14,5 (4 d) DS	<sup>1)</sup> 315 (3 d) DS <sup>6)</sup> 26 (2 d) SC	-	<sup>6)</sup> 5,3 (3 d) DS	<sup>3)</sup> 0,024 (3 d) <sup>6)</sup> 0,0021 (3 d) DS	<sup>6)</sup> 1,0 (2 d) SC
Konzentration marine Umwelt [ $\mu$ g/l]	<sup>4)</sup> 0,057 Wismarbucht <sup>5)</sup> 0,008 Deutsche Bucht <sup>5)</sup> 0,0075 Deutsche Bucht, offene See	<sup>5)</sup> 0,0002 Deutsche Bucht	<sup>4)</sup> 0,040 Ostsee (Hidensee) <sup>5)</sup> 0,0002 Deutsche Bucht, offene See	<sup>4)</sup> <0,05	<sup>5)</sup> 0,002 Deutsche Bucht <sup>5)</sup> 0,00018 Deutsche Bucht, offene See	<sup>4)</sup> <0,01	-	<sup>4)</sup> <0,01

1) Sachverständigenrat für Umweltfragen, Arzneimittel in der Umwelt, Stellungnahme April 2007

2) Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC), Arzneimittel in der Umwelt, Auswertung der Untersuchungsergebnisse, 2003

3) Ecotoxicology of human pharmaceuticals, Karl Fent, 2006

4) Dr. Alexander Bachor, 2001, Arzneimittelbefunde in Gewässern eines dünn besiedelten Bundeslandes, Landesamt für Umwelt, Naturschutz und Geologie, Mecklenburg Vorpommern

5) Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH), Arzneistoffe 2007

6) ETOX: Informationssystem Ökotoxikologie und Umweltqualitätsziele, Umweltbundesamt, Datenbank, <http://webtox.uba.de/webETOX>

Es wurden anhand der aufgeführten Kriterien die AM Diclofenac, Carbamazepin und Fluoxetin ausgewählt.

Am 31.01.2012 hat die europäische Kommission den Vorschlag zur Erweiterung der prioritären Liste für die Wasserrahmenrichtlinie und die Richtlinie über Umweltqualitätsnormen bekanntgegeben. Zum ersten Mal wurden Pharmazeutika vorgeschlagen, unter anderem Diclofenac. Diclofenac gehört zu der Wirkstoffgruppe der Analgetika. Seine Wirkung beruht auf die nichtselektive Hemmung der Cyclooxygenasen (Herdegen 2010).

Das BSH hat im Rahmen ihres Monitoringprogramms in der deutschen Bucht auch Arzneimittel untersucht. Es wurden Carbamazepin, Diclofenac, Primidon, Oxazepam und Clofibrinsäure nachgewiesen. Die gefundene Konzentration an Carbamazepin ist mit Abstand die höchste (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14). Carbamazepin ist ein Antiepileptikum. Sein Wirkmechanismus beruht auf die Blockade der Na<sup>+</sup>-Kanäle.

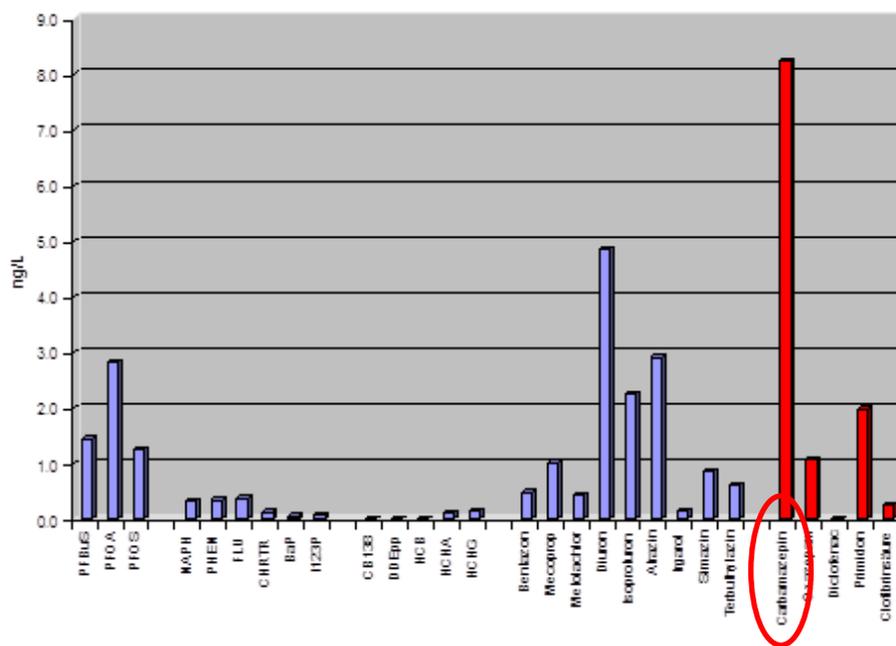


Abbildung 13 Mittlere Konzentration in Küstennähe Deutsche Bucht; Mittelwerte 2004 bis 2005; Arzneistoffe 2007. N. Theobald, Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH)

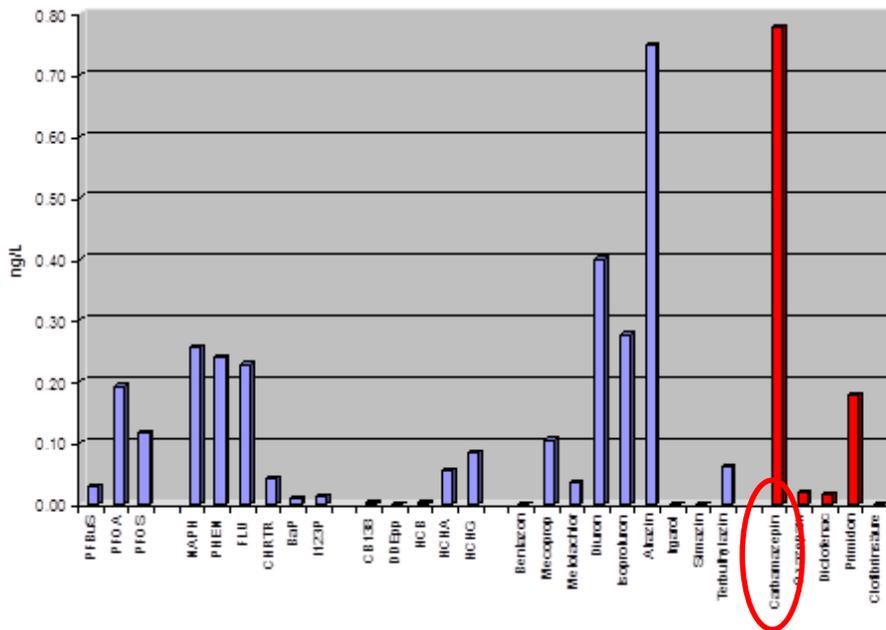


Abbildung 14 Deutsche Bucht offene See Mittelwerte 2004 bis 2005; Arzneistoffe 2007. N. Theobald, Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH)

Bei einem Vergleich von  $EC_{50}$ - und  $LC_{50}$ -Werten von unterschiedlichen Pharmazeutika gegenüber Organismen unterschiedlicher trophischer Ebenen weist Fluoxetin die höchste Toxizität gegenüber Phytoplankton auf (siehe Abbildung 15). Der  $EC_{50}$ -Wert (48 h) liegt bei 0.024 mg/L und der  $LC_{50}$ -Wert (48 h) bei 2 mg/L (Fent et al. 2006).

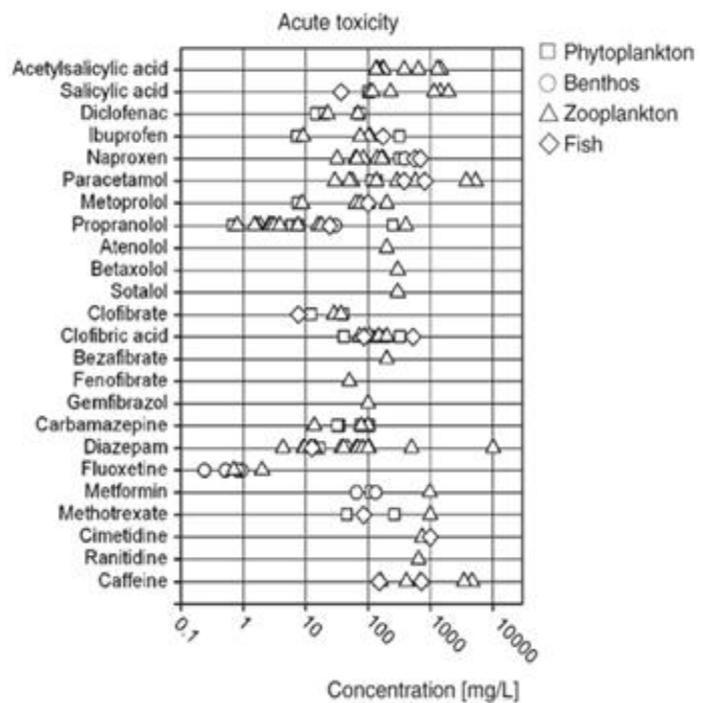
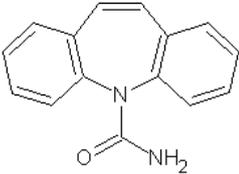
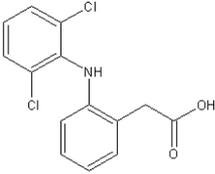
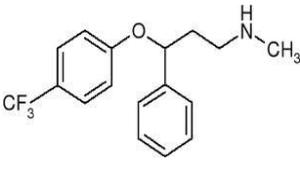
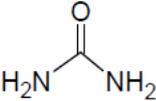
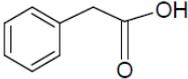
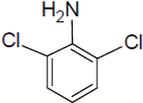
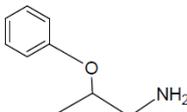
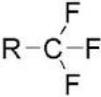


Abbildung 15 Akute Toxizität von Pharmazeutika, K. Fent et al., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceutical

### **1.4.1 Übersicht Eigenschaften der ausgewählten AM**

In Tabelle 7 sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der drei ausgewählten Arzneimittel zusammengefasst, die im Folgenden detaillierter erläutert werden. Die Tabelle führt auch die für die Expositionsanalyse wichtigen Parameter MEC (in der Umwelt gemessene Konzentration (Measured environmental concentration)), PNEC (Abschätzung der vorausgesagten Umweltkonzentration der Substanz (Predicted no effect concentration)), NOEC (Konzentration, bei der kein Effekt auftritt (no-observed-effect-concentration)) und PEC- Werte (Abschätzung der vorausgesagten Umweltkonzentration der Substanz (Predicted Environmental Concentration)) der AM auf. Für die Gefahrenabschätzung werden die MEC-Werte mit den PNEC- Werten verglichen. Sind die Umweltkonzentrationen höher als der PNEC-Wert ( $MEC/PNEC > 1$ ) müssen Maßnahmen zur Risikominderung in Betracht gezogen werden (UBA 2011).

Tabelle 7 Übersicht der physikalisch-chemische Eigenschaften von Carbamazepin, Diclofenac und Fluoxetin

	<b>Carbamazepin</b>	<b>Diclofenac</b>	<b>Fluoxetin</b>
Wirkstoffgruppe	Antiepileptika	Analgetika	Antidepressiva
Wirkmechanismus	Blockade Na-Kanäle	Hemmung Cox-2	Serotonin-Wiederaufnahme-hemmer
Löslichkeit bei 25°C [g/l]	<sup>1)</sup> 0,018	<sup>a)10)</sup> 25 <sup>2)</sup> 2,37	<sup>6)</sup> 0,583
pK <sub>a</sub>	<sup>2)</sup> 14	<sup>a)2)</sup> 4,16	<sup>9)</sup> 10,05
Molekulargewicht [g/mol]	236,27	296,15	214,65
Strukturformel			
Funktionelle Gruppe	Harnstoffgruppe 	Phenylelessigsäure-Gruppe  2,6-Dichloranilin-Gruppe 	Phenoxypropylamin-Gruppe  Trifluoromethyl-Gruppe 
log K <sub>ow</sub>	<sup>4)</sup> 2,45	<sup>a)1)</sup> 0,7 <sup>2)</sup> 4,51	<sup>6)</sup> 2,75
MEC/PNEC [µg/l]	<sup>3)</sup> 2,4	<sup>3)</sup> 31	-
NOEC [µg/l]	<sup>8)</sup> 25	<sup>8)</sup> 1000	<sup>7)</sup> < 0,6
PEC [mg/l]	1,94 <sup>5)</sup>	1,90 <sup>5)</sup>	-

a) Diclofenac-Natrium

5) BLAC 2003

1) Pomona College Medicinal Chemistry Project, Claremont, Log P Database

6) Nentwig 2004

2) Mersmann, 2003

7) ETOX

3) UBA 2011

8) LANUV 2007

4) ARGE 2003

9) Rendal et al. 2011

10) Sicherheitsdatenblatt Diclofenac-Natrium, CALBIOCHEM®

## 1.4.2 Carbamazepin

Carbamazepin ist das weltweit am häufigsten verschriebene Antiepileptikum. Es blockiert spannungsabhängige Natriumkanäle und unterdrückt damit die epileptiformen Entladungen. Carbamazepin ist strukturell und pharmakologisch den trizyklischen Antidepressiva ähnlich und wird daher nicht nur zur Epilepsiebehandlung, sondern auch zur Stimmungsaufhellung eingesetzt (LANUV 2007). Im Jahr 2001 entfielen ca. 40% der verordneten Tagesdosen aller Antiepileptika auf Carbamazepin. Die Ausscheidung des Wirkstoffes erfolgt nahezu vollständig in metabolisierter Form. Insgesamt werden 72 % der Dosis über den Urin und 28 % mit den Faeces ausgeschieden. In den Fäzes fanden sich 10 - 15 % der Dosis als unverändertes Carbamazepin und im Urin lediglich 2% (LANUV 2007).

### 1.4.2.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Carbamazepin wird der Wirkstoffklasse der Harnstoffderivate zugeordnet. In rein wässriger Lösung bleibt Carbamazepin im pH-Bereich von 0 bis 12 aufgrund seines  $pK_a$ -Wertes von 14,0 relativ stabil (siehe Diagramm 2). Es ist hydrophob ( $\log K_{OW}$  2,45) und lagert sich in Lipiden der Membran ab (Lüllmann et al 2010). Des Weiteren ist Carbamazepin persistent und wird kaum in der Umwelt abgebaut (LANUV 2007).

