



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

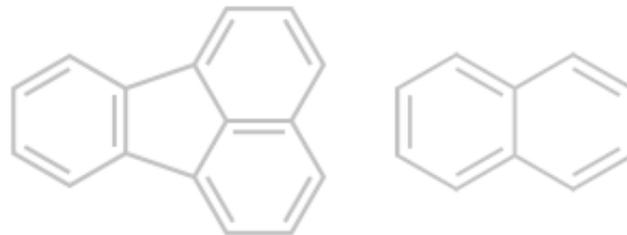
Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Studiengang Umwelttechnik

Effekte von ausgewählten PAKs im marinen Algentest: *Passive Dosing* versus Standard Dosierung mit wässriger Lösung

Bachelorarbeit



Tag der Abgabe:

06.12.2013

Vorgelegt von:

Kuno-Friedrich Konopka, 1995678

Betreuende Prüferin: Prof. Dr. Gesine Witt (HAW Hamburg)

Zweite Prüferin: Prof. Dr. Carolin Floeter (HAW Hamburg)

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	5
I. 1.	Begriffsbestimmungen	6
I. 1. 1.	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	6
I. 1. 2.	Nernstsches Verteilungsgesetz / Phasengleichgewicht	6
I. 1. 3.	Chemische Aktivität	6
I. 1. 4.	Setschenow-, Salzkonstante	6
I. 1. 5.	EC ₅₀ und EC ₁₀ Werte	6
I. 2.	Was ist Passive Dosing ?	7
I. 2. 1.	Kurzzusammenfassung	9
I. 2. 2.	Verteilungskoeffizienten im Passive Dosing	9
I. 2. 3.	Die Beladung beim Passive Dosing	9
I. 2. 3. 1.	Zu hohen Schadstoffauftrag verhindern	11
I. 2. 4.	Die Entladung	11
I. 3.	DIN Norm 10253 mariner Algentest	12
I. 4.	Schadstoffe	12
I. 4. 1.	Fluoranthen	13
I. 4. 1. 1.	Vorkommen / Produktion	13
I. 4. 1. 2.	Wirkung / Toxizität	13
I. 4. 1. 3.	Löslichkeiten	14
I. 4. 1. 4.	Verteilungskoeffizienten	14
I. 4. 1. 5.	Setschenow-, Salzkonstante	14
I. 4. 2.	Naphthalin	15
I. 4. 2. 1.	Vorkommen / Produktion	15
I. 4. 2. 2.	Verwendung	15
I. 4. 2. 3.	Toxizität	16
I. 4. 2. 3. 1.	Akute Toxizität	16
I. 4. 2. 3. 2.	Chronische Toxizität	16
I. 4. 2. 4.	Löslichkeiten	17
I. 4. 2. 5.	Verteilungskoeffizienten	17
I. 4. 2. 6.	Setschenow-, Salzkonstante	17
II.	Material und Methoden	18
II. 1.	Beladung der Silikonringe	18
II. 2.	Konzentrationsberechnungen	18
II. 2. 1.	Allgemein	18
II. 2. 2.	Die Setschenow Gleichung	19
II. 2. 3.	Die Aussalzungskonstante	19
II. 2. 4.	Endkonzentrationen im ASW	20
II. 2. 5.	Messung an der HPLC mit Diodenarray-Detektor	20
II. 2. 5. 1.	Messmethoden	21
II. 2. 5. 2.	Kalibrierung	21
II. 2. 5. 2. 1.	Ansetzen der Methanol Standards	21
II. 2. 5. 2. 2.	Ansetzen der ASW Standards	22
II. 2. 5. 3.	Proben	22
II. 2. 5. 3. 1.	Aus der Beladung	22
II. 2. 5. 3. 2.	Aus den Tests	22
II. 2. 5. 3. 3.	Übersicht aller Proben	22
II. 2. 5. 3. 4.	Silikonringe	24
II. 2. 5. 3. 5.	Methanol Belade-Lösungen	24
II. 2. 5. 4.	Extraktion	25
II. 2. 5. 5.	ASW Lösungen	25
II. 2. 5. 5. 1.	Fluoranthen in ASW	25
II. 2. 5. 5. 2.	Naphthalin in ASW	25
II. 3.	MAT Beschreibung des Testverfahrens	25

II. 3. 1.	Verfahren zur Messung der Zelldichte und Verfahren zur Korrektur der Hintergrundwerte	26
II. 3. 2.	Beurteilung der Toxizität.....	28
II. 3. 3.	Berechnung der EC ₅₀ Werte.....	28
II. 3. 4.	Die stationäre Phase: Silikonringe	28
II. 3. 5.	Verwendete Lösungen	29
II. 3. 6.	Herstellung der Nährstoff-Stammlösungen.....	29
II. 3. 7.	Algenstamm s. I 3 4	29
II. 3. 8.	Testgut.....	29
II. 3. 9.	Testorganismus, Spezies, Herkunft, Stamm-Nr., Art der Kultivierung	30
II. 3. 10.	Gerät zur Herstellung der Kultur und Art der Inkubation.....	30
II. 3. 11.	Temperatur.....	30
II. 3. 12.	pH-Wert der Test- und Kontrollansätze zu Beginn und Ende der Tests	30
II. 3. 13.	Gültigkeitskriterien	31
II. 3. 14.	Übersicht Testaufbau und Pipettierschema MAT	31
II. 4.	Übersicht über die durchgeführten MATs	32
II. 4. 1.	Testbeginn und Dauer	32
II. 4. 2.	Nominale und gemessene Konzentration	33
II. 4. 2. 1.	Standard Dosierung.....	33
II. 4. 2. 2.	Passive Dosing	33
II. 4. 2. 3.	Fluoranthen – Passive Dosing	33
II. 4. 2. 4.	Naphthalin – Passive Dosing	34
II. 4. 2. 5.	Fluoranthen Konzentrationen – Passive Dosing	34
II. 4. 2. 6.	Naphthalin Konzentrationen – Passive Dosing	34
III.	Ergebnisse	35
III. 1.	Ergebnisse der HPLC Messungen	35
III. 2.	Ergebnisse der MATs	35
III. 2. 1.	Ergebnisse Fluoranthen Standard (Testnr.: 7 & 15).....	35
III. 2. 2.	Ergebnisse Naphthalin Standard (Testnr.: 11 & 18).....	35
III. 2. 3.	Fluoranthen Passive Dosing (Testnr.: 8 & 16).....	36
III. 2. 4.	Kurven	37
III. 2. 5.	Ergebnisse Naphthalin Passive Dosing (Testnr.: 12 & 19).....	38
III. 2. 6.	Kurven	39
III. 2. 7.	Ergebnisse DCP (Nr.: 4, 9, 13, 17, 20 & 22).....	40
III. 2. 8.	Kurven	42
III. 3.	Diskussion.....	43
III. 4.	Schlussfolgerung.....	44
III. 5.	Ausblick für weitere Tests:	44
IV.	Danksagungen.....	44
V.	Literaturverzeichnis	45
VI.	Anhang	48
VI. 1.	Anhang 1 Durchführungsvorschriften	49
VI. 1. 1.	SOP Fluoranthen	49
VI. 1. 1. 1.	Wichtige Werte und Funktionen	50
VI. 1. 1. 2.	Wichtige Stoffeigenschaften (Fluoranthen).....	50
VI. 1. 1. 3.	Vorbereitung der Ringe.....	50
VI. 1. 1. 4.	Schadstoffverbrauch im Methanol verhindern	50
VI. 1. 1. 5.	Ansetzen der gesättigten Methanol Lösung	51
VI. 1. 1. 5. 1.	Ansetzen der gesättigten ASW Lösung	51
VI. 1. 1. 6.	Verdünnung	52
VI. 1. 1. 7.	Beladungsdauer	52
VI. 1. 1. 8.	Entnahme und Spülung	53
VI. 1. 1. 9.	Konservierung	53
VI. 1. 1. 10.	HPLC Mesung.....	53
VI. 1. 2.	SOP Naphthalin.....	54

VI. 1. 2. 1.	Wichtige Werte und Funktionen	54
VI. 1. 2. 2.	Wichtige Stoffeigenschaften (Naphthalin)	55
VI. 1. 2. 3.	Vorbereitung der Ringe.....	55
VI. 1. 2. 4.	Schadstoffverbrauch im Methanol verhindern	55
VI. 1. 2. 5.	Ansetzen der gesättigten Methanol Lösung	56
VI. 1. 2. 6.	Ansetzen der gesättigten ASW Lösung	56
VI. 1. 2. 7.	Verdünnung	56
VI. 1. 2. 8.	Beladung	57
VI. 1. 2. 9.	Entnahme und Spülung	57
VI. 1. 2. 10.	Konservierung.....	58
VI. 1. 2. 11.	HPLC Messung.....	58
VI. 2.	Anhang 2 HPLC Kalibrierung Fluoranthen	59
VI. 3.	Anhang 3 HPLC Kalibrierung Naphthalin	60
VI. 4.	Anhang 4 Konz. Berechnungen Fluoranthen.....	61
VI. 5.	Anhang 5 Konz. Berechnungen Naphthalin	62
VI. 6.	Anhang 6 HPLC Messergebnisse Fluoranthen	63
VI. 7.	Anhang 7 HPLC Messergebnisse Naphthalin	64
VI. 8.	Anhang 8 Auswertung Test 3	65
VI. 9.	Anhang 9 Auswertung Test 4	66
VI. 10.	Anhang 10 Auswertung Test 6	67
VI. 11.	Anhang 11 Auswertung Test 7	68
VI. 12.	Anhang 12 Auswertung Test 8	69
VI. 13.	Anhang 13 Auswertung Test 9	70
VI. 14.	Anhang 14 Auswertung Test 11	71
VI. 15.	Anhang 15 Auswertung Test 12	72
VI. 16.	Anhang 16 Auswertung Test 13	73
VI. 17.	Anhang 17 Auswertung Test 15	74
VI. 18.	Anhang 18 Auswertung Test 16	75
VI. 19.	Anhang 19 Auswertung Test 17	76
VI. 20.	Anhang 20 Auswertung Test 18	77
VI. 21.	Anhang 21 Auswertung Test 19	78
VI. 22.	Anhang 22 Auswertung Test 20	79
VI. 23.	Anhang 23 Auswertung Test 21	80
VI. 24.	Anhang 24 Auswertung Test 22	81

I. Einleitung

Viele industrielle Schadstoffe, vor allem aus der Verarbeitung von fossilen Energieträgern sind hydrophobe Kohlenstoffverbindungen. Sie sind direkt in vielen fossilen Energieträgern enthalten und entstehen bei der unvollständigen Verbrennung von organischem Material (Umweltbundesamt, Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe - Umweltschädlich! Giftig! Unvermeidbar? 2012). Dabei gelangen sie täglich in großen Mengen in unsere Umwelt und durch die Anreicherung in der Nahrungskette auch in den menschlichen Organismus (Fent 2013, 186).