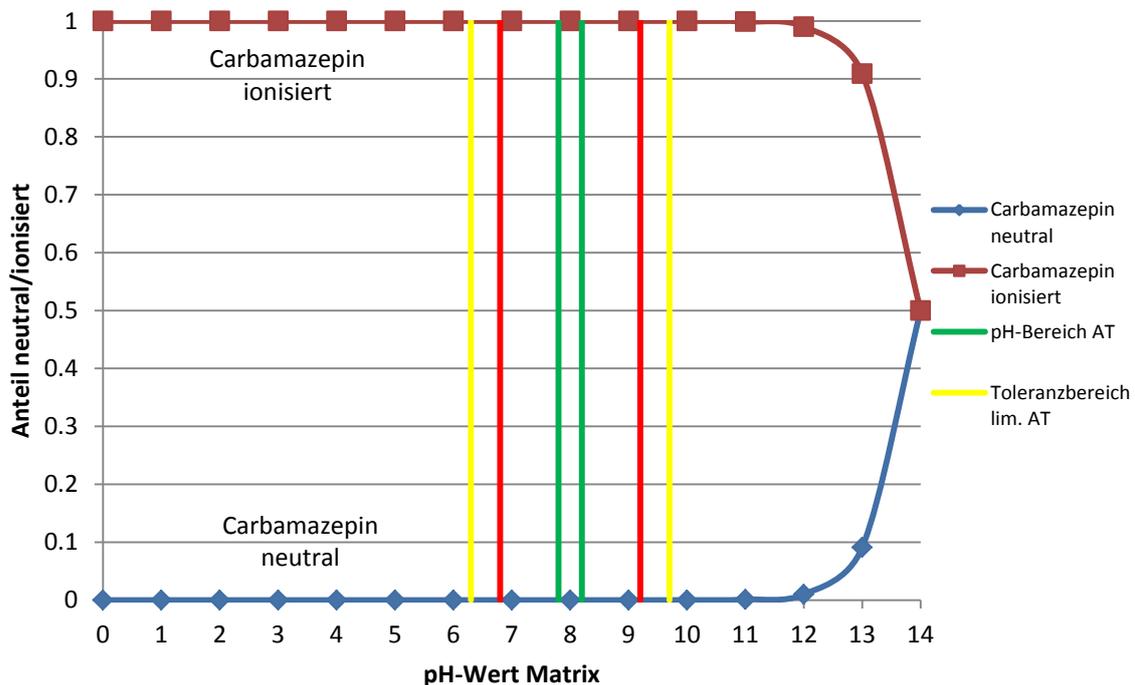


Diagramm 2 Auswirkung des pH-Wertes auf die Speziation von Carbamazepin

### 1.4.2.2 Ökotoxizität

Carbamazepin blockiert spannungsabhängige Natriumkanäle. Das kann bei Algen zur Hemmung des Stoffwechsels führen.

### 1.4.3 Diclofenac

Diclofenac ist ein nichtsteroidales Antiphlogistikum (NSAP) und lässt sich in die Indikatorgruppe der Analgetika, Antipyretika und Antiphlogistika einordnen. Ihre Wirkung beruht auf der Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase und damit auf der Unterbindung einer Prostaglandinproduktion. Diese Signalstoffe regulieren verschiedene Funktionen im Körper wie die Fieber oder die Schmerzempfindung. NSAP lassen sich aufgrund ihres  $pK_a$ -Wertes in saure und nicht-saure NSAP einteilen. Diclofenac zählt zu den sauren NSA (Mersmann 2003). Diclofenac wird am häufigsten bei der Therapie rheumatischer Erkrankungen angewendet und verfügt über einen Marktanteil von etwa 65% in Deutschland. Die jährlichen Verkaufsmengen steigen stetig. 1996 lagen sie bei 69.873,5 kg, 1998 bei 80.063,8 kg, 2001 bei 85.800,7 kg und 2009 bei 91.583 kg. Die Tagesdosis bei der oralen Anwendung beträgt durchschnittlich 50-150 mg (ARGE 2003).

### 1.4.3.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Diclofenac gehört zu den Phenyllessigsäurederivaten (Herdegen 2003) und hat einen amphiphilen Charakter (besitzt hydrophile und hydrophobe funktionelle Gruppe). Es ist die chemische Grundsubstanz, die in pharmakologischen Präparaten häufig als Mononatrium vorkommt. Die Speziation von Diclofenac ist pH-Wert abhängig und es liegt im pH-Bereich von neutralem Wasser fast vollständig ionisiert vor. Erst ab einen pH-Wert deutlich unter dem  $pK_a$ -Wert von 4,18 dominiert die undissoziierte Form (siehe Diagramm 3). Diclofenac verfügt über eine relativ gute Sorptionsfähigkeit, abzulesen von dem  $\log K_{OW}$ -Wert von 4,51 (Mersmann 2003). Das im Agentest verwendete Präparat war Diclofenac-Na, welches eine gute Wasserlöslichkeit von 25 mg/l besitzt und dementsprechend einen niedrigeren  $\log K_{ow}$  von 0,7 aufweist.

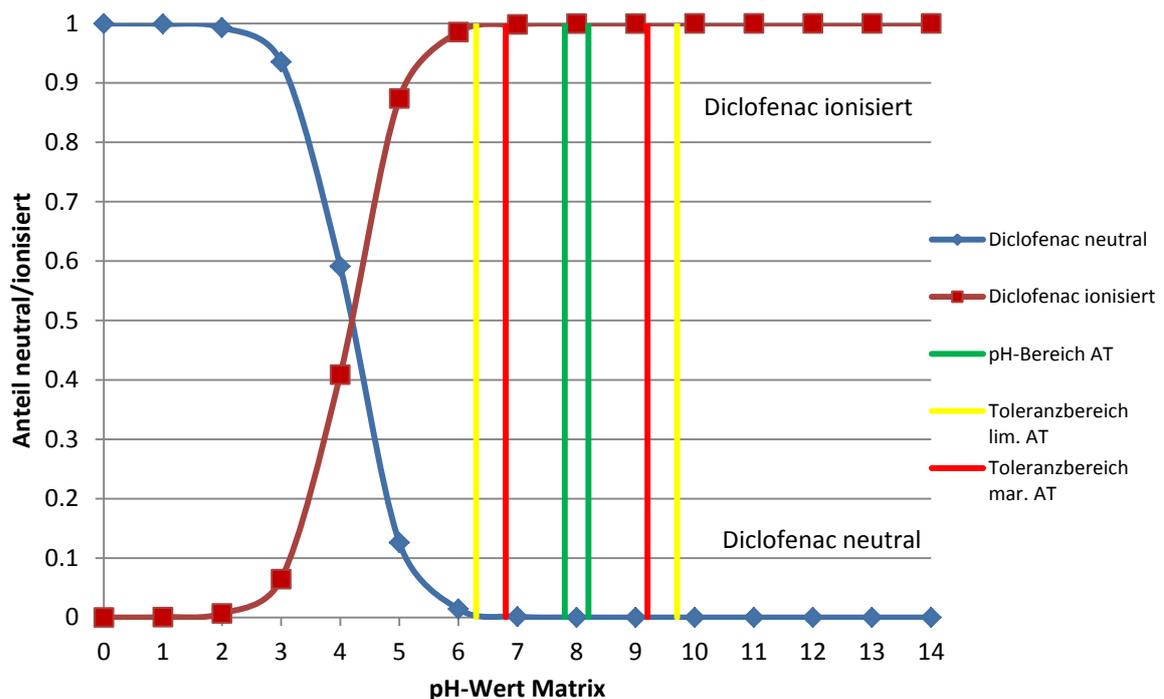


Diagramm 3 Auswirkung des pH-Wertes auf die Speziation von Diclofenac

### 1.4.3.2 Toxikokinetik

50 %-70 % der applizierten Dosis werden in Form von Metaboliten über den Urin ausgeschieden, weniger als 1 % davon als Muttersubstanz (UBA 2011).

### **1.4.3.3 Ökotoxizität**

NSAP können sich in Epithelzellen der Schleimhaut (Mukosa) einlagern und dort die ATP-abhängige Energiegewinnung entkoppeln (Herdegen 2010). Diese Entkoppelung kann Grund für die Wachstums hemmung bei Algen sein. Der amphiphile Charakter von Diclofenac führt auch zu einer Einlagerung in die Proteine der Zellmembran (Lüllmann et al. 2010).

### **1.4.4 Fluoxetin**

Fluoxetin ist ein Antidepressivum. Sein Wirkmechanismus beruht auf Hemmung der selektiven Serotonin-Rückaufnahme (Lüllmann et al 2010).

#### **1.4.4.1 Physikalisch-chemische Eigenschaften**

Fluoxetin ist ein Phenoxypropylamin-Derivat und besitzt ein geradkettiges Phenoxypropylamin-Gerüst mit sekundärer Aminogruppe und eine Trimethyl-Gruppe mit einer hohen Elektronegativität. Fluoxetin hat einen  $pK_a$ -Wert von 10,05 und im neutralen Bereich liegt es fast vollständig ionisiert vor (siehe Diagramm 4). Im äußeren Bereich des Toleranzbereiches des marinen und besonders des limnischen Algentest ändert sich der Anteil an neutraler zu ionisierter Form.

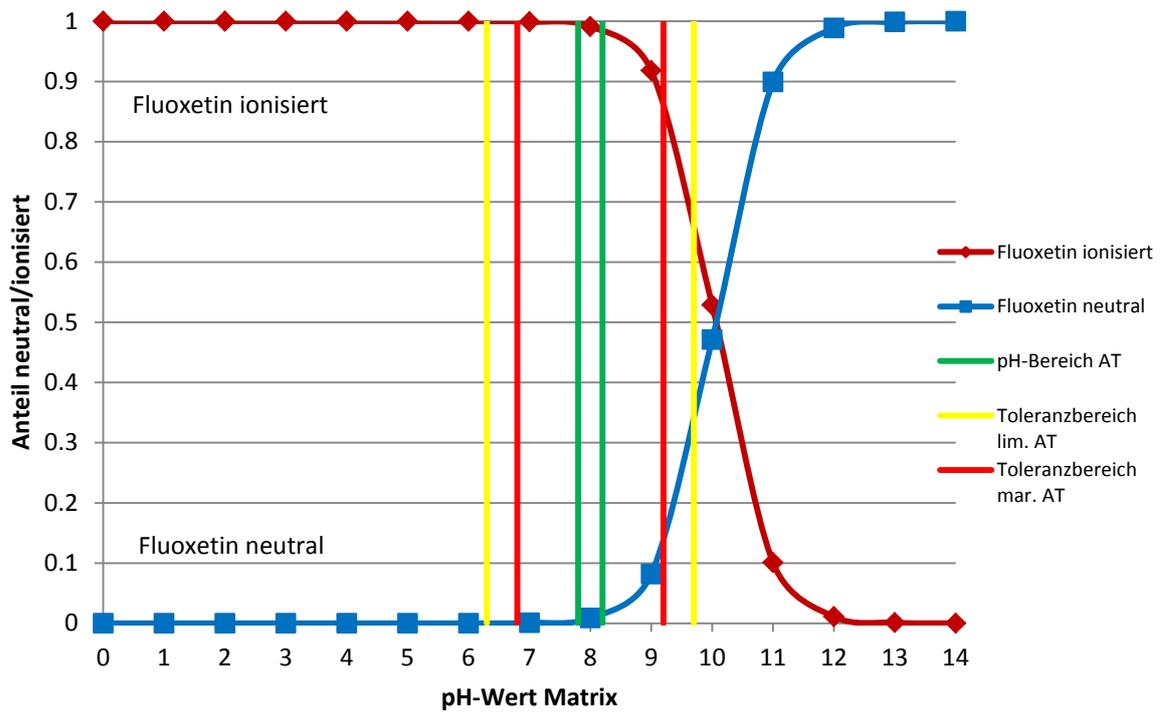


Diagramm 4 Auswirkung des pH-Wertes auf die Speziation von Fluoxetin

#### 1.4.4.2 Ökotoxizität

Fluoxetin besitzt lipophile Phenoxygruppe und ist ein starker Eiweißbinder (Lüllmann et al. 2010).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Der limnische und der marine Algentest

Der Wachstumshemmtest mit der marinen Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* baut auf demselben Prinzip wie der Süßwasseralgentest mit der Grünalge *Desmodesmus subspicatus* auf. Die Algentests wurden für diese Arbeit nach den DIN EN ISO standardisierten Testverfahren – limnisch 8692 (2005), marin 10253 (2006) – erstmals im Biologielabor der HAW Hamburg aufgebaut und durchgeführt. Die Verfahren werden im Folgenden kurz erläutert. Für Details wird auf die jeweilige Norm verwiesen.

#### 2.1.1 Prinzip

Bei dem chronischen Wachstumshemmtest mit einzelligen Algen werden monospezifische Algenstämme über mehrere Generationen unter definierten Bedingungen mit einem Testgut, bestehend aus chemischen Verbindungen oder Mischungen, exponiert (DIN EN ISO 10253; DIN EN ISO 8692). Während der Untersuchung müssen sich die Algen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, um ein gleichmäßiges und ungehindertes Wachstum während des Testdurchlaufes zu gewährleisten. Die Testdauer beträgt  $72 \pm 2$  h und alle 24 Stunden wird die Zelldichte der Testansätze bestimmt.

Der zu bestimmende ökotoxikologische Effekt ist die Hemmung der Vermehrungsfähigkeit der Algen (Rudolph et al. 1986). Ermittelt wird er aus der spezifischen Wachstumsrate in den Testkonzentrationen im Verhältnis zu der spezifischen Wachstumsrate eines Kontrollansatzes, welcher unter identischen Bedingungen läuft. Wird die Wachstumsphase halblogarithmisch dargestellt, ergibt sich eine für die Biomassenzunahme eine Gerade. Der Anstieg dieser Gerade ist die spezifische Wachstumsrate (Kohl et al. 1988).

Algen sind leicht zu kultivieren. Der Algentest ist ökologisch relevant, weil Effekte von Primärproduzenten und chronische Effekte innerhalb einer kurzen Testdauer (72 h) erfasst werden.

Die verwendeten Algen sind entsprechend der DIN EN ISO Normen für den limnischen Bereich die Grünalge *Desmodesmus subspicatus* (SAG Göttingen) und für Brackwasser und den marinen Bereich die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* (SAG Göttingen). Die verwendeten Geräte sind der Tabelle 8 Geräteliste zu entnehmen.

Tabelle 8 Geräteliste mit Gerätebezeichnung und Herstellerangabe

Bezeichnung	Hersteller
Radiometer	LI-185B, LI-COR®
Klimaschrank	Binder
pH-/Salinität-Messgerät	WTW Universal-Taschenmessgerät Multi-line P4
Schüttler-Typ	IKA MTS 2/4
Bechergläser	DURAN
Erlenmeyerkolben	DURAN
Trichter	DURAN
Messkolben	DURAN
Fluoreszenzmessgerät	TECAN Infinite 200 Pro-Plattenreader
min.max.-Thermometer	TFA, Germany
Pipette 1-5 ml	Mikrotiterpipette, Bruno Lange GmbH
Pipette 100-1000 µl	Eppendorf Reference
Mikrotiterplatte-24-Well	Costar 3524, Corning Incorporated Zellkultur Testplatte, Orange Scientific
Zellkammer	Tiefe 0,1000 mm, Neubauer
Membranfiltrationsgerät	1000 ml, Sartorius Göttingen
Autoklav	Systec DE-65
Mikroskop	Zeiss Axioskop
Heizschrank	Heraeus
Filterpapier	0,2 µm, Ø 47 mm, PALL Corporation
Analysenwaage	Precisa 90M-300 C

### 2.1.1.1 Algenkultur

Die Algen werden im Nährmedium (nach DIN EN ISO 10253; DIN EN ISO 8692) kultiviert und wöchentlich Subkulturen angelegt. Aus diesen Kulturen werden die Vorkulturen für den Wachstumshemmtest hergestellt.

Die Vorkulturen werden 2 bis 4 Tage vor dem Testansatz angesetzt. Wichtig ist, dass eine Zelldichte von  $2 \cdot 10^3$  Zellen/ml bis  $10^4$  Zellen/ml in den Testansätzen erreicht wird, um ein exponentielles Wachstum zu gewährleisten (Kohl et al. 1988). Die Zelldichte kann entweder über ein Partikelzählgerät, einer Zählkammer oder indirekt mit einem Fluorometer bestimmt werden.

Die Vorkultur wird unter den gleichen Bedingungen wie später der Testansatz inkubiert.

### 2.1.1.2 Methodik

Die Testsubstanz wird mit Verdünnungswasser (synthetisches Meerwasser ASW nach DIN EN ISO 10254:2006 oder entsprechend für Brackwasserbedingungen ein auf 20 PSU ver-

dünntes ASW(ABW für den marinen Test oder mit Nährmedium nach DIN EN ISO 8692) in geometrischen Verdünnungsreihen angesetzt und mit einem bestimmten Volumen an Nährlösung und Inokulum versehen. Es werden pro Probe drei Replikate und ein Blindwert gefahren. In dem Blindwert befindet sich nur die Probe ohne Nährlösung und Algensuspension. Pro Ansatz werden parallel zum Test sechs Kontrollansätze und zwei Referenzansätze mit 3,5-Dichlorphenol angesetzt, um das exponentielle Wachstum und die Sensibilität der Algen zu überprüfen. Von den Kontrollen und den Testansätzen wird vor Beginn der Inkubation der pH-Wert gemessen und von den Kontrollen zusätzlich alle 24 h die Zelldichte bestimmt.

### 2.1.1.3 Inkubation

Als Testgefäße werden 24-Well Mikrotiterplatten der Firma Orange Scientific eingesetzt. Die Testgefäße werden abgedeckt, um die Verdunstung des Ansatzes und Störungen aus der Umgebungsluft zu unterbinden, jedoch muss ein Gasaustausch über dem Ansatz gewährleistet sein. Die Testansätze werden unter festgelegten Bedingungen für  $72 \pm 2$  h unter kontinuierlichem weißem Licht (Lichtintensität von 60 bis 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ) bei  $20 \pm 2$  °C mit 150 rpm für den marinen Test und bei  $23 \pm 2$  °C mit 250 rpm für den Süßwassertest geschüttelt. Durch das Schütteln werden eine Homogenität der Algen sowie eine Optimierung des CO<sub>2</sub>-Austausches und eine verringerte pH-Wert-Änderung erreicht (Kohl et al. 1988).

### 2.1.1.4 Auswertung

Die Kontrollen und Testansätze werden alle  $24 \pm 2$  h fluorometrisch mit dem Plattenfluorometer TECAN Infinite 200 Pro<sup>®</sup> und den in Tabelle 9 zusammengefassten Einstellungen gemessen.

Tabelle 9 Messparameter TECAN Infinite 200 Pro für Algentest

	<b>Filterkombination 1</b>
<b>Exzitationswellenlänge [nm]</b>	430
<b>Emissionswellenlänge [nm]</b>	670
<b>Verstärkung V</b>	50

Die Zelldichte wird anhand der linearen Kalibriergerade für den marinen Algentest (siehe Diagramm 5) und den limnische Algentest (siehe Diagramm 6) ermittelt.

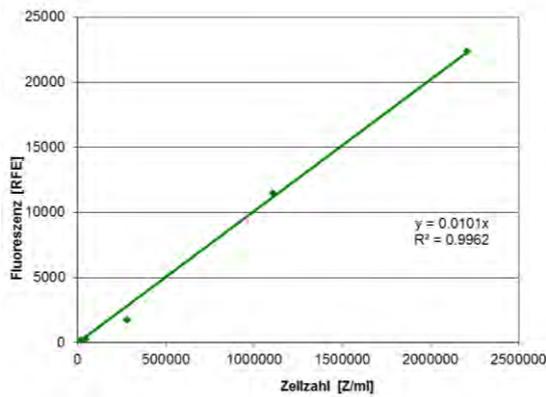


Diagramm 5 Kalibriergerade für marinen Algentest mit der Filterkombination I und der Verstärkung 50

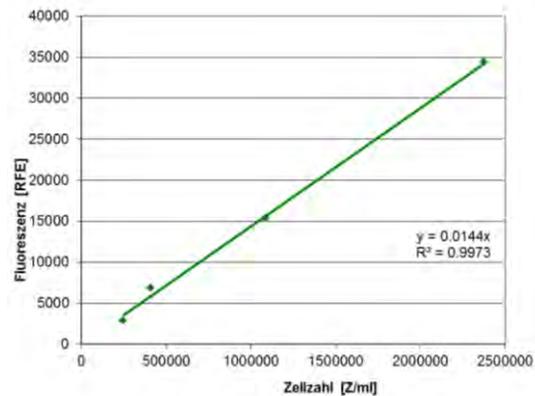


Diagramm 6 Kalibriergerade für den limnischen Algentest mit der Filterkombination 1 und der Verstärkung 50

Das Kriterium für die toxische Wirkung der Prüfsubstanz ist die Hemmung der Zellvermehrung (Rudolph et al. 198). Bei Testende werden von allen Verdünnungen der pH-Wert und die Zelldichte bestimmt. Aus der Zelldichte wird die Hemmung als Reduktion der Wachstumsrate der Testansätze im Vergleich zur Kontrollwachstumsrate errechnet. Die  $E_rC_{50}$ -Werte der Referenzansätze sollen nach DIN Norm bei  $2,7 \pm 0,2$  mg/l für den marinen Test bzw.  $6,42 \pm 2,3$  mg/l für den limnischen Test liegen.

Es müssen folgende Gültigkeitskriterien eingehalten werden:

Tabelle 10 Gültigkeitskriterien für den limnischen (nach DIN 8692) und den marinen Algentest (DIN 10253)

Süßwasseralgentest	Mariner Algentest
Die Zelldichte in dem Kontrollansatz muss in 72 h um mehr als Faktor 67 zunehmen. Das entspricht einer spezifischen Wachstumsrate $\mu$ von 0,058 je Stunde.	Die Zelldichte in dem Kontrollansatz muss in 72 h um mehr als Faktor 16 zunehmen. Das entspricht einer spezifischen Wachstumsrate $\mu$ von 0,0375 je Stunde.
Der Variationskoeffizient der spezifischen Wachstumsrate der Kontrollansätze sollte 5% nicht übersteigen.	Der Variationskoeffizient der spezifischen Wachstumsrate der Kontrollansätze sollte 7% nicht übersteigen.
Der pH-Wert in den Kontrollansätzen darf sich während des Tests um nicht mehr als 1,5 verändern.	Der pH-Wert in den Kontrollansätzen darf sich während des Tests um nicht mehr als $\pm 1,0$ verändern.

### 2.1.1.5 Interpretation der Ergebnisse

#### 2.1.1.5.1 Exponentielles Wachstum

Laut DIN 10253 und DIN 8692 soll für jede Testkonzentration eine Wachstumskurve erstellt werden, wobei der Logarithmus der Zelldichte gegen die Zeit aufgetragen wird (siehe Diagramm 7). Es muss gewährleistet sein, dass die Algen im Kontrollansatz in der exponentiellen Wachstumsphase sind (lineare Wachstumskurve) und nicht z.B. durch Nährstoff- oder Lichtmangel limitiert sind (stationäre Phase und anschließend Absterbephase). Für die Bestimmung der Zellzahl wurde zunächst die Zellzahl einer Verdünnungsreihe (mit 2.210.000 Zellen/ml; 1.113.000 Zellen/ml; 285.000 Zellen/ml; 50.000 Zellen/ml; 25.000 Zellen/ml) mit der Zählkammer „Neubauer improved“ (Tiefe 0,1 mm, Fläche 1 mm<sup>2</sup>) und einem Mikroskop (Zeiss Axioskop) bei einer 20fachen Vergrößerung bestimmt. Anschließend wurden bei verschiedenen Filtereinstellungen (siehe Tabelle 11) die Kalibriergeraden erstellt (siehe Diagramm 8). Da die beiden Algentests erstmals im Biologiela-  
bor an der HAW Hamburg aufgebaut wurden, mussten die optimalen Filtereinstellungen ermittelt werden.

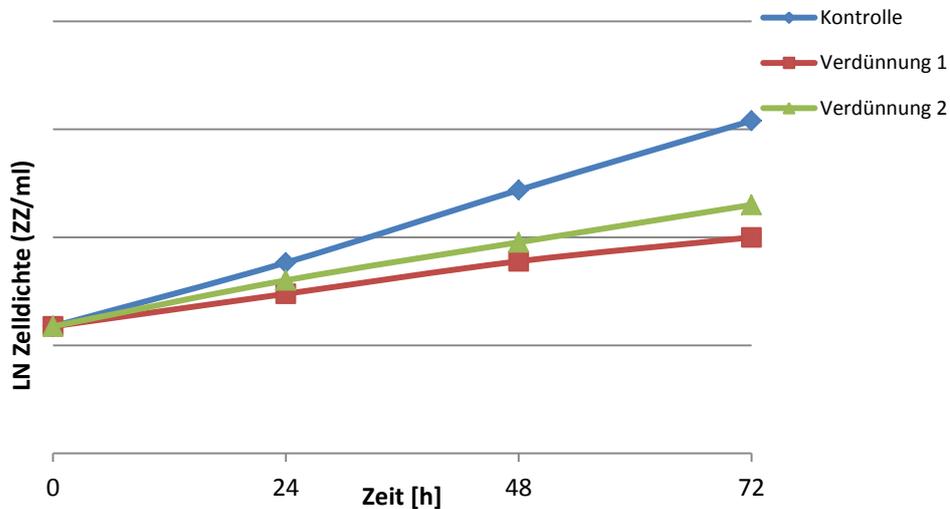


Diagramm 7 Wachstumskurven, exemplarische Darstellung des exponentiellen Wachstums

#### 2.1.1.5.2 Berechnung der prozentualen Hemmung

Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt bei beiden Algentests über die spezifische Wachstumsrate. Die spezifische Wachstumsrate wird definiert als proportionale Zunahmerate der Zelldichte je Zeiteinheit (DIN 8692).

Zuerst wird die spezifische Wachstumsrate für jede Testkonzentration und Kontrollansätze ermittelt:

$$\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t_L - t_0} \quad [\%]$$

Formel 7 Berechnung der Wachstumsrate

$t_0$  = Zeitpunkt Testbeginn

$t_L$  = Zeitpunkt Testende, bzw. Zeitpunkt der Messung

$N_0$  = nominale Anfangszelldichte

$N_L$  = gemessene Zelldichte bei  $t_L$

Aus der spezifischen Wachstumsrate wird dann die prozentuale Hemmung berechnet:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100 \quad [\%]$$

Formel 8 Berechnung der prozentualen Hemmung

$I_{\mu i}$  = prozentuale Hemmung des Testansatzes  $i$

$\mu_i$  = Wachstumsrate des Testansatzes  $i$

$\mu_c$  = mittlere Wachstumsrate im Kontrollansatz

Laut DIN (8692 und 10253) wird die Wachstumsrate über die nominale Anfangszelldichte bestimmt. Das bedeutet, anhand des verwendeten Inokulums wird die Anfangszellzahl bzw. die korrelierende Fluoreszenz bestimmt und für alle Replikate bei  $t_0$  verwendet.

In dieser Arbeit erfolgt die Auswertung anhand der nominalen Anfangsfluoreszenz und der für jeden Testansatz gemessenen Anfangsfluoreszenz. Diese Vorgehensweise ermöglicht den späteren Vergleich der Berechnungsmethoden.

#### 2.1.1.6 Ergebnisdarstellung

Für die Auswertung wird der  $E_rC_{50}$ -Wert (Effect-Concentration) herangezogen.  $E_rC_{50}$  steht für die Konzentration, bei der der gemessene Effekt (Hemmung) 50% beträgt (Fent 2003). Er gibt somit einen Hinweis auf mögliche Risiken der Probe, kann jedoch nicht zur Vor-

hersage bestimmter Effekte in der natürlichen Umwelt verwendet werden. Für die Interpretation muss der Verlauf der Wachstumskurve mit herangezogen werden. Die Wachstumskurve zeigt Merkmale, wie verzögerter Wachstumsbeginn oder guter Wachstumsbeginn, die Hinweise auf die Wirkungsweise einer toxischen Substanz geben (DIN 10253).

Die  $E_rC_{50}$ -Werte wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 über *Dose-Response-EC50 shift by global fitting* ermittelt. Die Analyse erfolgte über die nichtlineare Regression.

## **2.2 Versuchsaufbau mariner Algentest**

### **2.2.1 Laborinterne Methodvalidierung des marinen Algentests auf Mikrotiterplatte**

Für den Aufbau des marinen Algentests auf Mikrotiterplatte an der HAW Hamburg war es zunächst erforderlich, die geeignete Mikrotiterplatte und die optimale Filterkombinationen des Fluorometers (TECAN Infinite 200 Pro<sup>®</sup>) zu ermitteln. Darüber hinaus galt es festzustellen, ob die Bestimmung der Zellzahl zum Testbeginn durch Fluoreszenzmessung oder nominal erfolgen sollte.

Die optimale Filterkombination und Verstärkung wurden zunächst in Voruntersuchungen mit Kontrollansätzen und Blindansätzen auf der Mikrotiterplatte Costar 3524 durchgeführt. Die Eignungsprüfung der Mikrotiterplatten, die weitere Erprobung der Filterkombination/Verstärkung sowie die Auswirkung der Bestimmung der Zellzahl zum Testbeginn mittels Fluoreszenzmessung oder nominal wurde im Rahmen der DIN AK 5.3 Laborvergleichsuntersuchung (siehe Kapitel 2.2.1.2) zunächst laborintern mit der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol durchgeführt.

#### **2.2.1.1 Voruntersuchungen zur Filterkombination und Verstärkung**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt meistens über die gemessene Fluoreszenz der Verdünnungsstufen. Für die Messung gibt es laut der beiden DIN Arbeitsanweisungen keine vorgeschriebene Filterkombination. Die Voruntersuchung erfolgt anhand drei unterschiedlicher Filterkombinationen. Das dient der Verdeutlichung, ob unterschiedliche Filterkombinationen Auswirkungen auf die Auswertung haben.

Die von den Photosynthesepigmenten absorbierbare Strahlung befindet sich im Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm und wird als Photosynthetically Active Radiation (PhAR)

bezeichnet. Für das Pigment Chlorophyll-a liegt das Absorptionsmaximum bei 430 nm und bei 662 nm. Angeregte Chlorophyll-a Pigmente emittieren die Lichtenergie als Fluoreszenz (Purves et al. 2006).

Die Ermittlung der Zellzahl in den Kontrollansätzen erfolgte über die Fluoreszenz auf der Mikrotiterplatte Costar 3524. Gemessen wurde mit dem Fluorometer TECAN Infinite F200<sup>®</sup> PRO mit der Software i-control<sup>™</sup>. Auf der Grundlage, dass die Zellzahl mit der gemessenen Fluoreszenz korreliert wird eine Kalibriergerade erstellt. Es wird eine Verdünnungsreihe im Zellzahlbereich von etwa  $10^4 - 10^6$  Zellen/ml erstellt und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro Milliliter pro Verdünnung ausgezählt. Die gemessene Fluoreszenz der einzelnen Verdünnungsstufen wird gegen die Zellzahl gestellt und die Steigung ermittelt. Der Blindwert der Verdünnungsstufen wird ebenfalls bestimmt und von den Messwerten abgezogen, um Einflüsse der Matrix zu minimieren.

Bei der Fluoreszenzmessung kann, abhängig von der spezifischen Wachstumsrate der Algen, der volle Messbereich von 0 – 60.000 RFE (relative Fluoreszenzeinheit) des TECAN Infinite F200<sup>®</sup> PRO ausgeschöpft werden. Es werden sehr geringe Fluoreszenzen am Anfang des Testdurchlaufes von ~ 200 RFE und hohe bis zu 40.000 – 50.000 RFE am Testende gemessen. Deshalb ist es wichtig, die optimale Verstärkung auszuwählen und die empfindlichste Filterkombination zu finden. Die unterschiedlichen Filterkombinationen und Verstärkungen sind in der Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11 Filterkombinationen und Verstärkungen für die Voruntersuchung

	<b>Filterkombination 1</b>	<b>Filterkombination 2</b>	<b>Filterkombination 3</b>
<b>Exzitationswellenlänge [nm]</b>	430	465	465
<b>Emissionswellenlänge [nm]</b>	670	670	720
<b>Verstärkung V</b>	45 50 55	45 50 55	45 50 55

### 2.2.1.2 Methodvalidierung mit der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol

Referenzsubstanzen können zur Kontrolle der Verfahrensdurchführung und der Empfindlichkeit des Verfahrens geprüft werden und dienen somit der Qualitätssicherung des Ver-

fahrens (DIN EN ISO 10253; DIN EN ISO 8692). Laut DIN EN ISO 10253 und DIN EN ISO 8692 wird als Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol vorgeschlagen.