Ein großer und bedeutender Teil dieser Stoffe gehört zu der Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs), von denen einige durch ihre Persistenz, Bioakkumulation und Toxizität (PBT-Eigenschaften) ein hohes ökologisches Risiko bergen (Umweltbundesamt, Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe - Umweltschädlich! Giftig! Unvermeidbar? 2012).

PAKs sind aufgrund ihrer PBT-Eigenschaften auch Bestandteil der **List of Chemicals for Priority Action** des OSPAR Abkommens (OSPAR Commission 2009) (OSPAR Convention 2011) sowie dem EU Technical Guidance Document on Risk Assessment (European Chemicals Bureau 2003).

Zur Beurteilung solcher Schadstoffe werden umfassende Risikobewertungen durchgeführt, bei welchen aquatische Biotests ein wichtiger Bestandteil sind. Jedoch offenbaren die PAKs hier sehr ungünstige Eigenschaften, was zu einer falschen Einschätzung der Toxizität führen kann.

So können toxische Effekte von den PAKs auf aquatische Organismen mit dem Verfahren der Standard Dosierung in wässrigen Lösungen aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit ($\log K_{ow}$ zwischen 3,56 und 6,63) (Smith, Dom, et al. 2010) nur sehr schlecht analysiert werden. Durch das hohe Bioakkumulationspotenzial, Adsorption an der Gefäßwand sowie der Verflüchtigung der PAKs treten zudem weitere kaum kontrollierbare Schadstoffverluste in den Testmedien auf. Dies führt dazu, dass selbst bei einmaliger Sättigung in aquatischen Testsystemen keine oder nur geringe Effekte festgestellt werden. Was in der Risikobewertung auch zu Fehleinschätzungen bezüglich der Toxizität dieser Stoffe geführt hat (Könemann 1981).

Einen Ansatz zur Behebung dieser Probleme boten bisher nur kontinuierliche Testsysteme, hier werden die Testorganismen kontinuierlich mit einer definierbaren Schadstoffkonzentration versorgt. Trotz guter Ergebnisse sind diese Tests im direkten Vergleich sehr Chemikalien- und Kostenintensiv (mdl. Mitteilung Floeter 2013).

Einen neuen Ansatz zur Lösung dieser Probleme bietet das **Passive Dosing**. Bei diesem Verfahren kann durch ein Schadstoffreservoir eine gleich bleibende frei gelöste Schadstoffkonzentration im Testmedium eingestellt werden. Effekte der Akkumulation, Adsorption und Verflüchtigung können somit kompensiert werden. Weitere Vorteile des **Passive Dosing** sind: Gute Reproduzierbarkeit, sehr kleine Testvolumina sowie wenig Schadstoffverbrauch und -Exposition.³

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften, wurden nun die Effekte vom **Passive Dosing** mit denen der Standard Dosierung in wässriger Lösung, zweier ausgewählten PAKs, Naphthalin und Fluoranthen, in einem in vitro Wachstumshemmtest mit der marinen Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum*, nach der DIN EN ISO 10253:2006, verglichen.

Dabei befasst sich ein wesentlicher Teil der Arbeit auch mit der Analyse, Verteilung und Berechnung der Schadstoffkonzentrationen in den Testmedien.

I. 1. Begriffsbestimmungen

I. 1. 1. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Die Stoffgruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs) umfasst mehrere Hundert Einzelverbindungen, die durch das Vorhandensein von zwei oder mehr kondensierten Benzolringen gekennzeichnet sind und nur aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen bestehen. Nach einem Vorschlag der amerikanischen Umweltbehörde EPA werden häufig 16 Einzelstoffe der Gruppe der PAK stellvertretend betrachtet. (Hillenbrand 2006) Dazu gehören auch die hier untersuchten Stoffe Fluoranthren und Naphthalin. (EPA kein Jahr)

I. 1. 2. Nernstsches Verteilungsgesetz / Phasengleichgewicht

Nach dem Verteilungsgesetz von Nernst stellt sich zwischen zwei nicht mischbaren Phasen, ein Konzentrationsgleichgewicht von den in den beiden Phasen löslichen Stoffen ein.

$$A_{Phase\ 1} \rightleftharpoons A_{Phase\ 2}$$

Dieses Verhältnis lässt sich mit einem Verteilungskoeffizienten K beschreiben:

$$K = \frac{c(A\ in\ Phase\ 1)}{c(A\ in\ Phase\ 2)}$$

(Riedel 2011)

I. 1. 3. Chemische Aktivität

Die chemische Aktivität (a) beschreibt den Zustand der Verfügbarkeit eines Stoffes in einer Lösung. Sie lässt sich mit einem dimensionslosen Aktivitätskoeffizienten (γ) aus einer Konzentration herleiten.

$$a = c \cdot \gamma$$

Dabei nimmt diese immer einen Wert zwischen 0 und 1 ein.

I. 1. 4. Setschenow-, Salzkonstante

Die Löslichkeit von hydrophoben Stoffen in salinen Medien ist geringer als im normalen Wasser. Daher muss die Salinität bei der Konzentrationsberechnung berücksichtigt werden.

Diese Löslichkeiterniedrigung der hydrophoben Stoffe in salzhaltigem Wasser kann mit Hilfe von empirischen Setschenow- oder Salzkonstanten und der Setschenow Gleichung näherungsweise beschrieben werden. (Klöpffer 2012)

I. 1. 5. EC₅₀ und EC₁₀ Werte

Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) bzw. die mittlere effektive Dosis (ED₅₀), ist in der Toxikologie die Dosis, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird.

Entsprechend gilt für den EC₁₀ Wert, dass 10% des maximalen Effektes beobachtet werden.

Im Fall der Biotests im Rahmen der Bachelorarbeit ist der Effekt die Wachstumshemmung im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

I. 2. Was ist *Passive Dosing*?

Passive Dosing beschreibt das Verfahren eines kontinuierlichen Schadstoffeintrages in die mobile Phase von aquatischen Medien über ein Schadstoffreservoir (stationäre Phase). Ziel dieses Verfahrens ist es in einem aquatischen Biotest eine konstant bleibende, frei gelöste Schadstoffkonzentration zu realisieren und somit Verlusterscheinungen der Schadstoffe zu kompensieren.

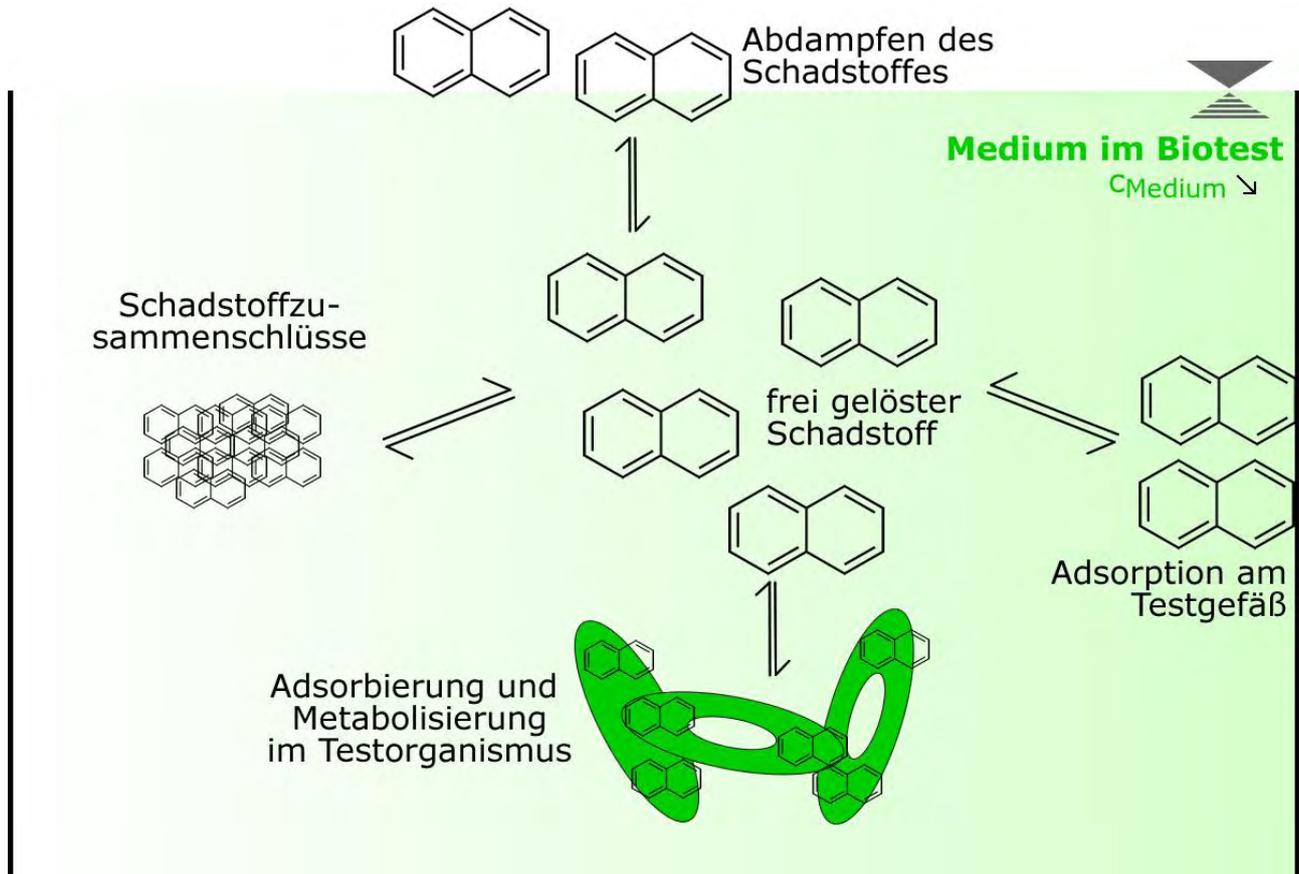


Abbildung 1 Schadstoffverluste im Standard Dosing Test mit wässriger Lösung, mit C_{Medium} = frei gelöster Schadstoff

Diese Verluste treten vor allem bei den im Wasser schwer löslichen, leicht zur Bioakkumulation neigenden und leicht flüchtigen Schadstoffen auf, deren Effekte bei dem Standard Dosier Verfahren in wässriger Lösung bisher nur unzureichend beurteilt werden konnten. Da es durch die ohnehin nur sehr gering einstellbaren Konzentrationen sowie die kontinuierliche Adsorption und Verflüchtigung in vergangenen Tests immer wieder zu Unterschätzungen der Toxizität gekommen ist. (Könemann 1981)

Abbildung 1 verdeutlicht das Problem der Standard Dosierung mit diesen Schadstoffen. Die Adsorption der Schadstoffe führt zu einer Erhöhung der gesamten Schadstoffmenge, von welcher jedoch nur der gelöste Teil zur Aufnahme durch die Testorganismen zur Verfügung steht.

Durch die passive Schadstoffquelle lässt sich nun die freie Konzentration regulieren.

In der Erprobung des *Passive Dosing* Verfahrens zeigte sich, dass dieses eine Möglichkeit bietet die Effekte von schwer in Wasser löslichen, leicht flüchtigen und leicht adsorbierbaren Verbindungen unter definierbaren und reproduzierbaren Bedingungen in aquatischen

Toxizitätstests besser zu analysieren, um somit eine bessere Einschätzungen der Toxizität auf alle aquatischen Lebensräume machen zu können.

Im Gegensatz zur Standard Dosierung mit wässriger Lösung wird beim *Passive Dosing* nicht nur eine definierte Menge Schadstoff, in Form einer wässrigen Lösung mit einer bestimmten Konzentration, hinzugefügt, sondern durch das Verteilungsgleichgewicht des Schadstoffes zwischen der stationären und der mobilen Phase lässt sich eine konstante Konzentration in der mobilen Phase einstellen.

Somit steht zum gesamten Testzeitraum immer dieselbe Menge an gelöstem Schadstoff frei im Medium zur Verfügung.

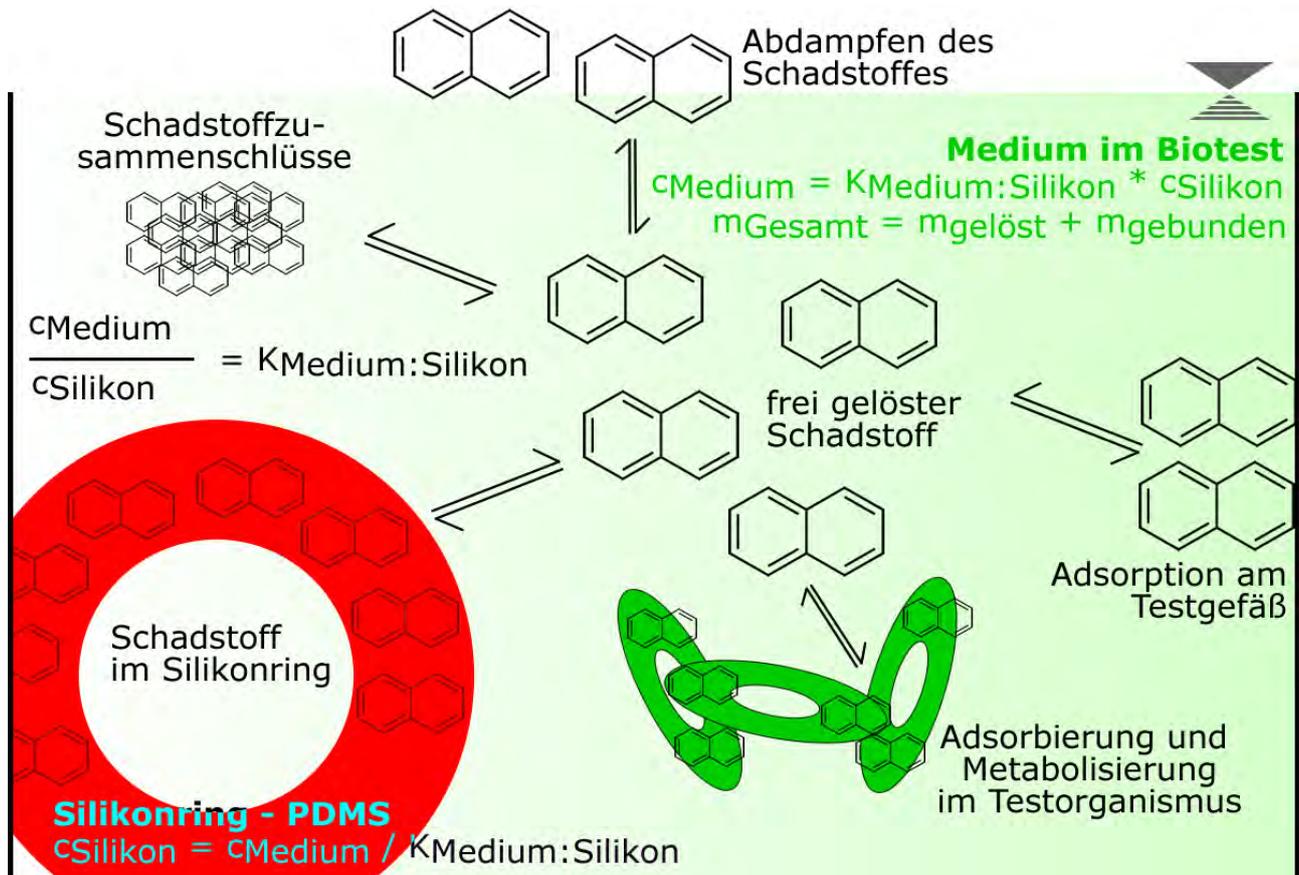


Abbildung 2 Kompensation der Schadstoffverluste durch einen mit Schadstoffen beladenen Silikonring, mit c_{Medium} = Konzentration frei gelöster Schadstoff, c_{Silikon} = Konzentration im Silikon gebundenen Schadstoffes, m_{Gesamt} = gesamte Schadstoffmenge, $m_{\text{gelöst}}$ = frei gelöste Schadstoffmenge, m_{gebunden} = absorbierte Schadstoffmenge, K = Verteilungskoeffizienten.

Der Schadstoffeintrag erfolgt hierbei über einen, mit den Schadstoffen angereicherten, Feststoff auf Silikonbasis. Mit diesem muss es möglich sein, ein konstantes Phasengleichgewicht bei unterschiedlichen Konzentrationen zwischen der stationären und mobilen Phase einzustellen.

Dafür haben sich Polydimethylsiloxane (PDMS) für in vivo Tests (Smith, Dom, et al. 2010, 1) und Silikonringe (Altec Products Limited, Herstellerangaben: British Standard Metric Silicone 'O' Rings, Innendurchmesser: 9,60mm, Außendurchmesser: 14,40mm, Querschnitt: 2,40mm, Material: Silicone, Härte: 70°Shore'A', Bestellnummer: ORS-0096-24) für in vitro Tests (Smith, Oostingh und Meyer 2009, 56) als geeignet herausgestellt.

I. 2. 1. Kurzzusammenfassung**Standard Dosierung**

C_{gesamt} wird eingestellt

C_{gesamt} ist die gesamte Schadstoffkonzentration im Medium

$$C_{\text{gesamt}} = C_{\text{gelöst}} + C_{\text{gebunden}}$$

Passiv Dosing

$C_{\text{gelöst}}$ wird eingestellt

$C_{\text{gelöst}}$ ist der Anteil des Schadstoffes, der im Medium gelöst, und somit potentiell zur Verfügung steht

I. 2. 2. Verteilungskoeffizienten im *Passive Dosing*

Eine wichtige Eigenschaft des Silikonringes ist die Einstellung eines Phasengleichgewichtes zwischen der stationären und mobilen Phase mit definierbaren Verteilungskoeffizienten:

$$K_{\text{stationär:mobil}} = \frac{C_{\text{stationär}}}{C_{\text{mobil}}}; K_{\text{mobil:stationär}} = \frac{C_{\text{mobil}}}{C_{\text{stationär}}} = \frac{1}{K_{\text{stationär:mobil}}} \quad (\text{I. 1})$$

$K_{\text{stationär:mobil}}$ Verteilungskoeffizient Stationäre Phase zur mobilen Phase (I. 2)

$K_{\text{mobil:stationär}}$ Kehrwert von $K_{\text{stationär:mobil}}$ (I. 3)

$C_{\text{stationär}}$ Konzentration in der stationären Phase, hier im Silikon (I. 4)

C_{mobil} Konzentration in der mobilen Phase (I. 5)

Dabei können die verschiedenen Verteilungskoeffizienten empirisch in Verteilungsexperimenten bestimmt werden.

Damit der Verteilungskoeffizient konstant bleibt, darf die Schadstoffkonzentration des Ringes im gesamten Testzeitraum nicht zu stark reduziert werden. Daher muss die Schadstoffmenge im Silikonring entsprechend höher sein als im Test aufgenommen werden kann. Das bedeutet, dass, aufgrund des geringen Volumens der stationären Phase im Vergleich zur mobilen Phase, die Schadstoffkonzentration in der stationären Phase entsprechen hoch sein muss.

Wegen der schlechten Wasserlöslichkeit des Schadstoffes, erhält man hier einen entsprechend hohen Verteilungskoeffizienten:

$$\frac{C_{\text{stationär}} \text{ *ausreichend groß*}}{C_{\text{mobil}} \text{ *sehr klein*}} \rightarrow K_{1:2} \text{ *wird sehr groß*}$$

Den Haupteinfluss hat hierbei die Wasserlöslichkeit des Schadstoffes.

Daraus folgt, dass die Beladung des Silikonringes nur durch ein ausreichend hochkonzentriertes Medium möglich ist. Diese Konzentrationen lassen sich in Lösungsmitteln, wie z.B. Methanol herstellen.

Alle Verteilungskoeffizienten und Löslichkeiten sind den Datenblättern zu entnehmen:
Fluoranthen: I. 4. 1. 3 Löslichkeiten Seite 14; Naphthalin: I. 4. 2. 4 Löslichkeit, Seite 17

I. 2. 3. Die Beladung beim *Passive Dosing*

Aufgrund der im Text genannten Voraussetzungen muss die Beladung durch ein Medium erfolgen, in welchem sich die Schadstoffe sehr gut lösen lassen. Hierzu eignen sich bei den PAKs verschiedene Lösungsmittel.

Als Lösungsmittel für PAKs ist Methanol für das *Passive Dosing* gut geeignet, da es zum einen die PAKs sehr gut löst, den Silikonring nicht aufquellt, sehr gut wasserlöslich ist und die Verteilung sehr schnell abläuft.

Für die Beladung muss die stationäre Phase, z.B. der Silikonring, in einer ausreichend konzentrierten Beladelösung eingelegt werden, bis sich ein Phasengleichgewicht zwischen den beiden Phasen eingestellt hat.

Dafür kann man eine bereits definierte konzentrierte Lösung verwenden, eine bestimmte Menge Schadstoff in einem bestimmten Volumen lösen oder wie in den durchgeführten Versuchen eine gesättigte Lösung des Schadstoffes im Methanol herstellen.

Wichtig ist, dass die Konzentration hoch genug ist, so dass der Ring ausreichend beladen werden kann, um die gewünschten Konzentrationen für den späteren Biotest zu erreichen. Siehe II. 2. Konzentrationsberechnungen, Seite 18

Die Ausgangslösung kann nach eigener Vorgabe zur Einstellung der für den Biotest benötigten Konzentrationen verdünnt werden.

Die Abbildung 3 beschreibt die Beladung eines Silikonringes mit einer ausreichend beladenen Methanol Lösung.