Im Rahmen der DIN AK 5.3 Laborvergleichsuntersuchung (siehe Kapitel 2.2.2) wurde eine Lösung mit 100 mg/l 3,5-Dichlorphenol, gelöst in ASW, von den Dr. U. Noack Laboratorien an die Ringtestteilnehmer verschickt. Sie diente als Stammlösung des Ringversuches. Die Stammlösung wurde 1:10 verdünnt.

Es wurde eine geometrische Verdünnungsreihe aus der Stammlösung mit 10 mg/l 3,5-Dichlorphenol angesetzt (siehe Tabelle 12). Es wurden jeweils 3 Replikate pro Testverfahren angesetzt und 6 Kontrollen. Zusätzlich wurde eine Mikrotiterplatte mit Kontrollansätzen angesetzt, die nur nach 72 h gemessen wurde.

Tabelle 12 Pipettierschema für den Referenztest

Verdünnungsstufe	Stammlösung [µl]	Verdünnungswasser ABW/ASW[µl]	Inokulum [µl]	Konz. Nährmedium [µl]	Endkonzentration [mg/l]
Kontrolle	-	1600	200	200	0
V1	1600	-	200	200	8
V2	1000	600	200	200	5
V4	500	1100	200	200	2,5
V8	250	1350	200	200	1,25
V16	125	1475	200	200	0,625

Der Versuch wurde parallel mit zwei verschiedenen 24-Well Mikrotiterplatten durchgeführt, um zu prüfen, ob die Wahl der Mikrotiterplatte Auswirkungen auf die Testergebnisse hat.

Es wurden die von den Dr. U. Noack Laboratorien an alle Ringtestteilnehmer versandte Mikrotiterplatte von der Firma Orange Scientific eingesetzt.

Darüber hinaus wurde die 24-Well Mikrotiterplatten Costar 3524 genutzt, mit der an der HAW Hamburg im Forschungslabor für Umweltanalytik und Ökotoxikologie für den Süßwasseralgentest mit *Pseudokirchneriella subcapitata* Erfahrungen vorliegen.

### 2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl zum Testbeginn

Die Bestimmung der Zellzahl zum Testbeginn ( $t_0$ ) ist wichtig, da sie in die Berechnung der Wachstumsrate über den Testzeitraum eingeht. Es gibt die Möglichkeit die Zellzahl zum

Testbeginn fluorimetrisch zu messen oder diese nominal zu bestimmen. Aufgrund der geringen Zelldichte zum Zeitpunkt  $t_0$  (im marinen Algentest  $2 \cdot 10^3 - 10^4$  Zellen/ml) kann eine fluorimetrische Messung im Grenzbereich der Gerätegenauigkeit (Hintergrundrauschen durch Eigenfluoreszenz der Mikrotiterplatten und des Nährmediums) liegen und deshalb mit Unsicherheit behaftet sein.

Bei der Bestimmung der Zellzahl zum Zeitpunkt  $t_0$  wird die Zellzahl des Inokulums fluorimetrisch bestimmt, bevor dieses in die Test- und Kontrollansätze pipettiert, und somit verdünnt wird. Die Ausgangsfluoreszenz und Ausgangszellzahl werden dann rechnerisch mit Hilfe der Kalibriergeraden ermittelt und für alle Ansätze gleich gesetzt.

Durch die nominale Bestimmung der Zellzahl zum Testbeginn wird davon ausgegangen, dass in allen Verdünnungen genau dieselbe Anzahl an Algenzellen vorliegt. Da es sich aber bei dem Inokulum um eine Algensuspension handelt und die Zellen nicht ganz homogen in Lösung verteilt sind, kann durch diese Art der Auswertung ein Fehler auftreten.

Die Auswirkung der Bestimmung der Anfangszellzahl wurde im Rahmen der DIN AK 5.3 Laborvergleichsuntersuchung laborintern mit der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol durchgeführt.

### **2.2.2 Methodvalidierung laborübergreifend – Teilnahme an dem Ringtest des DIN AK 5.3 Marine Biotests**

Die DIN EN ISO standardisierten Testverfahren 10253 und 8692 sehen für die Algentests als Testgefäße Glasgefäße (z.B. Erlenmeyerkolben) vor und der Einsatz von Mikrotiterplatten ist nicht explizit erlaubt. Da Testgefäße aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften, wie z.B. durch Adsorption von Schad- und Nährstoffen oder zu kleiner Volumina das Testergebnis beeinflussen können, wird der Einsatz von Mikrotiterplatten für Algentests derzeit in den DIN Arbeitskreisen in laborübergreifenden Ringversuchen validiert. Der marine Algentest wurde u.a. an der Technischen Universität Hamburg-Harburg (TUHH) über mehrere Jahre erfolgreich durchgeführt (Floeter 2006). Ebenso liegen positive Erfahrungen an der TUHH mit dem Süßwasser-Algentest mit der Testalge *Pseudokirchneriella subcapitata* (Floeter mdl. Mitteilung) vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem marinen Algentest an einer Laborvergleichsuntersuchung (d.h. an einem Ringtest mit weniger als 8 Teilnehmern) des DIN AK 5.3 „Ma-

rine Biotests“ teilgenommen. Ziel der Untersuchung war, für die Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol die Testergebnisse im Erlenmeyerkolben und auf Mikrotiterplatte laborübergreifend zu vergleichen. Der Testaufbau wurde bereits unter Kapitel 2.1.1.2 beschrieben.

### 2.2.3 Versuchsdurchführung AM

Diclofenac, Carbamazepin und Fluoxetin wurden im marinen und limnischen Algentest gefahren. Zum Ansetzen der Verdünnungsreihen der einzelnen Versuche werden von den AM Stammlösungen hergestellt. Diclofenac und Carbamazepin werden mit einer Konzentration von 100 mg/l und Fluoxetin mit 1 mg/l hergestellt. Zusätzlich wird parallel ein Referenztest mit 3,5-Dichlorphenol zur Kontrolle der Sensibilität gefahren. Als Lösemittel der Stammlösungen und der Referenzsubstanz wird das Verdünnungswasser verwendet, welches von DIN EN ISO 10253 bzw. DIN EN ISO 8692 vorgeschlagen wird. Die Endkonzentrationen in den einzelnen Verdünnungsreihen sind nominelle Konzentrationen, da eine analytische Konzentrationsbestimmung im Rahmen dieser Bachelorarbeit nicht möglich war.

Pipettierschemata der einzelnen AM-Versuche:

Tabelle 13 Pipettierschema 3.5-Dichlorphenol MAT

	<b>Verdünnungswasser ASW/ABW [µl]</b>	<b>Konz. NM + ASW/ABW [µl]</b>	<b>3,5-DCP [µl]</b>	<b>Inokulum + NM [µl]</b>	<b>Konzentration [mg/l]</b>
<b>V1</b>	-	200	1600	200	8
<b>V2</b>	600	200	1000	200	6
<b>V3</b>	1100	200	500	200	2.5
<b>V4</b>	1350	200	250	200	1.25
<b>V5</b>	1475	200	125	200	0.625
<b>K</b>	1600	200	-	200	0

Tabelle 14 Pipettierschema 3,5-DCP FWAT

	Verdünnungswasser [µl]	VE+NM [µl]	3,5-DCP+NM [µl]	Inokulum + NM [µl]	Konzentration [mg/l]
<b>V1</b>	-	200	1600	200	8
<b>V2</b>	600	200	1000	200	6
<b>V3</b>	1100	200	500	200	2.5
<b>V4</b>	1350	200	250	200	1.25
<b>V5</b>	1475	200	125	200	0.625
<b>K</b>	1600	200	-	200	0

Tabelle 15 Pipettierschema Diclofenac

	Verdünnungswasser VE/ASW/ABW [µl]	(Konz.) NM + VE/ASW/ABW [µl]	Diclofenac [µl]	Inokulum + NM [µl]	Konzentration [mg/l]
<b>V1</b>	-	200	1600	200	80
<b>V2</b>	600	200	1000	200	50
<b>V3</b>	1100	200	500	200	25
<b>V4</b>	1350	200	250	200	12,5
<b>V5</b>	1475	200	125	200	6,25
<b>K</b>	1600	200	-	200	0

Tabelle 16 Pipettierschema Carbamazepin

	Verdünnungswasser VE/ASW/ABW [µl]	(Konz.) NM + VE/ASW/ABW [µl]	Carbamazepin [µl]	Inokulum + NM [µl]	Konzentration [mg/l]
<b>V1</b>	-	200	1600	200	80
<b>V2</b>	600	200	1000	200	50
<b>V3</b>	1100	200	500	200	25
<b>V4</b>	1350	200	250	200	12,5
<b>V5</b>	1475	200	125	200	6,25
<b>K</b>	1600	200	-	200	0

Tabelle 17 Pipettierschema Fluoxetin

	Verdünnungswasser VE/ASW/ABW [µl]	(Konz.) NM + VE/ASW/ABW [µl]	Fluoxetin [µl]	Inokulum + NM [µl]	Konzentration [mg/l]
<b>V1</b>	-	200	1600	200	0.8
<b>V2</b>	600	200	1000	200	0.5
<b>V3</b>	1100	200	500	200	0.25
<b>V4</b>	1350	200	250	200	0.125
<b>V5</b>	1475	200	125	200	0.0625
<b>K</b>	1600	200	-	200	0

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der laborinternen Voruntersuchung zur Filterkombination und Verstärkung

Die Ergebnisse der Filterkombination und der Verstärkung mit der Mikrotiterplatte Costar 3524 sind in dem Diagramm 8 dargestellt. Es wurde für jede Kalibriergerade mittels linearer Regression die Geradenfunktion ermittelt (siehe Tabelle 18). Die Filterkombination 1 hat mit Bezug auf die Steigung die höchste Empfindlichkeit.

Tabelle 18 Ermittelten Geradenfunktionen der unterschiedlichen Filterkombinationen

	<b>Steigung x</b>	<b>Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup></b>
F1V45	0,0099	0,9978
<b>F1V50</b>	<b>0,0221</b>	<b>0,9960</b>
F1V55	0,0549	0,9962
F2V45	0,0101	0,9996
F2V50	0,0218	0,9998
F2V55	0,0476	0,9943
F3V45	0,0046	0,9974
F3V50	0,0103	0,9976
F3V55	0,0185	0,9964

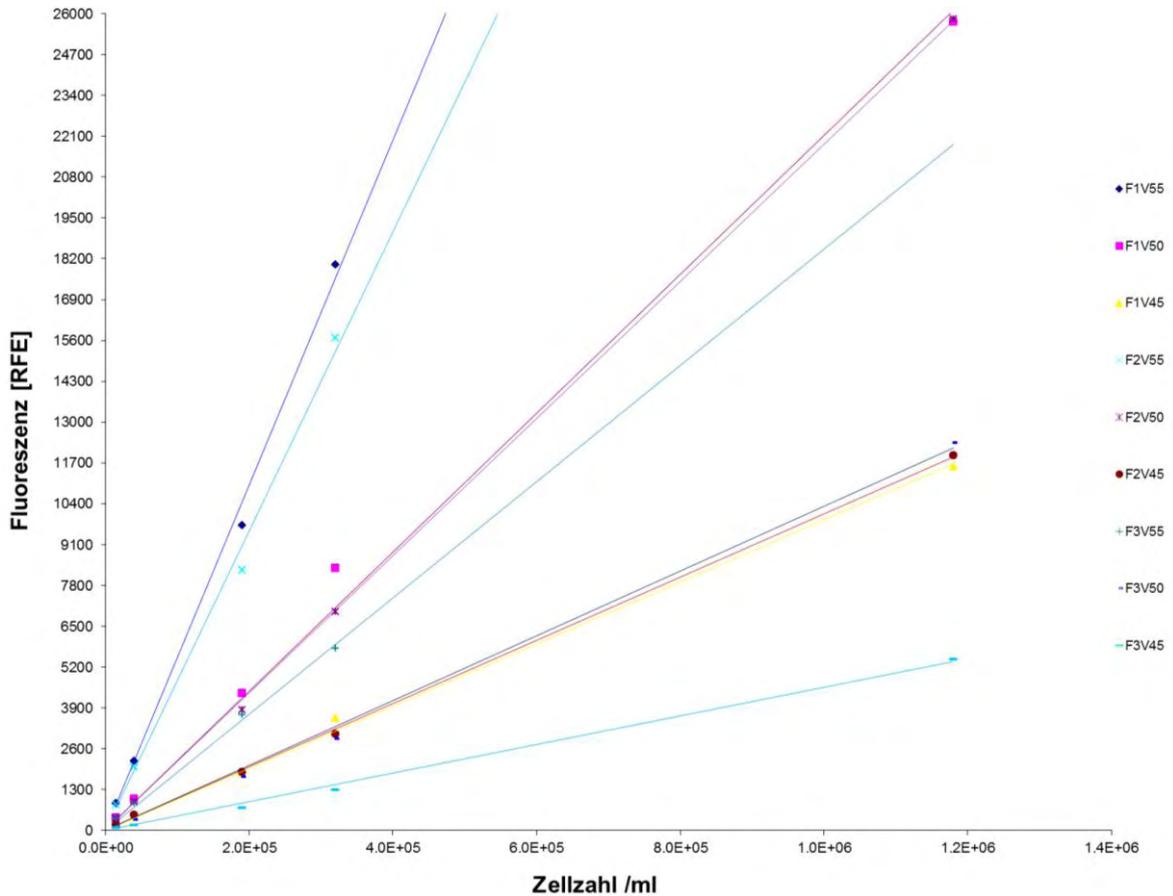


Diagramm 8 Ermittelten Kalibriergeraden über unterschiedlichen Messparametern mit der Mikrotiterplatte Costar 3524

Anhand des Wertebereiches können die Verstärkungen bewertet werden. Es ist von Bedeutung, niedrige Fluoreszenzen am Testbeginn und hohe Fluoreszenzen am Testende genau messen zu können. Bei der Verstärkung 55 überschritten die gemessenen Fluoreszenzen den Messbereich bei einer am Testende zu erwartenden Zelldichte von  $10^6$  Zellen/ml. Das hat zur Folge, dass keine Fluoreszenzen ermittelt werden und der Test nicht korrekt ausgewertet werden kann. Die Verstärkung von 45 misst bei einer Zellzahl von  $\sim 10^3$  Zellen/ml sehr niedrige Fluoreszenzen von rund 100 RFE. Der resultierende Messfehler macht diese Messung zu ungenau. Am Optimalsten hat sich die Verstärkung 50 erwiesen, hierbei wurde sowohl im unteren Bereich bei 150 RFE und im oberen Bereich bei 30000 RFE gute Ergebnisse erzielt. Deshalb erfolgen alle Fluoreszenzmessungen der Versuche bei einer Verstärkung von 50. Für einen Vergleich der Filterkombinationen werden alle Fluoreszenzmessungen mit den drei unterschiedlichen Filterkombinationen durchgeführt.

### 3.1.1 Ergebnisse der laborinternen Validierung auf Mikrotiterplatte mit der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol

Zuerst wurden die Gültigkeitskriterien des Testverfahrens (siehe Tabelle 19) überprüft.