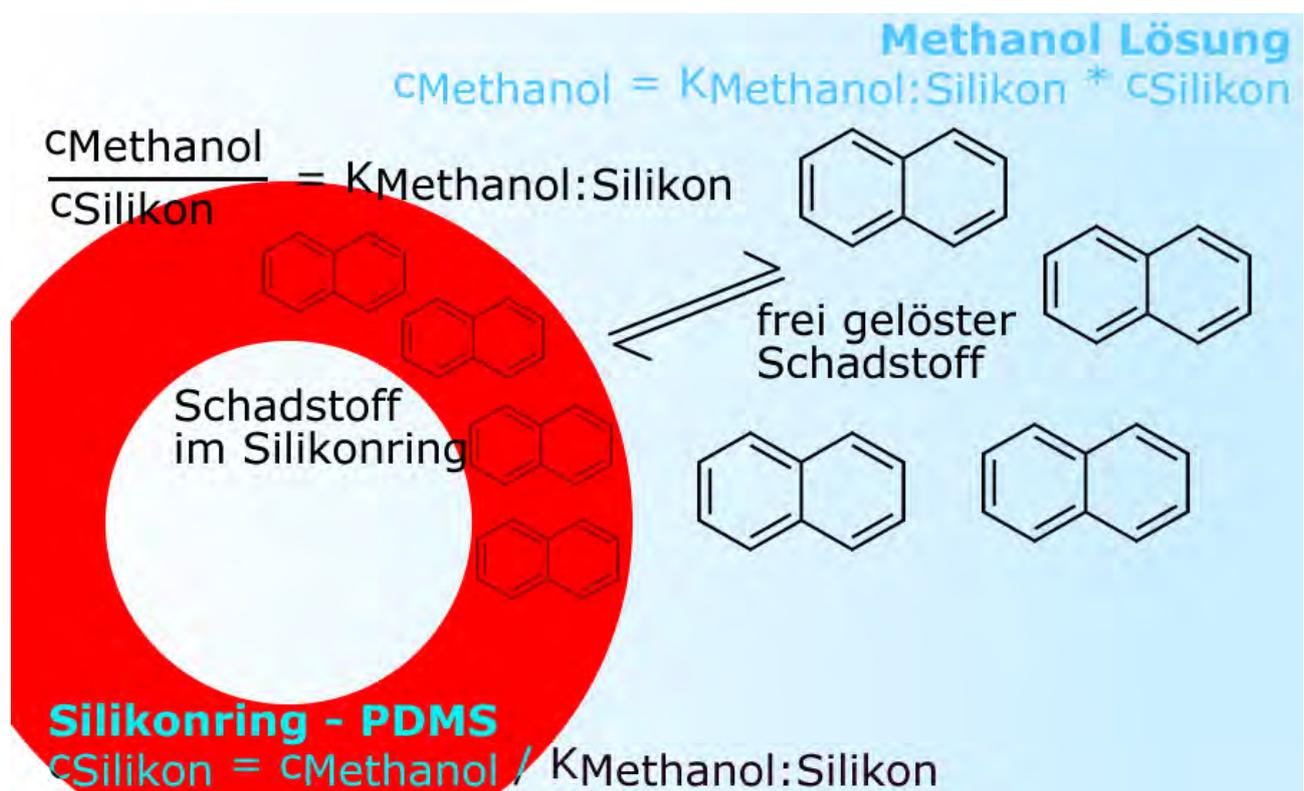


Abbildung 3 Beladevorgang des Silikonringes in einer methanolischen Lösung, mit c_{Medium} = Konzentration frei gelöster Schadstoff, c_{Silikon} = Konzentration im Silikon gebundenen Schadstoffes, K = Verteilungskoeffizienten.

Die Beladung der Ringe folgt nach einer Sättigungsfunktion und kann durch Schütteln erheblich verkürzt werden. Dabei sind die Ringe binnen weniger Stunden vollständig gesättigt (Smith, Oostingh und Meyer 2009, 59, Figure 1).

Falls entsprechende Daten zu den Löslichkeiten und Verteilungskoeffizienten nicht vorliegen, so sollten diese in Verteilungsexperimenten selbst bestimmt werden.

Um Störeinflüsse des Methanols in den Biotests zu vermeiden, müssen die beladenen Ringe ausreichend mit Reinstwasser gespült werden, um das Methanol vollständig zu entfernen (Smith, Oostingh und Meyer 2009, 56, 2.2.2. O-Ring Loading with PAHs).

Weitere Informationen zur Beladung sind den Durchführungsvorschriften (SOPs) aus dem Anhang ab dem Punkt VI. 1. Anhang 1 Durchführungsvorschriften ab Seite 49 zu entnehmen.

I. 2. 3. 1. Zu hohen Schadstoffauftrag verhindern

Da sich bei der Beladung der Silikonringe die Konzentration in der Methanol-Beladelösung nicht ändern soll, darf durch den Ring nicht mehr als 5% des Schadstoffes aus der Beladelösung entzogen werden, damit sich die gewünschte Verteilung einstellt.

Hierfür muss das Verhältnis von Anteil des Schadstoffs in der Methanol Lösung mindestens 95% des Anteils des Schadstoffes im Silikonring sein:

$$0,95 = \frac{c_{\text{MeOH}} \cdot V_{\text{MeOH}}}{c_{\text{MeOH}} \cdot V_{\text{MeOH}} + c_{\text{Silikon}} \cdot V_{\text{Silikon}}}$$

$$c_{\text{MeOH}} \cdot V_{\text{MeOH}} \quad \text{Die Schadstoffmenge im Methanol} \quad (I. 6)$$

$$c_{\text{MeOH}} \cdot V_{\text{MeOH}} + c_{\text{Silikon}} \cdot V_{\text{Silikon}} \quad \text{Die Schadstoffmenge in Methanol und dem Silikonring = Gesamte Schadstoffmenge} \quad (I. 7)$$

$$c_{\text{Methanol}} = c_{\text{MeOH}} \quad \text{Schadstoffkonzentration in der Methanol Lösung} \quad (I. 8)$$

$$V_{\text{MeOH}} \quad \text{Volumen des Methanols} \quad (I. 9)$$

$$c_{\text{Silikon}} \cdot V_{\text{Silikon}} \quad \text{Schadstoffkonzentration im Silikonring} \quad (I. 10)$$

$$V_{\text{Silikon}} \quad \text{Volumen des Silikonrings} \quad (I. 11)$$

Die vollständige Berechnung ist den Durchführungsvorschriften (SOPs) aus dem Anhang ab dem Punkt VI. 1. Anhang 1 Durchführungsvorschriften ab Seite 49 zu entnehmen.

I. 2. 4. Die Entladung

Das Prinzip bei der Freisetzung der Schadstoffe ist identisch mit dem von der Beladung. Zwischen der Konzentration in dem Ring und der im Testmedium stellt sich ein Phasengleichgewicht ein. Da die Löslichkeit des Schadstoffes in dem Testmedium bedeutend kleiner ist, ist von einem entsprechend hohen Verteilungskoeffizienten auszugehen.

Die Entladung erfolgt, wie die Beladung, einer Sättigungsfunktion. Dabei sollte bereits ohne Schütteln nach fünf Stunden ein Gleichgewicht eingestellt sein (Smith, Dom, et al. 2010, 5, Figure 1).

I. 3. DIN Norm 10253 mariner Algentest

Zur Beurteilung der Effekte des *Passive Dosing* im Vergleich mit der Standard Dosierung wurden Toxizitätstests mit der einzelligen Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* in einem modifizierten marinen Algentest (MAT) durchgeführt. Grundlage dieses MAT ist ein chronischer Wachstumshemmtest über einen Testzeitraum von 72 ± 2 Stunden nach der DIN EN ISO 10253:2006. Die Internationale Norm legt das Verfahren zur Bestimmung toxischer Effekte von chemischen Verbindungen und Mischungen im Meerwasser auf das Wachstum einzelliger mariner Algen *Skeletonema costatum* und *Phaeodactylum tricornutum* fest.

Bei dem Testverfahren nach DIN EN ISO 10253 werden Monospezies Algenkulturen über mehrere Generationen in einem definierten Testansatz den Schadstoffen in wässriger Phase exponiert und die Wachstumsrate im Vergleich zu einer negativen Kontrolle bestimmt. Beim *Passive Dosing* werden die mit den verschiedenen Konzentrationen beladenen Silikonringe im Testansatz eingesetzt.

Die Exposition erfolgt je 72 ± 2 Stunden, während alle 24 ± 2 Stunden die Zelldichte gemessen wird.

Neben dem Einsatz von Silikonringen, beruht die Modifikation zur DIN EN ISO 10253 im Einsatz von 24-well Mikrotiterplatten mit einem Volumen von je 2 ml, während in der Norm Erlenmeyerkolben mit je 100 ml vorgeschlagen werden. Dadurch konnten die benötigten Mengen an Lösung und Schadstoffen erheblich reduziert werden. Außerdem zeigte der Test mit den Mikrotiterplatten gute Ergebnisse in vergangenen Ringversuchen Vergleichsuntersuchungen (Peters & Ahlf 2003, weitere Daten unveröffentlicht mdl. Mitteilung Floeter).

I. 4. Schadstoffe

Die wichtigsten Kriterien bei der Wahl der Schadstoffe waren, dass diese ein toxisches Potential für aquatische Lebensformen aufweisen und eine sehr schlechte Wasserlöslichkeit sowie starke Neigung zur Bioakkumulation besitzen. Außerdem sollten sie eine gewisse Umweltrelevanz haben. Durch die zunehmende Verarbeitung aus fossilen Energieträgern rücken die PAKs aufgrund ihrer Ökotoxizität und Persistenz immer weiter in den Fokus. Stellvertretend für die Gruppe der PAKs wurden durch die U.S. Environmental Protection Agency (EPA) 16 Vertreter (EPA kein Jahr) bestimmt. Aus der Gruppe wurden zwei Vertreter für die Biotests ausgewählt. Fluoranthen und Naphthalin. Im Folgenden sind die Eigenschaften dieser Stoffe den beiden Datenblättern Fluoranthen und Naphthalin zu entnehmen.

I. 4. 1. Fluoranthen

Fluoranthen ist ein ungesättigter cyclischer Kohlenwasserstoff. Unter Standardbedingungen ist Fluoranthen ein gelblicher bis grüner, kristalliner Feststoff. Er kommt u.a. im Steinkohlenteer und Rohöl vor und zählt zu den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs).

I. 4. 1. 1. Vorkommen / Produktion

Fluoranthen ist im Schnitt zu 3 % in Steinkohlenteer (Hillenbrand 2006) sowie weiteren fossilen Brennstoffen enthalten. Außerdem ist es ein allgegenwärtiges Produkt unvollständiger Verbrennung von organischem Material. Es kann auch natürlich in Pflanzen gebildet werden. Fluoranthen kann in der Luft, in Oberflächenwasser, Abwasser, Tabakrauch, Speiseöl und gegrillten Lebensmitteln nachgewiesen werden.

In der Atmosphäre liegt es sowohl gasförmig als auch Partikel gebunden vor. Gasförmiges Fluoranthen kann unter UV-Licht abgebaut werden, an Partikel gebundenes Fluoranthen kann Nass- und Trockendeposition in Böden und Gewässer gelangen.

In der Umwelt ist es persistent.
(Umweltbundesamt 2013)

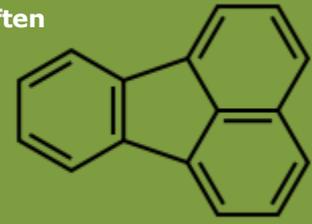
I. 4. 1. 2. Wirkung / Toxizität

Fluoranthen besitzt ein hohes Bioakkumulationspotenzial. In Laborversuchen zeigte es sich Mutagen. Allerdings wurden bisher erst wenige Studien zur Toxizität von Fluoranthen durchgeführt. Weshalb toxische und kanzerogene Effekte noch nicht richtig eingestuft werden können. (Umweltbundesamt 2013) In vielen Fällen ist von einer Gemischtexposition mit anderen PAKs auszugehen. Aufgrund des hohen Bioakkumulationspotenzial sowie der Persistenz wird Fluoranthen als stark umweltgefährdend eingestuft.

Die Einstufung von Gemischen, die diesen Stoff enthalten, ergibt sich aus Anhang 1 der Verordnung (EG) 1272/2008. (Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 2008)

Fluoranthen zählt zu den prioritären Stoffen der Wasserrahmenrichtlinie (Hillenbrand 2006).

Weitere Eigenschaften



Weitere Namen

1,8-(o-Phenylen)
naphthalin,
Benzo[jk]fluoren

CAS-Nummer

206-44-0^[1]

Kurzbeschreibung

gelber kristalliner
Feststoff^[1]

Molare Masse

202,26 g·mol⁻¹^[1]

Aggregatzustand

Fest^[1]

Schmelzpunkt

109-111 °C^[1]

Siedepunkt

348 °C^[1]

Dampfdruck

1,3 Pa (20 °C)^[1]

Verwendetes Produkt

Lieferant

Aldrich

Reinheit

98%

Lagerung

4 °C

Herstellung/MHD

-

Verwendete Mengen

Ca. 4 g

[1] (GESTIS-Stoffdatenbank Fluor. 2013)

I. 4. 1. 3. Löslichkeiten

$C_{\text{Fluoranthen, MeOH, 25}^\circ\text{C}}$	=	0.0651 mol/L \equiv 13,1469 g/L	(Acree 2002)
$C_{\text{Fluoranthen, Wasser, 25}^\circ\text{C}}$	=	0,265 mg/L	(en.Wikipedia.org 2013)
$C_{\text{Fluoranthen, Wasser, 25}^\circ\text{C}}$	=	0.20-0.26 mg/L	(IARC Volume 32)

I. 4. 1. 4. Verteilungskoeffizienten

$K_{\text{Oktanol, Wasser}} (\text{L L}^{-1})$	$\text{Log } K_{\text{Oktanol, Wasser}}$	$K_{\text{MeOH:Si likon}} (\text{L L}^{-1})$	$\text{Log } K_{\text{MeOH:Si likon}}$	$K_{\text{Silikon: Wasser}} (\text{L L}^{-1})$	$\text{Log } K_{\text{Silikon: Wasser}}$	$K_{\text{MeOH:W asser}} (\text{L L}^{-1})$	$\text{Log } K_{\text{MeOH:W asser}}$
158489 ¹	5,2 ¹	3,97 ³	0,60 ³	15986 ³	4,20 ³	63459 ³	4,80 ³
144544 ²	5,16 ²						

I. 4. 1. 5. Setschenow-, Salzkonstante

$$K_{\text{Fluoranthen}}^s = 0,339; \text{ (Jonker und Muijsr 2010)}$$

¹ (GESTIS-Stoffdatenbank Fluo. 2013)

² (HSDB, Fluoranthene 06.12.2013)

³ (Smith, Oostingh und Meyer 2009, Seite 61, Table 2)

I. 4. 2. Naphthalin

Naphthalin ist ein bicyclischer aromatischer Kohlenwasserstoff. Unter Standardbedingungen ist Fluoranthren ein weißer, nach Teer riechender Feststoff. Er kommt u.a. im Steinkohlenteer vor und zählt zu den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs).

Schon bei Raumtemperatur geht der Stoff direkt vom festen in den gasförmigen Zustand über (GISCHEM 2013).

I. 4. 2. 1. Vorkommen / Produktion

Naphthalin ist im Schnitt zu 11 % in der Mittelölfraktion des Steinkohlenteers sowie zu geringeren Teilen in weiteren fossilen Brennstoffen enthalten. Außerdem ist es ein allgegenwärtiges Produkt unvollständiger Verbrennung von organischem Material. Es kann in Spuren auch natürlich durch Pflanzen gebildet werden. Zum Beispiel von Magnolien, bei Hirscharten und Termiten (en.wikipedia.org 2013).

I. 4. 2. 2. Verwendung

Naphthalin wird überwiegend zur Herstellung von Kunststoffen auf der Basis von Phthalsäureanhydrid, von Azofarbstoffen, bestimmter Chemikalien (z. B. 2-Naphthol, Naphthylsulfonsäure) sowie des Biozids 1-Naphthyl-N-methylcarbammat verwendet. Offene Anwendungen mit Freisetzung von Naphthalin in die Luft sind u. a. der Einsatz von Naphthalin als Mottenkugeln, als Insektizid und als Porenbildner bei der Herstellung von Schleifscheiben (Sagunski 2004) (GISCHEM 2013).

Arbeitsplatzgrenzwert (AGW): 0,1 ml/m³ (ppm), 0,5 mg/m³ für die einatembare Fraktion (AGS 2013) (DGUV 2013).

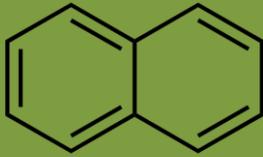
Die Geruchsschwelle liegt bei 0,45 mg/m³ – 1,5 mg/m³ (GISCHEM 2013).

Verschlucken kann zu Gesundheitsschäden führen. Kann die Haut reizen. Eine krebserzeugende Wirkung von Naphthalin wird vermutet (GISCHEM 2013).

Es gibt keine Hinweise auf reproduktionstoxische Effekte bei Einhaltung des hier vorgesehenen AGW: Kategorie Y (AGS, Begründung zu Naphthalin in TRGS 900 2011).

Gefahr der Hautresorption (H)

K3 (EG) Stoffe, die wegen möglicher krebserzeugender Wirkung beim Menschen Anlass zur Besorgnis geben (GISCHEM 2013).

Weitere Eigenschaften	
	
	
Weitere Namen	Naphthalen (IUPAC)
CAS-Nummer	91-20-3 ^[1]
Kurzbeschreibung	Weiß, Flocken, Pulver, Tabletten oder Kugeln ^[1]
Molare Masse	128,17 g·mol ⁻¹ ^[1]
Aggregatzustand	Fest ^[1]
Schmelzpunkt	80,3 °C ^[1]
Siedepunkt	218 °C ^[1]
Dampfdruck	4 Pa (20 °C) ^[1]
Verwendetes Produkt	
Lieferant	Aldrich
Reinheit	99%
Lagerung	4 °C
Herstellung/MHD	-
Verwendete Mengen	Ca. 15 g
[1] (GESTIS-Stoffdatenbank Naph. 2013)	

I. 4. 2. 3. Toxizität**I. 4. 2. 3. 1. Akute Toxizität**

Die Empfindlichkeit gegenüber der Naphthalin Toxizität unterliegt erheblichen Schwankungen. Vergiftungen sind, überwiegend bei Säuglingen und Kleinkindern, nach Inhalation, intensivem Hautkontakt oder oraler Aufnahme (hier auch bei Erwachsenen) beobachtet worden (GISCHEM 2013). Akute Expositionen mit Naphthalin über die Luft können schwache Reizungen der Augen, als auch der Haut zur Folge haben.

I. 4. 2. 3. 2. Chronische Toxizität

Die Aufnahme von Naphthalin findet hauptsächlich über die Haut statt (DFG 2013).

Obwohl Naphthalin über mehrere Jahrzehnte Bestand im gewerblichen Umgang ist, liegen zu Auswirkungen von Naphthalin beim Menschen nach inhalativer Langzeitexposition als Einzelsubstanz kaum Kenntnisse vor (GISCHEM 2013).

Oftmals handelt es sich bei einer Exposition um eine Mischexposition mit weiteren giftigen Substanzen, wie PAK oder Lösemittel. So dass eine toxische Wirkung nicht sicher zugeordnet werden kann (BAuA VCH 06/89).

Eine karzinogene Wirkung von Naphthalin wird von den offiziellen Behörden vermutet (GISCHEM 2013).

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) stuft Naphthalin aufgrund des Verdachtes einer mutagenen Wirkung in Keimzellen bei der Keimzellenmutagenität in die Kategorie 3B ein. Abgeleitet wurde dies von in vivo Tests an somatischen Zellen von Säugetieren (DFG 2013) (DFG 2012).

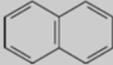
Stoff [CAS-Nummer]	Formel	MAK		Spitzen- begren- zung	H;S	Krebs- erzeu- gend Kate- gorie	Schwan- ger- schaft Katte- gorie Gruppe	Keim- zellmu- tagen Katte- gorie	Dampf- druck in hPa bei 20°C
		ml/m ³ (ppm)	mg/m ³						
Naphthalin [91-20-3]		vgl. Abschn. III Pyrolyseprodukte aus organischem Material		–	H	2	–	3B	

Abbildung 4 DFG MAK-Liste 2013

Aufgrund der Einstufung als Kategorie 2, krebserzeugend, wird keine MAK-Konzentration mehr angegeben (s. Abb.).

Die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) geht in den **Leitlinien für Innenraumluftqualität** von 2011 auch davon aus, dass Naphthalin nicht genotoxisch wirkt und gibt einen Leitlinienwert von 0,01 mg/m³ als Jahresmittelwert an (WHO 2011).

Außerdem geht die Weltgesundheitsorganisation in ihren Leitlinien für Innenraumluft von einer gewöhnlichen Innenraumkonzentration von 0,001 ng/m³ durch die allgemeine Luftbelastung aus. Welcher jedoch um das 100-fache ansteigen kann, wenn Naphthalin haltige Mottenkugeln verwendet werden. Daher gibt die WHO die Empfehlung die Verwendung von Naphthalin haltigen Mottenkugeln einzustellen oder zu verbieten (WHO 2011).