Tabelle 19 Überprüfung der Gültigkeitskriterien der Testverfahren

<b>Kriterium</b>	<b>C-nom-F1</b>	<b>C-nom-F2</b>	<b>C-nom-F3</b>	<b>C-gem-F1</b>	<b>C-gem-F2</b>	<b>C-gem-F3</b>
$\Delta pH < 1,5$	ja	ja	ja	ja	ja	ja
$\mu > 0,0375/h$	nein	nein	nein	ja	ja	ja
Variationskoeffizient $< 7\%$	ja	ja	ja	ja	ja	ja
	<b>OS-nom-F1</b>	<b>OS-nom-F2</b>	<b>OS-nom-F3</b>	<b>OS-gem-F1</b>	<b>OS-gem-F2</b>	<b>OS-gem-F3</b>
$\Delta pH < 1,5$	ja	ja	ja	ja	ja	ja
$\mu > 0,0375/h$	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Variationskoeffizient $< 7\%$	ja	ja	ja	ja	ja	ja

Legende zu Tabelle 19

<b>Mikrotiterplattentyp</b>	<b>Kurzform</b>
Costar 3524	C
Orange Scientific	OS
<b>Berechnungsform</b>	
Nominal	nom
gemessen	gem
Filterkombination 1,2,3	F1, F2, F3

Bei der Überprüfung der Wachstumsraten  $\mu$  der Kontrollen fällt auf, dass bei der nominalen Auswertung der Kontrollen in den Costar 3524-Platten, die Wachstumsrate nicht eingehalten wurde. Ursache hierfür ist der relativ hohe Blindwert dieser Platten von 142 RFE (Mittelwert von  $N = 6$ ;  $SD = 1,37$  RFE). Die gemessene Anfangsfluoreszenz liegt bei  $\sim 268$  RFE (Mittelwert von  $N = 6$ ;  $SD = 6,43$  RFE), somit hat der Blindwert einen Anteil von mehr als 50%. Die Orange Scientific-Platten besitzen einen Blindwert von 84 RFE (Mittelwert von  $N = 6$ ;  $SD = 3,51$  RFE) bei gleicher gemessener Anfangsfluoreszenz. Daraus kann gefolgert werden, dass die Costar-Mikrotiterplatte die Messung bei niedriger Zellzahl durch eine Eigenfluoreszenz beeinflussen kann.

Die Auswertung zeigt, dass die Ergebnisse mit der Mikrotiterplatte der Firma Orange Scientific näher an den im DIN EN ISO- Ringtest ermittelten  $E_rC_{50}$ -Werten und im Toleranzbereich liegen. Die  $E_rC_{50}$ -Werte mit der Costar-Mikrotiterplatte sind niedriger und liegen außerhalb des Toleranzbereichs. Es wird erkennbar, dass die nominal-ermittelten Ergebnisse niedriger als die gemessenen Ergebnisse sind. Die Differenz der  $E_rC_{50}$ -Werte gemessen/nominal sind bei der Mikrotiterplatte Organe Scientific kleiner als bei der Costar-Mikrotiterplatte (siehe Tabelle 20 und Diagramm 9 und Diagramm 10). Beim Vergleich der drei Filterkombinationen liegt der  $E_rC_{50}$ -Wert mit dem Filter 1 am nächsten am  $E_rC_{50}$ -Wert laut DIN 10253.

Tabelle 20 Vergleich der  $E_rC_{50}$ -Werte

MTP Filter- Kombi- nation	$E_rC_{50}$ [mg/l] DIN 10253	$E_rC_{50}$ [mg/l] Orange Scientific gem	$E_rC_{50}$ [mg/l] Orange Scientific- nom	$\Delta E_rC_{50}$ [mg/l] gem/ nom	$E_rC_{50}$ [mg/l] Costar 3524 gem	$E_rC_{50}$ [mg/l] Costar 3524 - nom	$\Delta E_rC_{50}$ [mg/l] gem/ nom
1	2,7	2,681	2,583	0,098	2,413	2,069	0,344
2	2,7	2,568	2,517	0,051	2,405	2,239	0,166
3	2,7	2,492	2,478	0,014	2,356	2,132	0,224
SD [mg/l]	0,2	0,08	0,04	-	0,07	0,025	-

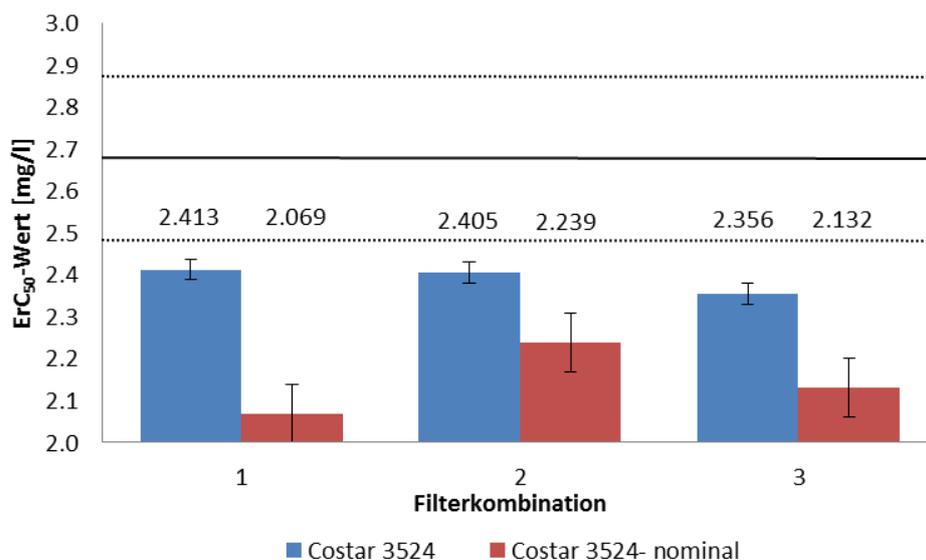


Diagramm 9 Vergleich der Filterkombination und Berechnungswege mit der Mikrotiterplatte Costar 3524

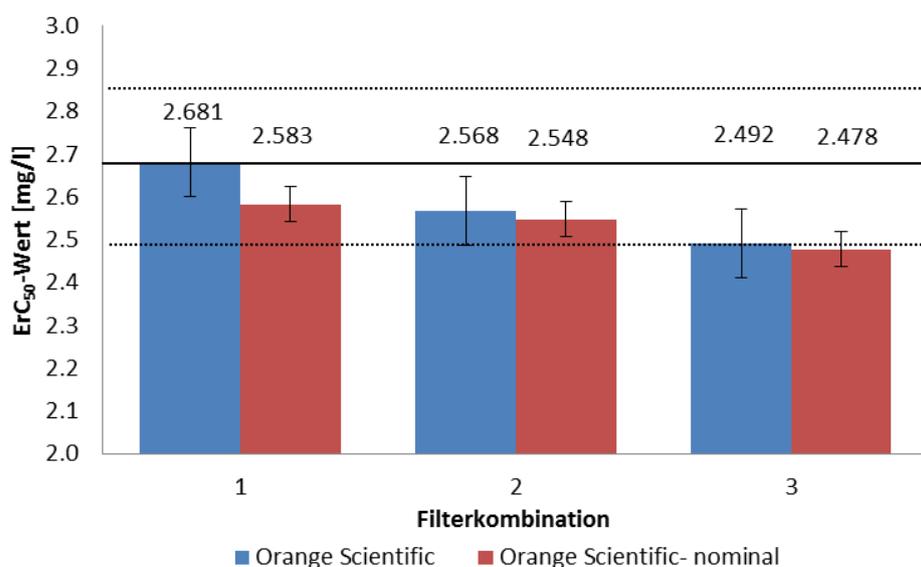


Diagramm 10 Vergleich der Filterkombination und Berechnungswege mit der Mikrotiterplatte Orange Scientific

Legende zu Diagramm 9 und 10

—————	Richtwert aus DIN ISO 10253
.....	Standardabweichung des Richtwertes laut DIN ISO 10253
Fehlerbalken	Standardabweichung

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass mit der Filterkombination 1, die Zellzahlbestimmung zum Zeitpunkt  $t_0$  über die gemessenen Fluoreszenz und mit der Mikrotiterplatte der Firma Orange Scientific die besten Ergebnisse erzielt wurden.

### 3.2 Ergebnisse der Methodvalidierung laborübergreifend – Teilnahme an dem Ringtest des DIN AK 5.3 Marine Biotests

Die vorläufigen Ergebnisse des Ringtests sind in Diagramm 11 dargestellt. Es wurde das Ergebnis der HAW Hamburg und der Mittelwert aus den Ergebnissen der anderen vier Teilnehmer mit dem Richtwert der DIN 10253 verglichen. Der  $E_rC_{50}$ -Wert und die Standardabweichung laut DIN 10253 wurden als durchgezogene Linie für den Richtwert und als gestrichelte Linie für die Standardabweichung dargestellt. Der  $E_rC_{50}$ -Wert der Referenzsubstanz der HAW Hamburg liegt im DIN EN ISO Sollbereich und innerhalb der Standardabweichung des Mittelwertes der anderen vier Ringtestteilnehmern. Der an der

HAW Hamburg erzielte Mittelwert von  $E_rC_{50} = 2,57 \pm 0,03$  mg/l liegt näher an dem DIN EN ISO ermittelten Wert von  $2,7 \pm 0,2$  mg/l als der Mittelwert der anderen vier Ringtestteilnehmer ( $2,32 \pm 0,63$  mg/l). Durch die Teilnahme an der Laborvergleichsuntersuchung und den hierbei erzielten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass der Aufbau des marinen Algentests an der HAW Hamburg erfolgreich war und der Test validiert ist.

Tabelle 21 Ergebnisse der HAW Hamburg bei der DIN-AK-Laborvergleichsuntersuchung mit 3,5-Dichlorphenol auf Mikrotiterplatte

$E_rC_{50}$ [mg/l] HAW	SD [mg/l]	MW $E_rC_{50}$ [mg/l] a. Teilnehmer	SD [mg/l]
2.57	0,03	2,32	0,63

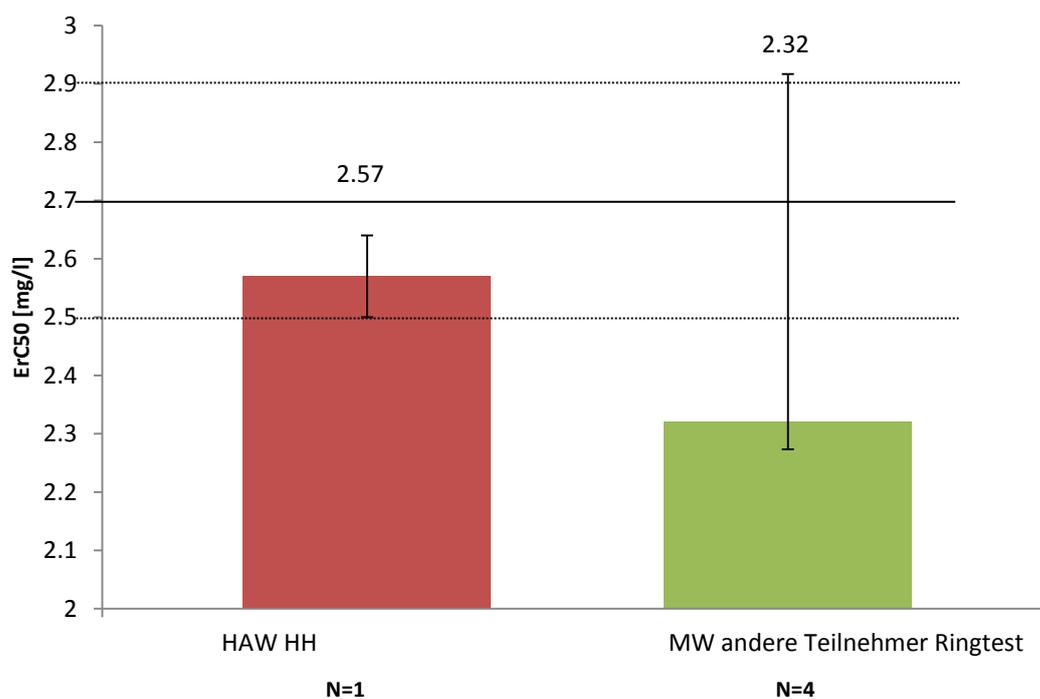


Diagramm 11 Ergebnis aus dem Ringversuch des DIN AK 5.3 Marine Biotests der HAW Hamburg im Vergleich zum Mittelwert aller anderen Teilnehmer. Darstellung der nominalen  $E_rC_{50}$ -Werte.

Legende zu Diagramm 11

_____	Richtwert aus DIN ISO 10253
.....	Standardabweichung des Richtwertes laut DIN ISO 10253
Fehlerbalken	CL 95%

### 3.2.1 Zusammenfassung Validierung des marinen Algentests auf Mikrotiterplatte

Zur Validierung des marinen Algentests wurde die optimalste Filterkombination (Filter 1 mit 430 nm und 670 nm) und Verstärkung (50) in Vorversuchen bestimmt und es wurde an einem DIN AK 5.3 Ringtest teilgenommen. Während des Ringtests wurden parallel die optimalste Zellzahlbestimmung zum Zeitpunkt  $t_0$  (nominal) und die geeignetste Mikrotiterplatte (Orange Scientific) ermittelt.

Durch die erfolgreiche Teilnahme an dem Ringtest des DIN AK 5.3 Marine Biotests mit der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol und der Testdurchführung auf Mikrotiterplatte konnte gezeigt werden, dass die Validierung des Algentests an der HAW Hamburg erfolgreich ist und die verwendeten Messparameter und die Mikrotiterplatte für die AM-Versuche verwendet werden können.

### 3.3 Ergebnisse der Arzneimittelversuche

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der einzelnen Versuche im marinen Algentest (MAT) und im Süßwasseralgentest (FWAT) dargestellt. Es wird gezeigt, ob die Gültigkeitskriterien des Tests eingehalten wurden und die Wachstumskurve dargestellt. Mit dem Programm GraphPad Prism 5.01 wurden die  $E_rC_{50}$ -Werte der Ansätze rechnerisch bestimmt. Zum Vergleich der  $E_rC_{50}$ -Werte im marinen, Brackwasser und limnischen Bereich wurden diese tabellarisch aufgeführt.

### 3.4 Referenztest 3,5-Dichlorphenol

#### 3.4.1 Gültigkeitskriterien

Die Gültigkeitskriterien für den marinen Algentest wurden alle sowie im marinen Bereich als auch im Brackwasserbereich eingehalten. Die Gültigkeitskriterien für den Süßwassertest konnten nicht eingehalten werden (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22 Übersicht: Einhaltung der Gültigkeitskriterien beim Algentest mit 3,5-Dichlorphenol

Kriterium	MAT ASW	MAT ABW	Kriterium	FWAT
$\Delta pH < 1,5$	ja	ja	$\Delta pH < 1$	nein
$\mu > 0,0375/h$	ja	ja	$\mu > 0,058/h$	nein
Variationskoeffizient $< 7\%$	ja	ja	Variationskoeffizient $< 5\%$	nein

### 3.4.2 Darstellung Wachstumskurve

Die Wachstumskurve der Kontrolle für 3,5-DCP im MAT mit ASW, sowie mit ABW ist linear und zeigt, dass sich die Algen während des Versuches im exponentiellen Wachstum befanden (siehe Diagramm 12).

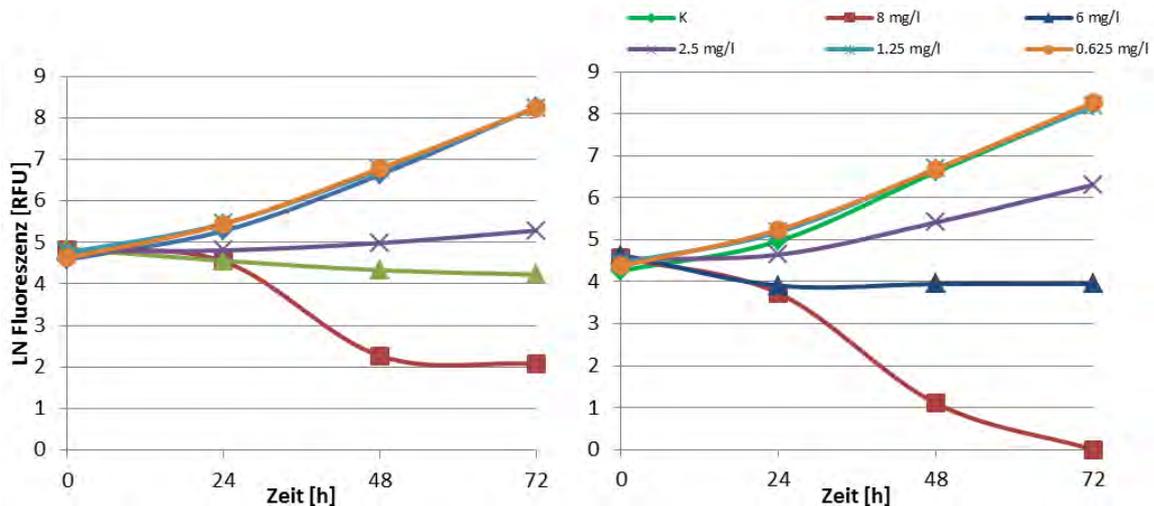


Diagramm 12 Darstellung der Wachstumskurven von 3,5-DCP links im MAT mit ASW und rechts im MAT mit ABW

Ebenfalls wird die Hemmungen des Wachstums der Verdünnungsstufen mit 8 mg/l bis 2,5 mg/l deutlich. Die Verdünnungsstufen mit 1,25 mg/l und mit 0,625 mg/l liegen auf der Geraden der Kontrolle und weisen keine Hemmungen auf.

Die Grünalgen zeigen während der Testphase kein Wachstum. Aufgrund der abnehmenden Fluoreszenz ist sogar auf ein Absterben der Algenzellen zu schließen. Daraufhin wurden mehrere Versuchsaufbauten untersucht, um das Algenwachstum im Süßalgentest zu gewährleisten. Es wurden Algenkulturen aus einem externen ökotoxikologischen Labor und deren Wachstumsmedium verwendet. Auch wurden zwei verschiedene Schüttlergeschwindigkeiten (150 rpm und 250 rpm) und unterschiedliche Mikrotiterplatten (Costar 3524/ Orange Scientific) verwendet. Es konnte während der Testphase jedoch kein Wachstum erzielt werden, obwohl die Vorkulturen alle gut wuchsen. Deshalb könnten bei den folgenden Arzneimittelversuchen keine Testergebnisse im limnischen Algentest ermittelt werden. Die  $E_rC_{50}$ -Werte des Süßwasser-Algentests werden deshalb aus Literatur und Datenbanken entnommen.

### 3.4.3 Ergebnisse

Der  $E_rC_{50}$ -Wert von dem marinen Algentest mit ASW liegt bei  $2,507 \pm 0,04$  mg/l und mit ABW bei  $2,692 \pm 0,06$  mg/l. Sie liegen im Toleranzbereich laut DIN 10253 (siehe Tabelle 23 und Diagramm 13). Damit ist sichergestellt, dass die Algen eine ausreichende Sensibilität aufweisen. Die Algen im marinen Milieu werden stärker von 3,5-Dichlorphenol gehemmt.

Tabelle 23 Übersicht der  $E_rC_{50}$ -Werte 3,5-Dichlorphenol

3,5-Dichlorphenol DIN 10253 $E_rC_{50}$ [mg/l]	SD [mg/l]	3,5-Dichlorphenol MAT ASW $E_rC_{50}$ [mg/l]	SD [mg/l]	3,5-Dichlorphenol MAT ABW $E_rC_{50}$ [mg/l]	SD [mg/l]
2,7	0,2	2,507	0,04	2,692	0,06

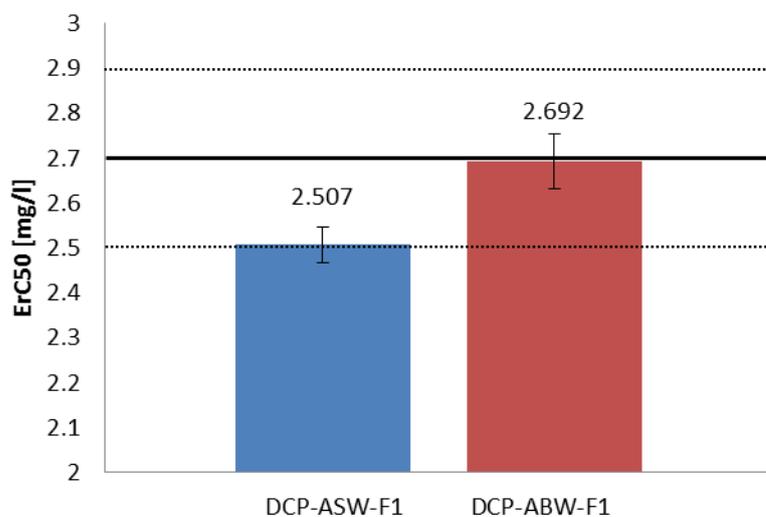


Diagramm 13 Vergleich der  $E_rC_{50}$ -Werte 3,5-Dichlorphenol

Legende zu Diagramm 13

—————	Richtwert aus DIN ISO 10253
.....	Standardabweichung des Richtwertes laut DIN ISO 10253
Fehlerbalken	Standardabweichung des $E_rC_{50}$ -Wertes

### 3.5 Diclofenac

#### 3.5.1 Gültigkeitskriterien

Bei dem Versuchsdurchlauf mit Diclofenac wurden alle Gültigkeitskriterien eingehalten (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24 Übersicht: Einhaltung der Gültigkeitskriterien beim marinen Algentest mit Diclofenac

Kriterium	MAT ASW	MAT ABW
$\Delta pH < 1,5$	ja	ja
$\mu > 0,0375/h$	ja	ja
Variationskoeffizient $< 7\%$	ja	ja

#### 3.5.1.1 Darstellung der Wachstumskurven

Die Wachstumskurve der Kontrolle für Diclofenac im MAT mit ASW, sowie im MAT mit ABW ist linear und zeigt, dass sich die Algen während des Versuches im exponentiellen Wachstum befanden (siehe Diagramm 14). Die Wachstumskurven von Diclofenac in ASW zeigen deutliche Hemmungen bei den Verdünnungsstufen 80 mg/l und 50 mg/l. Die Verdünnungsstufen 25 mg/l - 6,25 mg/l liegen auf der Wachstumsgeraden der Kontrolle und weisen keine Hemmungen auf.

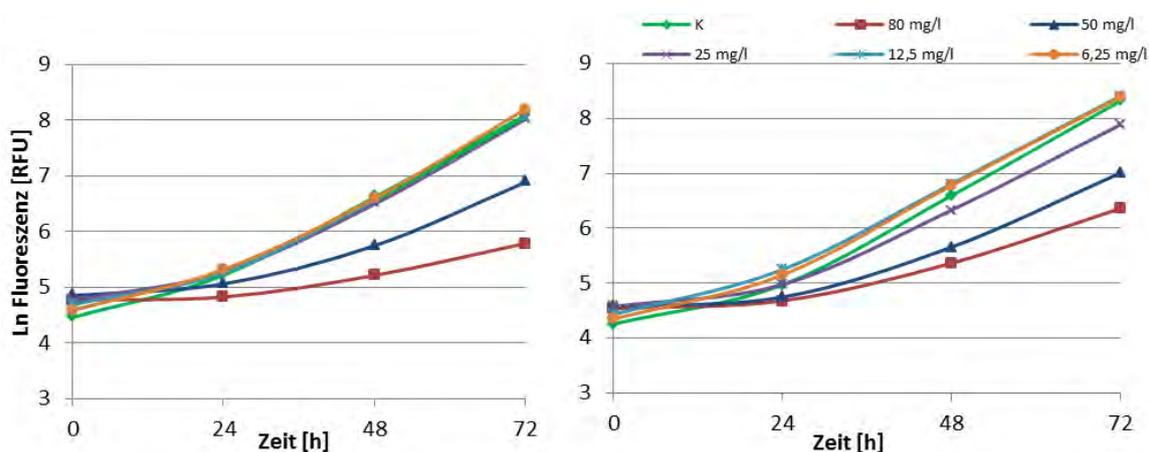


Diagramm 14 Darstellung der Wachstumskurven von Diclofenac links im MAT mit ASW und rechts in MAT mit ABW

Die Wachstumsgeraden von Diclofenac im MAT mit ABW weichen von denen in ASW ab. Hier wird eine Hemmung bei den Verdünnungsstufen von 80 mg/l bis 25 mg/l deutlich.

Eine weitere Auffälligkeit ist, dass die Wachstumsgeraden der Verdünnungen mit 12,5 mg/l und 6,25 mg/l über der Wachstumsgeraden der Kontrolle liegen. Das kann auf mögliche Fördereffekte von Diclofenac hinweisen.

### 3.5.2 Ergebnisse

Die  $E_rC_{50}$ -Werte von Diclofenac im MAT mit ASW, ABW und im Süßwasseralgentest sind in der Tabelle 25 dargestellt. Mit zunehmender Salinität nimmt der  $E_rC_{50}$ -Wert zu: 14,5 bzw. 16,3 mg/l bei 0 PSU; 37,47 mg/l bei 20 PSU und 45,58 mg/l bei 31 PSU. Die limnischen Grünalgen reagieren folglich sensitiver als die marine Diatomae unter Meer- oder Brackwasserbedingungen.

Tabelle 25 Übersicht der Ergebnisse im Versuch Diclofenac.

Diclofenac-MAT ASW $E_rC_{50}$ [mg/l]	SD [mg/l]	Diclofenac-MAT ABW $E_rC_{50}$ [mg/l]	SD [mg/l]	Diclofenac-FWAT $E_rC_{50}$ [mg/l]
45.58	0,07	37.47	0,1	<sup>1)a)</sup> 16,3 (3 d)  <sup>2)a)</sup> 14,5 (4 d)

<sup>1)</sup> SRU 2007

<sup>a)</sup> *Desmodesmus subspicatus*

<sup>2)</sup> Fent et al. 2006

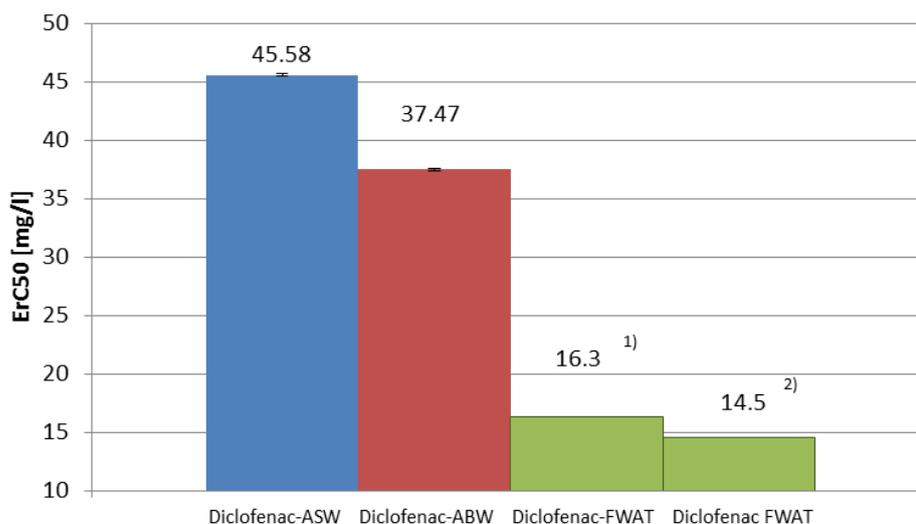


Diagramm 15 Vergleich der  $E_rC_{50}$ -Werte für Diclofenac

<sup>1)</sup> SRU 2007

<sup>2)</sup> Fent et al. 2006

## 3.6 Carbamazepin

### 3.6.1 Gültigkeitskriterien

Der Versuchsdurchlauf mit Carbamazepin hat alle Gültigkeitskriterien eingehalten (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26 Übersicht: Einhaltung der Gültigkeitskriterien beim marinen Algentest mit Carbamazepin

Kriterium	MAT ASW	MAT ABW
$\Delta pH < 1,5$	ja	ja
$\mu > 0,0375/h$	ja	ja
Variationskoeffizient $< 7\%$	ja	ja

#### 3.6.1.1 Darstellung der Wachstumskurven

Bei der Betrachtung der Wachstumskurve (siehe Diagramm 16) wird erkennbar, dass sich die Algen im exponentiellen Wachstum befanden. Die Wachstumskurve von Carbamazepin in ASW zeigt bei der Verdünnungsstufe bei 80 mg/l eine schwache Hemmung.

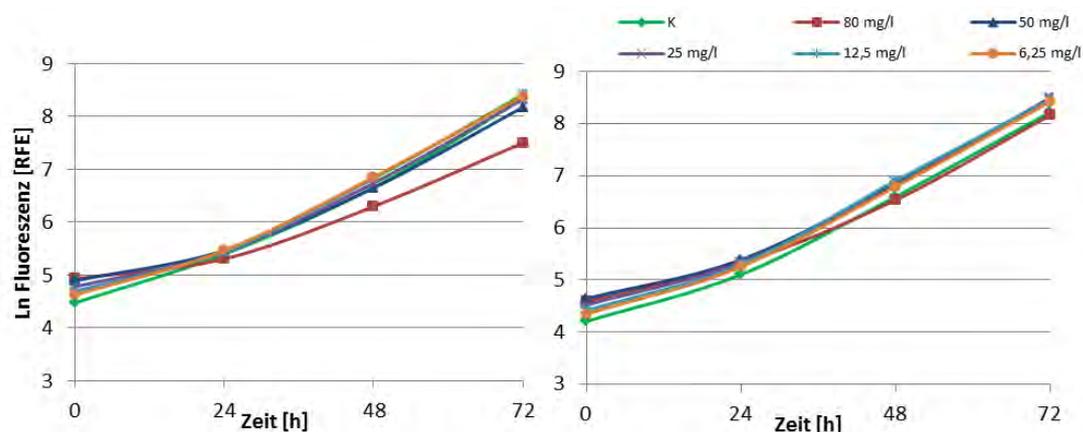


Diagramm 16 Darstellung der Wachstumskurve von Carbamazepin links im MAT mit ASW und rechts im MAT mit ABW

Die Stammlösung von Carbamazepin mit 100 mg/l konnte nicht in dem Verdünnungswasser (ASW und ABW) vollständig gelöst werden und fiel auch während des Versuchs aus. Deshalb sind die Ergebnisse nicht verwendbar, da die genauen Konzentrationen der Stammlösungen nicht bekannt sind. Beim Vergleich der Löslichkeit von Carbamazepin mit dem  $E_rC_{50}$ -Wert wird deutlich, dass die Löslichkeit von 17,7 mg/l zu gering ist, um den  $E_rC_{50}$ -Wert von etwa 80 mg/l im Süßwassertest hervorzurufen. Im marinen Algentest ist die Löslichkeit aufgrund des schon herrschenden Salzgehaltes im Verdünnungswasser noch geringer. Der Wirkstoff Carbamazepin als Salz wurde im Handel nicht angeboten. Würde die polare Form des AM verwendet, könnte das Problem der zu geringen Löslichkeit umgangen werden.

Tabelle 27 Löslichkeit und  $E_rC_{50}$ -Werte von Carbamazepin im limnischen Bereich.

Löslichkeit [mg/l]	FWAT $E_rC_{50}$ [mg/l]
17.7 (25°C)	1)a) 74 (3 d) 2)a) 85 (3d)

<sup>1)</sup> SRU 2007

<sup>2)</sup> BLAC 2003

<sup>a)</sup> *Desmodesmus subspicatus*

### 3.7 Fluoxetin

#### 3.7.1 Gültigkeitskriterien

Der Versuchsdurchlauf mit Fluoxetin hat alle Gültigkeitskriterien eingehalten (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28 Übersicht: Einhaltung der Gültigkeitskriterien beim marinen Algentest mit Fluoxetin

Kriterium	MAT ASW	MAT ABW
$\Delta pH < 1,5$	ja	ja
$\mu > 0,0375/h$	ja	ja
Variationskoeffizient $< 7\%$	ja	ja

##### 3.7.1.1 Darstellung Wachstumskurve

Die Wachstumskurve der Kontrolle für Fluoxetin im MAT mit ASW, sowie im MAT mit ABW ist linear und zeigt, dass sich die Algen während des Versuches im exponentiellen Wachstum befanden (siehe Diagramm 17). Die Wachstumskurven der Verdünnungsstufen von Fluoxetin im MAT mit ASW und ABW weisen keine signifikanten Unterschiede auf.