I. 4. 2. 4. Löslichkeiten

$C_{\text{Naphthalin, MeOH, 25}^\circ\text{C}}$	=	0.54 mol/L \equiv 69,212 g L ⁻¹	(Shayanfar, et al. 2008)
$C_{\text{Naphthalin, MeOH, xx}^\circ\text{C}}$	=	76,92 g L ⁻¹	(O'Neil 2001, Seite 1142)
$C_{\text{Naphthalin, Wasser, 20}^\circ\text{C}}$	=	32 mg L ⁻¹	(GESTIS-Stoffdatenbank Naph. 2013)

I. 4. 2. 5. Verteilungskoeffizienten

$K_{\text{Oktanol, Wasser}} (\text{L L}^{-1})$	Log $K_{\text{Oktanol, Wasser}}$	$K_{\text{MeOH:Si}} (\text{L L}^{-1})$	Log $K_{\text{MeOH:Si}}$	$K_{\text{Silikon: Wasser}} (\text{L L}^{-1})$	Log $K_{\text{Silikon: Wasser}}$	$K_{\text{MeOH:Wasser}} (\text{L L}^{-1})$	Log $K_{\text{MeOH:Wasser}}$
2238,7 ⁴	3,35 ⁴	2,78 ⁶	0,44 ⁶	711 u. Sat.	8,3 / 15,9 ⁶	1954 ⁶	3,29 ⁶
1995,3 ⁵	3,30 ⁵			/ 704 o. Sat. ⁶			

I. 4. 2. 6. Setschenow-, Salskonstante

$$K_{\text{Fluoranthen, 25}^\circ\text{C}}^S = 0,252 \left[\frac{\text{kg}}{\text{mol}} \right] = 0,287 \left[\frac{\text{L}}{\text{mol}} \right]; \text{ (Gold und Rodriguez 1988)}$$

Mit Dichte: 1,14 g/cm³ = 1,14 kg/L

⁴ (GESTIS-Stoffdatenbank Naph. 2013)

⁵ (HSDB, Naphthalene 06.12.2013)

⁶ (Smith, Oosting und Meyer 2009, Seite 61, Table 2)

II. Material und Methoden

II. 1. Beladung der Silikonringe

Die Beladung der Silikonringe basiert, wie die spätere Freisetzung im Test, auf dem Phasengleichgewicht zwischen der stationären Phase (dem Silikonring) und der mobilen Phase (dem Methanol). Dabei verteilt sich der Schadstoff in einem bestimmbar Verhältnis in den beiden Phasen.

Um die Ringe effektiv und ausreichend zu beladen, müssen die Schadstoffe in geeigneter Menge gelöst vorliegen und der Verteilungskoeffizient zwischen den beiden Phasen sollte nicht zu groß sein. Als Lösungsmittel für PAKs ist Methanol gut geeignet, da es zum einen den PAKs sehr gut löst, den Silikonring nicht aufquillt, sehr gut wasserlöslich, d.h. leicht wieder von den Ringen zu entfernen, ist und die Verteilung sehr schnell abläuft.

Eine sehr wichtige Eigenschaft des Verfahrens ist, dass sich durch verschiedene Konzentrationen im Methanol auch verschiedene Konzentrationen im Silikonring und somit auch in dem Test herstellen lassen, welche für die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven von essentieller Bedeutung sind.

Um die Beladung sowie die Konzentrationen in den späteren Testmedien bestimmen zu können, sollten folgende Daten bekannt sein oder durch Verteilungsexperimente ermittelt werden:

Sättigungskonzentration des Schadstoffes im Methanol und im Testmedium (Wasser und ASW)

$$c_{\text{Schadstoff,Methanol}}^{\text{sat}}, c_{\text{Schadstoff,Wasser}}^{\text{sat}}$$

Die Verteilungskoeffizienten

$$K_{\text{Methanol:Silikonring}}, K_{\text{Silikonring:Wasser}}$$

II. 2. Konzentrationsberechnungen

II. 2. 1. Allgemein

Die Konzentrationsberechnung ist ein wichtiges Instrument im *Passive Dosing* Verfahren. Zum einen müssen über die benötigte Endkonzentration Rückschlüsse auf die Beladelösungen gemacht werden. Zum anderen kann die direkte Messung, durch den Aufschluss der Testmedien, wodurch die adsorbierten (gebundenen) Schadstoffe wieder freigesetzt werden, zu höheren Ergebnissen der Gesamtkonzentration führen:

$$c_{\text{gesamt}} = c_{\text{gelöst}} + c_{\text{gebunden}} \quad (\text{II. 1})$$

Um die Konzentration korrekt zu ermitteln, sind die richtigen Verteilungskoeffizienten von großer Bedeutung. Sofern die Fachliteratur diese nicht vorgibt, sollten diese in Verteilungsexperimenten möglichst exakt bestimmt werden.

II. 2. 2. Die Setschenow Gleichung

Da die Biotests in künstlich hergestelltem Meerwasser (artificial Seawater, ASW) an marinen Algen durchgeführt wurden, ist aufgrund der Salinität von einer veränderten Löslichkeit der Schadstoffe im Testmedium auszugehen. Diese lässt sich anhand der Setschenow Gleichung mit den Aussalzungskonstanten bestimmen:

$$\log\left(\frac{c_{i,w}^{sat}}{c_{i,w,salt}^{sat}}\right) = K_i^s [\text{salt}]_{tot} \quad \text{Setschenow Gleichung (Klöpffer 2012)} \quad (\text{II. 2.})$$

$$c_{i,w,salt}^{sat} = c_{i,w}^{sat} \cdot 10^{-K_i^s [\text{salt}]_{tot}} \quad \text{Setschenow Gleichung nach } c_{i,w,salt}^{sat} \text{ umgestellt} \quad (\text{II. 3.})$$

mit:

$c_{i,w,salt}^{sat} \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right]$	Sättigungskonzentration von i in Salzlösung
$c_{i,w}^{sat} \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right]$	Sättigungskonzentration von i in reinem Wasser
$K_i^s \left[\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}}\right] \text{ oder } \left[\frac{\text{l}}{\text{mol}}\right]$	Setschenow- oder Salzkonstante [$1/\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]
$[\text{salt}]_{tot} \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$	Salzkonzentration [mol/l]

II. 2. 3. Die Aussalzungskonstante

Um die Schadstoffkonzentration aus der Konzentration in Reinstwasser im ASW bestimmen zu können, wurde für jeden Schadstoff eine Aussalzungskonstante wie folgt definiert:

$$c_{i,w,salt}^{sat} = c_{i,w}^{sat} \cdot 10^{-K_i^s [\text{salt}]_{tot}} \quad \text{Ausgangsgleichung für die Sättigungskonzentration in Salzwasser}$$

$$\text{Aussalzungskonstante} = 10^{-K_i^s [\text{salt}]_{tot}} \quad \text{Definition einer Stoffspezifischen Aussalzungskonstante}$$

Fluoranthen

$$c_{\text{Fluoranthen,Wasser}}^{sat} = 0,265 \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right]$$

$$K_{\text{Fluoranthen}}^s = 0,339 \left[\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}}\right]$$

$$[\text{salt}]_{tot,ASW} = 0,7105 \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$$

$$\begin{aligned} \text{Aussalzungskonstante}_{\text{Fluoranthen}} &= 10^{-0,339 \cdot 0,7105} \\ &= 0,574 [-] \end{aligned}$$

gegeben:

Sättigungskonzentration von Fluoranthen in Reinstwasser (IARC Volume 32)

Literaturwert, Setschenow- oder Salzkonstante von Fluoranthen [$1/\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] (Gold und Rodriguez 1988, Table 2)

Salzkonzentration des ASW [mol/l] ⁷

Aussalzungskonstante Fluoranthen

Naphthalin

$$c_{\text{Naphthalin,Wasser}}^{sat} = 32 \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right]$$

gegeben:

Sättigungskonzentration von Naphthalin in Reinstwasser (GESTIS-Stoffdatenbank Naph. 2013)

⁷ = 33 g/kg nach DIN EN ISO 10253:2006, Seite 8

$$K_{Naphthalin}^S = 0,287 \left[\frac{1}{\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}} \right]$$

$$[\text{salt}]_{\text{tot,ASW}} = 0,7105 \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right]$$

$$\begin{aligned} \text{Aussalzungskonstante}_{Naphthalin} &= 10^{-0,287 \cdot 0,7105} \\ &= \mathbf{0,625 [-]} \end{aligned}$$

Literaturwert, Setschenow- oder Salzkonstante von Naphthalin [$1/\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$] **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

Salzkonzentration des ASW [mol/l] ⁷

Aussalzungskonstante Naphthalin

II. 2. 4. Endkonzentrationen im ASW

Um die Endkonzentration im Medium berechnen zu können, sind folgende Parameter nötig: c_{Methanol} , $K_{\text{Methanol:Silikonring}}$, $K_{\text{Silikonring,Wasser}}$

$$c_{\text{Methanol}} = \text{_____} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right]$$

Schadstoffkonz. im Methanol, gemessen oder Literaturwert

$$c_{\text{Silikonring}} = \frac{c_{\text{Methanol}}}{K_{\text{Methanol:Silikonring}}} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right]$$

$K_{\text{Methanol:Silikonring}}$ gemessen oder aus Literatur

$$c_{\text{Wasser}} = \frac{c_{\text{Silikonring}}}{K_{\text{Silikonring:Wasser}}} \cdot 1000 \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right]$$

$K_{\text{Silikonring:Wasser}}$ gemessen oder aus Literatur

$$c_{\text{Salzwasser}} = c_{\text{Wasser}} \cdot \text{Aussalzungskonstante} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right]$$

Aussalzungskonstante gemessen, berechnet oder aus Literatur

$$c_{\text{Salzwasser}} = \frac{c_{\text{Methanol}} \cdot \text{Aussalzungskonst.} \cdot 1000}{K_{\text{Methanol:Silikonring}} \cdot K_{\text{Silikonring:Wasser}}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] \quad (\text{II. 4.})$$

Da alle Konstanten sich bei einer Testkonfiguration nicht ändern, kann man diese der Einfachheit halber auch zu einer Konstante verbinden:

$$\frac{\text{Aussalzungskonst.} \cdot 1000}{K_{\text{Methanol:Silikonring}} \cdot K_{\text{Silikonring:Wasser}}} = X_{\text{Test,Schadstoff1}}$$

$$c_{\text{Salzwasser}} = c_{\text{Methanol}} \cdot X_{\text{Test,Schadstoff1}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right] \quad (\text{II. 5.})$$

II. 2. 5. Messung an der HPLC mit Diodenarray-Detektor

Um die Schadstoffkonzentrationen besser bestimmen zu können, wurden die hergestellten Schadstoff-Lösungen an der HPLC mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) gemessen.

Die Messung erfolgte mit dem Hitachi Primaide Series: 0090 System mit folgender Konfiguration: Interface: IFB, Channel 1 Detector: 1430 (Diodenarraydetektor), Channel 2 Detector: None, Column Oven: 1310, Autosampler: Manual, Pump A: 1110, Pump B: None, Column Name: Column.

Mit einer C18 Säule, RP-18 (5 μm), Cb: L 188G17, No.: 508385.