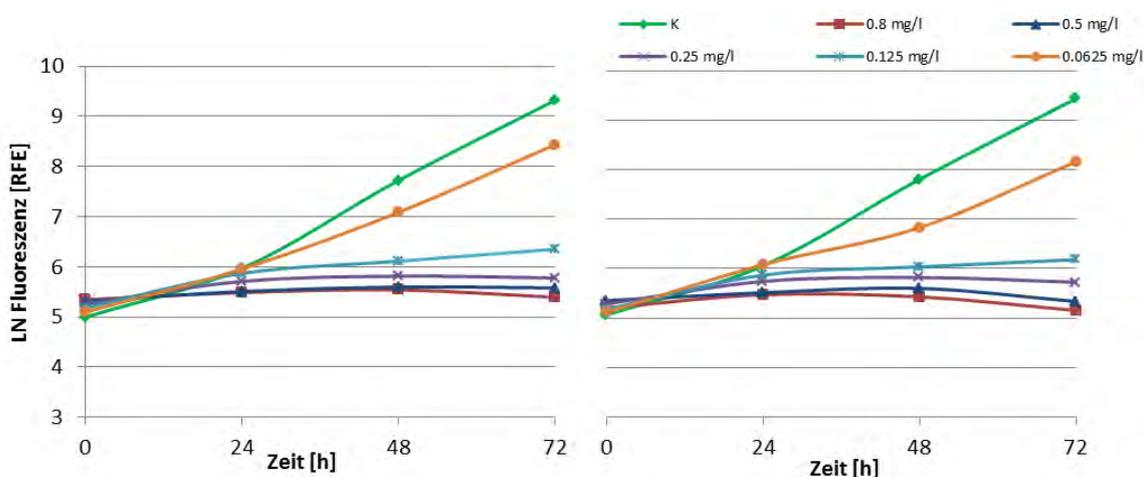


Diagramm 17 Darstellung der Wachstumskurve von Fluoxetin links im MAT mit ASW und rechts im MAT mit ABW

Sie zeigen beide deutliche Hemmungen bei den Verdünnungsstufen mit 0,8 mg/l bis 0,12 mg/l. Die Wachstumsgerade der Verdünnungsstufe mit 0,125 mg/l nähert sich der Wachstumsgerade der Kontrolle und weist geringere Hemmungen auf.

### 3.7.2 Ergebnisse

Die  $E_rC_{50}$ -Werte von Fluoxetin im MAT mit ASW, ABW und im Grünalgentest sind in der Tabelle 29 aufgelistet. Für den  $E_rC_{50}$ -Wert für Fluoxetin aus Fent 2006 wurde keine Angabe über die verwendete Alge gemacht, der  $E_rC_{50}$ -Wert aus der ETOX-Datenbank wurde mit der Grünalge *Desmodesmus subspicatus* durchgeführt. Die beiden Werte unterscheiden sich aber um einen Faktor 10, weshalb davon auszugehen ist, dass unterschiedliche Algen verwendet wurden. Die  $E_rC_{50}$ -Werte von Diclofenac und Carbamazepin im Süßwasseralgentest stammen alle aus Versuchen mit *Desmodesmus subspicatus*. Beim Vergleich wird deshalb nur der  $E_rC_{50}$ -Wert aus der ETOX-Datenbank verwendet.

Tabelle 29 Übersicht Ergebnisse Versuch Fluoxetin

Fluoxetin ASW $E_rC_{50}$ [ $\mu\text{g/l}$ ]	SD [mg/l]	Fluoxetin ABW $E_rC_{50}$ [ $\mu\text{g/l}$ ]	SD [mg/l]	Fluoxetin FWAT $E_rC_{50}$ [ $\mu\text{g/l}$ ]
87,88	0,01	84,58	0,01	<sup>1)a)</sup> 24,0 (3 d) <sup>2)b)</sup> 2,1 (3 d)

<sup>1)</sup> Fent 2006

<sup>a)</sup> verwendete Alge unbekannt

<sup>2)</sup> ETOX

<sup>b)</sup> *Desmodesmus subspicatus*

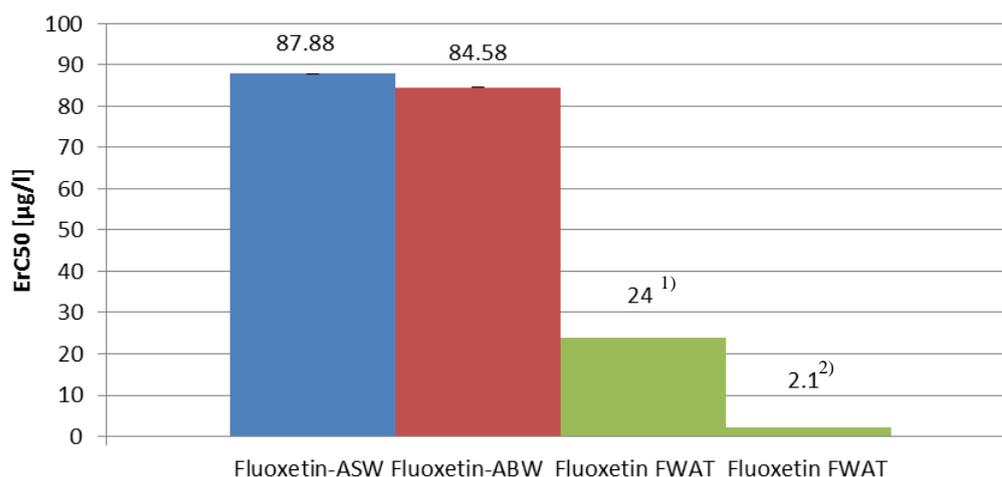


Diagramm 18 Vergleich der  $E_rC_{50}$ -Werte von Fluoxetin

<sup>1)</sup> Fent 2006

<sup>2)</sup> ETOX

Beim Vergleich der Toxizität wird deutlich, dass Fluoxetin im Brackwasserbereich und marinen Bereich eine nahezu gleichstarke Hemmung des Algenwachstums bewirkt ( $84,58 \pm 0,1$  mg/l,  $87,88 \pm 0,1$  mg/l). Die Testergebnisse des Süßwasseralgentests sind erneut deutlich sensitiver ( $2,1$  mg/l) als die des marinen bzw. Brackwassertest.

## 4. Diskussion und Ausblick

### 4.1 Methodenbewertung Algentest

Der Algentest ist ein sensibler Biotest, da er ein chronischer Test und mit ihm folglich die Hemmung der Reproduktion erfasst wird. Er reagiert empfindlich auf Umweltfaktoren, deshalb sind konstante Testbedingungen für die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit sehr wichtig. Am bedeutendsten ist der physiologische Zustand der Algen. Exponentielles Wachstum tritt nur auf, wenn alle Ressourcen ausreichend vorhanden sind. Während des Testdurchlaufes verändern sich aber die Konzentrationen dieser Ressourcen. Die Nährstoffkonzentration nimmt ab und die Bestrahlungsstärke wird durch Beschattungen der wachsenden Algen gemindert. Diese Faktoren beeinflussen auch den Pigmentgehalt der Algen. Bei Lichtmangel weisen sie hohe Chlorophyllgehalte auf, bei Nährstoffmangel niedrige (Kohl et al. 1988). Die „falschen“ Chlorophyllgehalte können Auswirkungen auf das Testergebnis haben. Die Validierung des marinen Algentests hat gezeigt, dass die Wahl der Filterkombination und der Verstärkung Auswirkung auf das Ergebnis haben kann. Auch kann der Test durch die Wahl der Mikrotiterplatte beeinflusst werden.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der Algentests müssen die unterschiedlichen spezifischen Wachstumsraten der beiden Algenarten beachtet werden. Die Wachstumsrate der Grünalge *Desmodesmus subspicatus* ist mit  $e^{0,06t}$  (siehe Formel 9) wesentlich höher als die der marinen Diatomeae *Phaeodactylum tricornutum* mit  $e^{0,05t}$  (siehe Formel 10) und reagiert folglich sensibler. Es werden somit sowohl artspezifische als auch Milieu spezifische Unterschiede mit den Testergebnissen erfasst.

Auch der pH-Wert spielt eine wichtige Rolle. Der verwendete pH-Wert liegt im marinen Algentest, sowie im Süßwasseralgentest bei  $\sim 8$ . Dieser pH-Wert gibt aber nicht die natürlichen Gegebenheiten wieder. Im marinen Bereich herrscht ein leicht basischer pH von 8,1 - 8,3, im limnischen Bereich hauptsächlich ein neutralen Bereich von 7. Ein weiterer Aspekt ist, dass die pH-Wert-Zunahme während des Tests nicht berücksichtigt wird. Es kommt vor, dass sich der pH-Wert um mehr als einen pH-Wert ändert. Diese Änderung kann wiederum Auswirkungen auf die Speziation der AM haben und die Ergebnisse verändern.

Es gibt demnach im Algentest viele Faktoren, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

#### **4.2 Bioverfügbarkeit und Toxizität im Vergleich Süßwasser/ Salzwasser**

Die Ergebnisse der AM-Versuche zeigen deutlich, dass der limnische Test mit der Grünalge sensitiver als der marine Test mit der Diatomae auf Diclofenac und Fluoxetin reagiert. Dies kann mehrere Ursachen haben.

Bei Diclofenac wird eine kontinuierliche Abnahme der  $E_rC_{50}$ -Werte von MAT mit ASW mit 45,58 mg/l über MAT mit ABW mit 37,47 mg/l bis zum FWAT mit ~ 15 mg/l deutlich. Wenn die Ergebnisse vom marinen Algentest ins Verhältnis zur Salinität gesetzt werden, ergeben sich für MAT mit ASW ein Faktor von 1,52 und für MAT mit ABW ein Faktor von 1,87. Das kann ein Indiz für eine Abhängigkeit der Bioverfügbarkeit von der Salinität bei Diclofenac sein. Für den Grünalgentest wurde eine andere Alge, mit einer anderen Zellstruktur und Wachstumsrate verwendet, weshalb hier keine direkte Verbindung mit der Kieselalge geführt werden kann, aber auch hier wird deutlich, dass bei einer fehlenden Salinität die Bioverfügbarkeit weiter steigt. Die Ergebnisse von Fluoxetin zeigen für den marinen Test für ASW und ABW sehr ähnliche  $E_rC_{50}$ -Werte von 87,88  $\mu\text{g/l}$  mit ASW und 84,58  $\mu\text{g/l}$  mit ABW, aber auch hier gibt es eine leichte Tendenz, dass die Bioverfügbarkeit mit abnehmender Salinität steigt. Für den Grünalgentest liegt der  $E_rC_{50}$ -Wert bei 2,1  $\mu\text{g/l}$ , was bedeutet, die Grünalge reagiert viel sensitiver als die Diatomae.

#### **Annahme 1**

Die Grünalge *Desmodesmus subspicatus* hat eine höhere Wachstumsrate als die Diatomae *Phaeodactylum tricornutum*. Die Wachstumsraten wurden experimentell ermittelt und erhalten für die Diatomae und die Grünalge die Wachstumsfunktionen mit  $N(t)$  (Zellzahl zum Zeitpunkt  $t$  [h]) und  $N_0$  (Zellzahl zum Zeitpunkt  $t_0$  mit 10000 Zellen)

$$N(t) = N_0 * e^{0,05t}$$

$$t_{72} = 365.982 \text{ Zellen}$$

Formel 9 Exponentialfunktion von *Phaeodactylum tricornutum*

$$N(t) = N_0 * e^{0,06t}$$

$$t_{72} = 751.886 \text{ Zellen}$$

Formel 10 Exponentialfunktion von *Desmodesmus subspicatus*

Die unterschiedlichen Wachstumsraten zeigen, dass die Grünalge sich häufiger teilt. Beim Vergleich im Zeitraum des Algentests von 72 h entstehen doppelt so viele Grünalgenzellen wie Kieselalgenzellen. Dadurch reagiert sie auf äußere Faktoren, die die Zellfunktion beeinträchtigen können, sensitiver.

## Annahme 2

Diclofenac und Fluoxetin sind im pH-Bereich der Algentests vollständig ionisiert. Sie besitzen positive und negative Ladungen an ihren funktionellen Gruppen. Diclofenac besitzt an der Phenylelessigsäure eine negative Ladung, dazu kommen die elektronegativen Chloratome in der Dichloranilin-Gruppe. Fluoxetin besitzt eine sehr stark elektronegative Trifluoromethylgruppe. Im marinen Algentest befinden sich im Verdünnungswasser viele Kationen und Anionen, die in Wechselwirkung mit den funktionellen Gruppen der AM treten können. Dadurch kann sich das Gleichgewicht in Richtung der undissoziierten Form verlagern und es kommt zur Aussalzung von einem Teil der AM. Im limnischen Bereich dagegen befinden sich weitaus weniger Kationen und Anionen in dem Verdünnungswasser. Das bedeutet, die AM können hier fast vollständig in Wechselwirkung mit der positiv geladenen Zellwand der Alge treten. Die polaren AM können dann über *Ion-trapping* in die Zelle gelangen, sich dort anreichern und die Zellfunktionen beeinträchtigen.

Das würde bedeuten, dass im marinen Bereich der Fokus auf die benthische Lebensgemeinschaft gelegt werden muss. Die AM fallen aus und reichern sich im Sediment an (vgl. Floeter 2006). Die benthischen Organismen sind folglich höheren Konzentrationen an AM ausgesetzt als die im Pelagial lebenden Organismen. Das Augenmerk sollte bei der Risikobewertung von AM in marinen Ökosystem auf das Sediment gelegt werden, insbesondere für AMs, die persistent oder ihre Metabolite bioaktiv sind.

## Literaturverzeichnis

- Aktories, K. Förstermann, Hofmann, Starke, 2009. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie,. 10., überarbeitete Auflage. Urban & Fischer Verlag
- Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe (ARGE ELBE), 2003. Sonderbericht. Arzneistoffe in Elbe und Saale
- Bergmann, A., Fohrmann, R., Weber, F.A. IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser Beratungs- und Entwicklungsgesellschaft mbH. Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln, Hrsg. Umweltbundesamt
- Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC) Arzneimittel in der Umwelt Auswertung der Untersuchungsergebnisse. Hrsg. Freie und Hansestadt Hamburg
- Campbell. N.A., Reece, J.B., 2009. Biologie, 8., aktualisierte Auflage. Pearson Studium
- Cox, E.J. ,2011. Morphology, Cell wall, Cytology, ultrastructure and morphogenetic studies. Overview and Specific Observations. The Diatom world, DOI 10.1007/978-94-007-1327-7\_2
- Cunningham, V.L. ,2004. Special characteristics of pharmaceuticals related to environmental fate. p. 23-34. In K. Kümmerer (ed.) Pharmaceuticals in the environment; Sources, fate, effects, and risks. 2nd ed. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Curry, S., Whelpton, R., 2011. Drug Disposition and Pharmacokinetics: From Principles to Applications. John Wiley & Sons, Ltd
- Cypionka H., 2010. Grundlagen der Mikrobiologie. 4. Auflage. Springer Verlag, Heidelberg
- Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen (SRU), 2004. Meeresumweltschutz für Nord- und Ostsee. Sondergutachten. Berlin
- DIN EN ISO 10253:2006: Wasserbeschaffenheit- Wachstumshemmtest mit marinen Algen *Skeletonema costatum* und *Phaeodactylum triconutum*, Deutsche Fassung. Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN, Beuth Verlag,2006

DIN EN ISO 8692:2004: Wasserbeschaffenheit- Süßwasseralgen-Wachstumshemmtest mit einzelligen Grünalgen. Deutsche Fassung. Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN, Beuth Verlag, 2004

Environment Canada, 2009. Ecological State of the Science Report on Decabromodiphenyl Ether (decaBDE). <http://www.ec.gc.ca/lcpecepa/default.asp?lang=En&n=B901A9EB&offset=3&toc=show>.