II. 2. 5. 1. Messmethoden

Für die Messung wurden folgende Methoden selbst erstellt:

Tabelle 1 Messmethoden an der HPLC

Name der Methode	Retentionszeit [min]	Fließmittelgradienten und Zusammensetzung	Wellenlänge [nm]
130807F_luoranthene_Konopka	2,02	0-3 Min: 95% Acetonitril, 5% Reinstwasser, 1 mL/Min	234-240
130808_Naphthalene_Konopka	2,225	0-3,5 Min: 95% Acetonitril, 5% Reinstwasser, 1 mL/Min	270-278
131010_Fluoranthene_ASW+_FK	7,468	0-2 Min: 100% Reinstwasser, 1,3 mL/Min / 2-9 Min: 100% Acetonitril, 0,7 mL/Min / 9-13 Min: 100% Reinstwasser, 1,0 mL/Min	275-288
131021_Naphthalene_ASW+_FK	9,497	0-3 Min: 100 % Reinstwasser, 1,3 mL/Min / 3-11 Min: 100% Acetonitril, 0,8 mL/Min / 11-15 Min: 100% Reinstwasser, 1,0 mL/Min	275-287

Die Fließmittelzusammensetzung und die Gradienten zur Messung der ASW Proben sollten das Verfahren der Festphasenextraktion imitieren. Dabei sollen durch die 100% Reinstwasser als Fließmittel zu Beginn alle störenden Salze und andere Nährstoffe aus der Probe und von der Säule gewaschen werden. Anschließend sollen die schwer wasserlöslichen PAKs mit dem Acetonitril herunter gewaschen werden.

II. 2. 5. 2. Kalibrierung

Zur möglichst exakten Bestimmung, der an der HPLC gemessenen Schadstoffkonzentrationen, wurde zu jeder Messung eine Kalibrierung mit folgenden Konzentrationen durchgeführt: 10 mg/L, 5 mg/L, 2,5 mg/L, 1,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,25 mg/L, 0,125 mg/L und 0,05 mg/L. Alle Kalibrierungen wurden anschließend extra ausgewertet und eine **Kalibriergerade aus allen Mittelwerten erstellt**. Siehe Anhänge: VI. 2. Anhang 2 HPLC Kalibrierung Fluoranthene Seite 59 und VI. 3. Anhang 3 HPLC Kalibrierung Naphthalin Seite 60.

Diese Mittelwert-Kalibrierungen wurden als Grundlage für alle weiteren Messwerte verwendet.

II. 2. 5. 2. 1. Ansetzen der Methanol Standards

Für die Standards in Lösungsmitteln wurden die Dr. Ehrenstorfer GmbH Fluoranthene und Naphthalin 10 ng/µl Standard Lösungen in Acetonitril (Fluoranthene: L 20795000AL, Lot: 30319AL, 08/2016; Naphthalin: L 20905000AL, Lot: 21109AL, 11/2015) zunächst für 15 Minuten in das Ultraschallbad gestellt und anschließend mit Methanol (oder Acetonitril) auf folgende Konzentrationen verdünnt: 10 mg/L (ohne Verdünnung), 5 mg/L, 2,5 mg/L, 1,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,25 mg/L, 0,125 mg/L und 0,05 mg/L.

Der Verdünnungen wurden mit geprüften Pipetten direkt in GC-Vials angesetzt.

Bei der Messung an der HPLC waren keine Abweichungen zwischen den Schadstoff-Peaks der Methanol und Acetonitril/Methanol Lösungen zu erkennen.

II. 2. 5. 2. 2. Ansetzen der ASW Standards

Für die Standards ASW Lösung wurden die Dr. Ehrenstorfer GmbH Fluoranthren und Naphthalin 10 ng/µl Standard Lösungen in Acetonitril (Fluoranthren: L 20795000AL, Lot: 30319AL, 08/2016; Naphthalin: L 20905000AL, Lot: 21109AL, 11/2015) zunächst für 15 Minuten in das Ultraschallbad gestellt und anschließend mit ASW auf folgende Konzentrationen verdünnt: 5 mg/L, 2,5 mg/L, 1,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,25 mg/L, 0,125 mg/L und 0,05 mg/L.

Der Verdünnungen wurden mit geprüften Pipetten direkt in GC-Vials angesetzt.

II. 2. 5. 3. Proben

Aus allen durchgeführten marinen Algentests mit Fluoranthren und Naphthalin wurde aus jedem Test 1 mL des Mediums in GC-Vials konserviert und direkt nach Testende eingefroren, um später an der HPLC die Gesamtkonzentrationen in der Testlösung bestimmen zu können. Leider war die Messung aller Proben an der HPLC aus Zeitgründen nicht möglich. Außerdem wurden 1 mL Proben aus allen Beladelösungen sowie alle übrig gebliebenen Silikonringe aus der Beladung sowie die Silikonringe aus den Biotests konserviert. Folgende Proben wurden regelmäßig konserviert:

II. 2. 5. 3. 1. Aus der Beladung

- Alle Beladelösungen wurden konserviert, einige davon gemessen
- Überschüssige Ringe wurden konserviert
- Extraktionsflüssigkeiten wurden konserviert

II. 2. 5. 3. 2. Aus den Tests

- Alle Testlösungen wurden konserviert
- Alle Ringe aus den Tests wurden konserviert

II. 2. 5. 3. 3. Übersicht aller Proben

Folgende Listen beinhalten alle gesammelten Proben, die evtl. bereits gemessen wurden oder weiterhin tiefgekühlt konserviert sind.

Fluoranthren**Tabelle 2 Übersicht aller Fluoranthren Proben**

Datum	Testnr.	Probenart	Vorhanden	Gemessen
18.05.	-	Beladelösungen: Gesättigt bis 32:1 Verdünnung	Nein	07.08.
03.06.	Für 7	ASW Stammlösung für MAT	Ja	
07.06.	8	Lösungen aus den <i>Passive Dosing</i> Biotests: V1 bis V5	Ja	
07.06.	8	Blindwert-Lösungen aus den <i>Passive Dosing</i> Biotests: V1 bis V5	Nein	10.10.
07.06.	7	Lösungen aus den Standard dosierten Biotests: V1 bis V5	Ja	
07.06.	7	Blindwert-Lösungen aus den Standard dosierten Biotests: V1 bis V5	Ja	
17.07.	Für 16	Beladelösungen: Gesättigt bis 32:1 Verdünnung	Ja	08.08.
17.07.	Für 16	Beladelösungen: Gesättigt bis 32:1 Verdünnung	Ja	28.08.
17.07.	Für 16	Extraktionen 1 und 2 der Ringe vom 17.07.	Nein	29.08.
19.07.	Für 15	ASW Stammlösung für MAT	Ja	

25.07.	16	Lösungen aus den <i>Passive Dosing</i> Biotests: V1 bis V5	Ja	
25.07.	16	Blindwert-Lösungen aus den <i>Passive Dosing</i> Biotests: V1 bis V5	Ja	14.10.
25.07.	15	Lösungen aus den Standard dosierten Biotests: V1 bis V5	Ja	
25.07.	15	Blindwert-Lösungen aus den Standard dosierten Biotests: V1 bis V5	Ja	
08.08.		Kontrollmessung alter Standards ohne Ultraschall	Nein	28.08.
10.09.	Für 21	Beladelösungen: Gesättigt bis 32:1 Verdünnung	Ja	17.09.
10.09.	Für 21	Beladelösungen: Gesättigt und 2:1 Verdünnung	Ja	18.09.
10.09.	Für 21	Extraktionen 1 der Ringe vom 10.09.	Ja	18.09.
10.09.	Für 21	Extraktionen 2 der Ringe vom 10.09.	Ja	19.09.
27.09.	21	Lösungen aus den <i>Passive Dosing</i> Biotests: V1 bis V5	Ja	
27.09.	21	Blindwert-Lösungen aus den <i>Passive Dosing</i> Biotests: V1 bis V5	Ja	14.10.
09.10.		Beladelösungen: Gesättigt bis 32:1 Verdünnung	Ja	
10.10.		Kontrollmessung der ASW Standards vom 10.10.	Nein	14.10.

Naphthalin

Tabelle 3 Übersicht aller Naphthalin Proben

Datum	Testnr.	Probenart	Vorhanden	Gemessen
18.05.	-	Beladelösungen: Gesättigt bis 32:1 Verdünnung	Nein	
13.06.	12	Lösungen aus den <i>Passive Dosing</i> Biotests: V1 bis V5	Ja	
13.06.	12	Blindwert-Lösungen aus den <i>Passive Dosing</i> Biotests: V1 bis V5	Ja	
13.06.	11	Lösungen aus den Standard dosierten Biotests: V1 bis V5	Ja	
13.06.	11	Blindwert-Lösungen aus den Standard dosierten Biotests: V1 bis V5	Ja	
17.07.	Für 19	Beladelösungen: Gesättigt bis 32:1 Verdünnung	Ja	08.08.
01.08.	19	Lösungen aus den <i>Passive Dosing</i> Biotests: V1 bis V5	Ja	
01.08.	19	Blindwert-Lösungen aus den <i>Passive Dosing</i> Biotests: V1 bis V5	Ja	
01.08.	18	Lösungen aus den Standard dosierten Biotests: V1 bis V5	Ja	
01.08.	18	Blindwert-Lösungen aus den Standard dosierten Biotests: V1 bis V5	Ja	

10.09.	-	Beladelösungen: Gesättigt bis 32:1 Verdünnung	Ja	17.09.
10.09.	-	Extraktionen 1 der Ringe vom 10.09.	Ja	18.09.
10.09.	-	Extraktionen 2 der Ringe vom 10.09.	Ja	19.09.
27.09.	-	ASW Stammlösung für MAT	Ja	
09.10.	-	Beladelösungen: Gesättigt bis 32:1 Verdünnung	Ja	

II. 2. 5. 3. 4. Silikonringe

Folgende Silikonringe aus den Tests oder Beladungen sind vorhanden.

Datum	Testnr.	Probenart	Vorhanden	Extrahiert
13.06.	12	Naphthalin Ringe aus MAT	Ja	
18.07.	Für 16	Fluoranthen Ringe aus der Beladung vom 17.07.	Ja	
18.07.	Für 19	Naphthalin Ringe aus der Beladung vom 17.07.	Ja	
25.07.	16	Fluoranthen Ringe aus MAT	Ja	
01.08.	19	Naphthalin Ringe aus MAT	Ja	
11.09.		24h Fluoranthen Ringe aus der Beladung vom 10.09.	Ja	
11.09.		24h Naphthalin Ringe aus der Beladung vom 10.09.	Ja	
11.09.		48h Fluoranthen Ringe aus der Beladung vom 10.09.	Ja	
11.09.		48h Naphthalin Ringe aus der Beladung vom 10.09.	Ja	
27.09.	21	Fluoranthen Ringe aus MAT	Ja	

II. 2. 5. 3. 5. Methanol Belade-Lösungen

Für die Analyse der hoch konzentrierten Methanol Lösungen mussten diese auf unseren Messbereich von 0,05 mg/L bis 10 mg/L verdünnt werden:

Tabelle 4 Verdünnung der Methanol Beladelösungen

Schadstoff	Sättigungskonz. [g/l]	Min. Konz. [g/l]	Verdünnung	Sät.Konz. nach Verdünnung [mg/L]	Min. Konz. nach Verdünnung [mg/L]
Fluoranthen	13,15 ⁸	0,411	1:2000	6,57	0,205
Naphthalin	69,00 ⁹	2,156	1:10000	6,9	0,2156

⁸ (Acree 2002)

⁹ (Shayanfar, et al. 2008)

II. 2. 5. 4. Extraktion

Um eine sichere Aussage über die Schadstoffkonzentration der beladenen Ringe machen zu können, wurden einige Ringe mit Methanol extrahiert. Dies geschah, in Anlehnung an die Arbeit von Smith et al., bei jedem Ring durch zweimaliges Einlegen in 5 ml Methanol für je 24 Stunden (Smith, Dom, et al. 2010).