Escher, B., 2001. Molecular Mechanisms in Aquatic Ecotoxicology: Specific and Non-specific Membrane Toxicity. Environmental Organic Chemistry Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zürich and Environmental Microbiology and Molecular Ecotoxicology Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology (EAWAG)

Europäische Kommission, 2012. Pressemitteilung. Umweltschutz und Wasser: Vorschlag für eine Reduzierung der Gefahren von Gewässerverunreinigung, Brüssel

European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC), 2001. Risk Assessment in Marine Environments, Technical Report No. 82. Hrsg. ECETOC, Belgien

European Medicines Agency (2006). Guideline on the environmental risk assessment of medical products for human use. Doc.Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00 corr 1\*

Fent, K., 2003. Ökotoxikologie. Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York,

Fent, K, Weston, A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Elsevier B.V.

Floeter, C., 2006. Entwicklung von ökotoxikologischen Instrumenten und ihre rechtliche Implementierung zur marinen ökologischen Risikobewertung von Chemikalien, Pestiziden und Baggergut. Shaker Verlag, Aachen

Förstner, U, 2004. Umweltschutztechnik, 6. Auflage. Springer Verlag, Berlin

Fott, B., 1971. Algenkunde, 2. Auflage. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Fritsch, B., 2000. Dissertation. Der Einfluss von nahrungsbedingten Faktoren auf das Resorptionsverhalten von Chinin am Beispiel von Pektinderivaten und Gallensalzmizellen.

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

Gerlach, S. ,1994. Marine Systeme, spezielle Ökologie. Springer Verlag, Berlin Heidelberg

Helsinki Commission (HELCOM), 2010. Baltic Sea Environment Proceedings No. 8 7, the  
Baltic Marine Environment. Helsinki: Helsinki Commission

Herdegen, T., 2010. Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie, 2. aktualisierte Auflage.  
Thieme Verlag, Stuttgart, 2010.

Hock, B., Elstner, E.F. 1984. Pflanzentoxikologie. Der Einfluss von Schadstoffen und  
Schadwirkungen auf Pflanzen. Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich

Hofmann, T., Baumann, T., Bundschuh, T., v.d. Kammer, F., Leis, A., Schmitt, D., Schä-  
fer, T., Thieme, J., Totsche, K-U., Zänker, H., 2003. Aquatische Kolloide I: Eine Über-  
sichtarbeit zur Definition, zu Systemen und zur Relevanz. HRSG. Grundwasser- Zeitschrift  
der Fachsektion Hydrogeologie 4/2003

Informationssystem Ökotoxikologie und Umweltqualitätsziele (ETOX), Umweltbundes-  
amt, Datenbank, <http://webetox.uba.de/webETOX>

Kohl, J-G, Nicklisch, A., 1988. Ökophysiologie der Algen. Wachstum und Ressourcennut-  
zung. Akademie-Verlag, Berlin

Kümmerer, K, 2007. Sustainable from the very beginning: rational design of molecules by  
life cycle engineering as an important approach for green pharmacy and green chemistry.  
The Royal Society of Chemistry

Kümmerer, K, 2008. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Elsevier  
Ltd

Kümmerer, K, 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use  
– present knowledge and future challenges. Elsevier Ltd

Küster, Thiel, 2003. Rechentafeln für die Chemische Analytik, 105. Auflage. deGruyter,  
Berlin, New York

Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV), 2007. Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt - Literaturstudie. Fachbericht 2. ISSN: 1864-3930 LANUV-Fachberichte

Leung, K., Morritt, D., Wheeler, J., Whitehouse, Sorokin, N., Toy, R., Holt, M., Crane, M. (2001) Can Saltwater Toxicity be Predicted from Freshwater Data? Marine Pollution Bulletin PII: S0025-326X(01)00135-7

Lewin, L.C., Lewin R.A., Philpott, D.E., 1958. Observations on Phaeodactylum tricoratum. J. Gen. Microbiol. 1958, 18

Lüllmann,, H., Hein, L., Mohr, K, 2010. Pharmakologie und Toxikologie. Thieme Verlag, Stuttgart

Mersmann, P., 2003. Dissertation. Transport- und Sorptionsverhalten der Arzneimittelwirkstoffe Carbamazepin, Clofibrinsäure, Diclofenac, Ibuprofen und Propyphenazon in der wassergesättigten und ungesättigten Zone. Technische Universität Berlin

Metals environmental risk assessment guidance (MERAG) 2007. Fact sheet 04. Marine risk assessment: Use of freshwater data for the derivation of ecotoxicity thresholds for marine species. HRSRG. The International Council on Mining and Metals (ICMM)

Mortimer, C. E., 2006. Chemie. Das Basiswissen der Chemie, 9 Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Müller, K.; Lohs, K., 1987. Toxikologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Nentwig, G., 2004. Another Example of Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates: Fluoxetine and Ciprofloxacin, Reprint from Kümmerer, K. (ed.) (2004): Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks. 2ndEdition, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Purves, W.K., Sadava, D, Orians, G.H., Heller, H.C., 2006. Biologie. 7. Auflage. Spektrum akademischer Verlag, München

- Rendal, C., Kresten, K.O., Trapp, S., 2011. Optimal choice of pH for toxicity and bioaccumulation studies of ionizing organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 30, No. 11, pp. 2395–2406, 2011
- Robert, M.H., Newman, M.C., Hale, R.C., 2002. Overview of ecological risk assessment in coastal and estuarine environments. Lewis Publishers, Boca Raton, London, New York, Washington D.C.
- Round, F.E., 1975. *Biologie der Algen*. 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Rudolph, R., Boje, R. (1986). *Ökotoxikologie. Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz*. Ecomed, München
- Sachverständigenrat für Umweltfragen (SRU), 2007. *Arzneimittel in der Umwelt. Stellungnahme*. ISSN 1612-2968
- Schwoerbel, J., 2010. *Einführung in die Limnologie*, 9. Auflage. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg
- Sommer, U., 2005. *Biologische Meereskunde*, 2. Auflage. Springer -Verlag, Berlin, Heidelberg
- Technical Guidance Document on Risk Assessment Part II 2003, European Communities, Printed in Italy
- Tesson, B., Genet, M. J., Fernandez, V., Degand, S., Rouxhet, P. G., Martin-Jézéquel, V. 2009. Surface Chemical Composition of Diatoms. *ChemBioChem* 2009, DOI: 10.1002/cbic.200800811
- Trapp, S., 2004. Plant Uptake and Transport Models for Neutral and Ionic Chemicals. *ESPR – Environ Sci & Pollut Res* 11 (1) 33 – 39 (2004)
- Van Wezel A. P. & Opperhuizen A. (1995): Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: Residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens. *Critical Reviews in Toxicology* 25 (3): 255-279.

Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung, die die Richtlinie 70/524/EWG über Zusatzstoffe in der Tierernährung, Brüssel 2006

Weiler, E., Nover, L., (2008). Allgemeine und molekulare Botanik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Wheeler, J., Sorokin, N., Leung, K., Morrill, D., Crane, M., Whitehouse, P., Cole, S., Mitchell, R., Holmes, D., Rogers, H.R., Karman, C. (2001). Marine risk assessment and ecosystem dynamics: comparison of marine and freshwater data and test methods. Report No.: CO 4972

### **Diagrammverzeichnis**

Diagramm 1 Das Verhältnis zwischen BAF, BCF und BMF für hohe und niedrige trophische Ebenen, vorhergesagt über das BAF-QSAR-Modell für hydrophobe, nicht-metabolisierte Substanzen, Environment Canada 2006 .....	26
Diagramm 2 Auswirkung des pH-Wertes auf die Speziation von Carbamazepin .....	47
Diagramm 3 Auswirkung des pH-Wertes auf die Speziation von Diclofenac .....	48
Diagramm 4 Auswirkung des pH-Wertes auf die Speziation von Fluoxetin .....	50
Diagramm 5 Kalibriergerade für marinen Algentest mit der Filterkombination 1 und der Verstärkung 50 .....	54
Diagramm 6 Kalibriergerade für den limnischen Algentest mit der Filterkombination 1 und der Verstärkung 50 .....	54
Diagramm 7 Wachstumskurven, exemplarische Darstellung des exponentiellen Wachstums .....	55
Diagramm 8 Ermittelten Kalibriergeraden über unterschiedlichen Messparametern mit der Mikrotiterplatte Costar 3524 .....	64
Diagramm 9 Vergleich der Filterkombination und Berechnungswege mit der Mikrotiterplatte Costar 3524 .....	66

Diagramm 10 Vergleich der Filterkombination und Berechnungswege mit der Mikrotiterplatte Orange Scientific.....	67
Diagramm 11 Ergebnis aus dem Ringversuch des DIN AK 5.3 Marine Biotests der HAW Hamburg im Vergleich zum Mittelwert aller anderen Teilnehmer. Darstellung der nominalen $E_rC_{50}$ -Werte.....	68
Diagramm 12 Darstellung der Wachstumskurven von 3,5-DCP links im MAT mit ASW und rechts im MAT mit ABW.....	70
Diagramm 13 Vergleich der $E_rC_{50}$ -Werte 3,5-Dichlorphenol.....	71
Diagramm 14 Darstellung der Wachstumskurven von Diclofenac links im MAT mit ASW und rechts in MAT mit ABW.....	72
Diagramm 15 Vergleich der $E_rC_{50}$ -Werte für Diclofenac.....	74
Diagramm 16 Darstellung der Wachstumskurve von Carbamazepin links im MAT mit ASW und rechts im MAT mit ABW.....	75
Diagramm 17 Darstellung der Wachstumskurve von Fluoxetin links im MAT mit ASW und rechts im MAT mit ABW.....	76
Diagramm 18 Vergleich der $E_rC_{50}$ -Werte von Fluoxetin.....	77

### **Formelverzeichnis**

Formel 1 Gleichgewichtskonstante.....	21
Formel 2 Henderson-Hasselbalch-Gleichung,.....	22
Formel 3 Dissoziationskonstante für saure Verbindungen.....	22
Formel 4 Dissoziationskonstante für basische Verbindungen.....	22
Formel 5 Anteil neutraler Fraktion $f_n$ berechnet über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung; $i = 1$ für Säuren und $i = -1$ für Basen.....	23
Formel 6 1-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten.....	25

Formel 7 Berechnung der Wachstumsrate .....	56
Formel 8 Berechnung der prozentualen Hemmung.....	56
Formel 9 Exponentialfunktion von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> .....	81
Formel 10 Exponentialfunktion von <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	81

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Ausschnitt Verkaufsmengen Humanpharmaka (UBA 2011) .....	10
Tabelle 2 Ausschnitt Verkaufsmengen Veterinärpharmaka (UBA 2011).....	11
Tabelle 3 Vergleich der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Salz-und Süßwasser (nach Wheeler et al. 2001, Floeter 2006) .....	27
Tabelle 4 Funktionelle Gruppen der Zellwand von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> als mögliche Bindungsstellen für AM (nach Rouxhet et al. 2009).....	35
Tabelle 5 Transportmechanismen der Biomembran (nach Weiler et al. 2008).....	37
Tabelle 6 Übersicht der Ergebnisse Recherche .....	41
Tabelle 7 Übersicht der physikalisch-chemische Eigenschaften von Carbamazepin, Diclofenac und Fluoxetin .....	45
Tabelle 8 Geräteliste mit Gerätebezeichnung und Herstellerangabe.....	52
Tabelle 9 Messparameter TECAN Infinite 200 Pro für Algentest .....	53
Tabelle 10 Gültigkeitskriterien für den limnischen (nach DIN 8692) und den marinen Algentest (DIN 10253) .....	54
Tabelle 11 Filterkombinationen und Verstärkungen für die Voruntersuchung.....	58
Tabelle 12 Pipettierschema für den Referenztest .....	59
Tabelle 13 Pipettierschema 3,5-Dichlorphenol MAT .....	61
Tabelle 14 Pipettierschema 3,5-DCP FWAT .....	62

Tabelle 15 Pipettierschema Diclofenac .....	62
Tabelle 16 Pipettierschema Carbamazepin.....	62
Tabelle 17 Pipettierschema Fluoxetin .....	62
Tabelle 18 Ermittelten Geradenfunktionen der unterschiedlichen Filterkombinationen ....	63
Tabelle 19 Überprüfung der Gültigkeitskriterien der Testverfahren.....	65
Tabelle 20 Vergleich der $E_rC_{50}$ -Werte.....	66
Tabelle 21 Ergebnisse der HAW Hamburg bei der DIN-AK-Laborvergleichsuntersuchung mit 3,5-Dichlorphenol auf Mikrotiterplatte .....	68
Tabelle 22 Übersicht: Einhaltung der Gültigkeitskriterien beim Algentest mit 3,5-Dichlorphenol .....	69
Tabelle 23 Übersicht der $E_rC_{50}$ -Werte 3,5-Dichlorphenol .....	71
Tabelle 24 Übersicht: Einhaltung der Gültigkeitskriterien beim marinen Algentest mit Diclofenac.....	72
Tabelle 25 Übersicht der Ergebnisse im Versuch Diclofenac.....	73
Tabelle 26 Übersicht: Einhaltung der Gültigkeitskriterien beim marinen Algentest mit Carbamazepin .....	74
Tabelle 27 Löslichkeit und $E_rC_{50}$ -Werte von Carbamazepin im limnischen Bereich. ....	75
Tabelle 28 Übersicht: Einhaltung der Gültigkeitskriterien beim marinen Algentest mit Fluoxetin.....	76
Tabelle 29 Übersicht Ergebnisse Versuch Fluoxetin .....	77

### **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Eintrittspfade von Human- und Veterinärpharmaka in die Umwelt, (modifiziert SRU 2007) .....	12
Abbildung 2 Metabolite und Transformationsprodukte, Kümmerer 2008b.....	14

Abbildung 3 pH-abhängige Verteilung eines ionisierbaren Pharmakons ("Ionenfalle-Prinzip") (Lüllmann et al. 2010).....	15
Abbildung 4 Stoffwechselwege von AM im Körper (nach Herdegen 2010).....	17
Abbildung 5 Kompartimente, Molekülspezies, pH und Ladung in und um Pflanzenzellen am Beispiel schwache Base (BOH). (Trapp 2004) .....	24
Abbildung 6 Die drei Morphotypen der <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , l. spindelförmig, r.o. triradial, r.u. oval, Foto: Alessandra De Martino .....	33
Abbildung 7 SiO <sub>2</sub> *aq (Kieselgel), Mortimer 2006.....	33
Abbildung 8 Schematische Darstellung der Zellwand von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> . Schwarze Punkte stellen verkieselte Strukturen dar, grauen Flächen organischen Komponenten (Rouxhet et al. 2009).....	34
Abbildung 9 <i>Desmodesmus subspicatus</i> , The Culture Collection of Algae.....	35
Abbildung 10 Strukturformel Pektin, Fritsch 2000.....	36
Abbildung 11 Das Fluid-Mosaik-Modell biologischer Membranen (Campbell & Reece 2009).....	37
Abbildung 12 Acht Klassen und charakteristische Eigenschaften von Transportproteinen in Biomembranen, Weiler et al. 2008.....	38
Abbildung 13 Mittlere Konzentration in Küstennähe Deutsche Bucht; Mittelwerte 2004 bis 2005; Arzneistoffe 2007. N. Theobald, Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH).....	42
Abbildung 14 Deutsche Bucht offene See Mittelwerte 2004 bis 2005; Arzneistoffe 2007. N. Theobald, Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH) .....	43
Abbildung 15 Akute Toxizität von Pharmazeutika, K. Fent et al., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceutical.....	43