Bei der ersten Durchführung der Extraktion, am 28.08.2013, wurden mit Fluoranthen beladene Ringe im ersten Schritt 11 Stunden, und im zweiten Schritt 3 Stunden in je 5 ml Methanol unter ständigem Rütteln extrahiert.

In einem weiteren Durchgang, am 02.09.2013, wurden jeweils mit Fluoranthen und mit Naphthalin beladene Ringe zweimal 24 Stunden unter ständigem Schütteln in 5 ml Methanol extrahiert. Die 5 ml wurden anschließend auf 20 ml (1:4 Verdünnung) in einem Messkolben aufgefüllt.

Tabelle 5 Durchgeführte Extraktionen und Verdünnungen der Silikonringe nach der Beladung

Datum	Schadstoff	Extraktionsdauer	Extraktion	Verdünnung
29.08.2013	Fluoranthen	11 Stunden	1	1:100
		3 Stunden	2	Keine
02.09.2013	Fluoranthen	24 Stunden	1	1:40 (insgesamt)
			2	Keine
	Naphthalin		1	1:40 (insgesamt)
			2	Keine

Die Methanol Lösungen wurden anschließend mit der HPLC analysiert.

Die Ergebnisse sind den folgenden Anhängen zu entnehmen: VI. 6. Anhang 6 HPLC Messergebnisse Fluoranthen Seite 63 und VI. 7. Anhang 7 HPLC Messergebnisse Naphthalin Seite 64

II. 2. 5. 5. ASW Lösungen

Im Zuge der Bachelorarbeit wurden einzig die Schadstoffkonzentrationen der ASW Lösungen der Algenfreien Bildwertproben in keiner, oder 1:1 Verdünnung an der HPLC analysiert.

II. 2. 5. 5. 1. Fluoranthen in ASW

Testmessungen der ASW Lösungen mit dem Fluoranthen hatte ergeben, dass diese selbst bei der nominal höchsten Konzentration von V1 an der unteren Grenze des Messbaren Bereiches des DAD lag. Daher wurde auf eine 1:1 Verdünnung mit Methanol verzichtet.

II. 2. 5. 5. 2. Naphthalin in ASW

Durch die Erkenntnisse der Fluoranthen Messung wurde auch bei den Naphthalin Lösungen auf eine Verdünnung mit Methanol zunächst verzichtet.

Die Analyse zeigte hier jedoch wesentlich höhere Konzentrationen, so dass eine 1:1 Verdünnung mit Methanol hier möglich ist.

II. 3. MAT Beschreibung des Testverfahrens

Alle Biotests mit der marinen Alge *Phaeodactylum tricornutum* wurden auf Basis der DIN EN ISO 10253:2006 (Deutsches Institut für Normung e.V. 2006) durchgeführt.

Weitere Arbeitsgrundlagen für die Tests waren die Arbeitsanweisungen des Praktikums Umweltanalytik und Ökotoxikologie (UAP), Biologielabor, Prof. Dr. c. Floeter:

- *Erstellung einer Kalibriergeraden Zellzahl – Fluoreszenz auf 24well Mikroliterplatte mit Phaeodactylum tricornutum* (Floeter 2013)
- *Bestimmung der Zellzahl von Phaeodactylum tricornutum mit der Neubauer improved Zählkammer* (Floeter 2013)
- *Pipettierschemata für UAP 24well-MPs* (Floeter 2013)
- *Bedienung im Biolabor, Berechnung des EC_{50} -Wertes mit GraphPad Prism 6* (Biolabor 2013)

Für den marinen Algentest (MAT) wurde folgende Messplatte (MP) benutzt: Orange Scientific Tissue Culture Testplates, Gamme sterilised, tissue culture treated 1 Unit; Cat #550300 – 24 wells. Diese Platte hatte sich nach dem aktuellen Stand in einem DIN Ringtest (mdl. Mitteilung Floeter 2013) als geeignet herausgestellt und wurde über einen jahrelangen Einsatz erprobt (mdl. Mitteilung Floeter 2013)

Statt den MAT, wie durch die DIN Norm vorgegeben, mit einem Volumen von 100 ml in Erlenmeyerkolben durchzuführen, konnte durch den Einsatz der 24well Testplatte das Volumen auf 2 ml reduziert, die Anzahl der Ansätze erhöht und ein Lösungs- und Schadstoffverbrauch minimiert werden.

II. 3. 1. Verfahren zur Messung der Zelldichte und Verfahren zur Korrektur der Hintergrundwerte

Die Zelldichte zu den Testzeitpunkten wurde indirekt über die Fluoreszenzmessung der Messplatte bestimmt.

Für die Messung der Messplatten aus den Tests wurde im Vorfeld eine Kalibrierung nach den Anleitungen (Floeter, Bestimmung der Zellzahl von Phaeodactylum tricornutum mit der Neubauer improved Zählkammer 2013) (Floeter, Erstellung einer Kalibriergeraden Zellzahl – Fluoreszenz auf 24well Mikroliterplatte mit Phaeodactylum tricornutum 2013) selbst erstellt. Hierbei wurde zunächst ein Algenstamm in 6 Schritten bis zu einem Verhältnis von 32:1 verdünnt. Jede Verdünnungsstufe wurde anschließend mit einer Neubauer improved Zählkammer unter einem Mikroskop ausgezählt, hochgerechnet und anschließend mit dem Plattenfluorometer die Fluoreszenz bestimmt.

Die Fluoreszenzmessung der 24 well Mikrotiterplatten erfolgte mit dem Plattenfluorometer Tecan infinite 200Pro (Seriennummer: 1111007064, Firmware V_3.22_12/10_Infinite) mit der Software Tecan i-control (Version 1.8.50.0).

Zur Korrektur der Hintergrundfluoreszenz wurde ein parallel ermittelter Blindwert (bzw. Testansatz ohne Algen) von der gemessene Fluoreszenz der Probe subtrahiert.

Die Fluoreszenz Messung erfolgte mit folgenden Parametern:

Tabelle 6 Parameter des Plattenfluorometer infinite 200Pro

Platte	Corning 24 Flat Bottom Transparent Polystyrol [COS24ft.pdfx]	
Platten-ID (Stapler)		
Schütteln (Orbital) Dauer:	10	s
Schütteln (Orbital) Amplitude:	1	mm
Modus	Fluoreszenz Messung von oben	

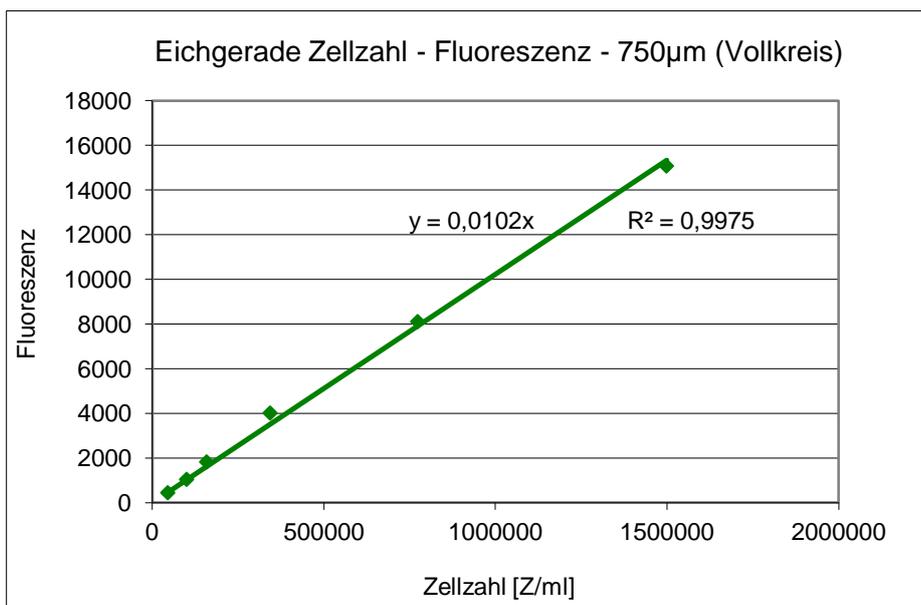
Mehrfachmessungen pro Well (Kreis (voll))	5 x 5	
Mehrfachmessungen pro Well (Rahmen)	750	µm
Exzitationswellenlänge	430	nm
Emissionswellenlänge	670	nm
Exzitationsbandbreite	35	nm
Emissionsbandbreite	25	nm
Verstärkung	50	Manuell
Anzahl der Blitze	10	
Integrationszeit	20	µs
Verzögerungszeit	0	µs
Ruhezeit	0	ms
Spiegel (Automatisch)	Dichroisch 510 (z. B. Fluorescein)	

Aus der Auszählung und der Fluoreszenzmessung ergibt sich folgende Kalibrierfunktion:

Tabelle 7 Zellzahlen und Messwerte aus der Kalibrierung

Zellzahl [Zellen/ml]	Messwert [Fluoreszenz]	Messwert minus Blindwert (Blindwert= 110) [Fluoreszenz]
45000	552	442
100000	1153	1043
158333	1933	1823
343333	4122	4012
773333	8218	8108
1498333	15187	15077

Zwischen Fluoreszenz und Zelldichte besteht ein linearer Zusammenhang (siehe Graph 1)



Graph 1 Auswertung der Kalibrierfunktion mit Excel

II. 3. 2. Beurteilung der Toxizität

Die Beurteilung der Toxizität erfolgt über die Bestimmung der Hemmung des Wachstums (bzw. der Reproduktion) der Algen über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zu einer negativ Kontrolle und den daraus resultierenden EC_{50} -Werten.

Während des Tests sollte die Zellanzahl alle 24 ± 2 Stunden bestimmt werden. Anhand dieser Zellzahlen kann die prozentuale Hemmung über den Logarithmus naturalis (aufgrund der exponentiellen Steigung) der Zellzahlen, bezogen auf die zeitliche Differenz in Stunden, bestimmt werden:

$$\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t_L - t_0} \quad \begin{array}{l} t_0 \\ t_L \\ N_0 \\ N_L \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{Zeitpunkt des Testbeginns} \\ \text{Zeitpunkt der Messung} \\ \text{Anfangszelldichte} \\ \text{Zelldichte zum Zeitpunkt } t_L \end{array} \quad (II. 1)$$

oder einfach: $\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t_L}$

Die Bestimmung der prozentualen Abweichung erfolgt über den Bezug auf die negative Kontrolle ($\bar{\mu}_c$):

$$I_{\mu i} = \frac{\bar{\mu}_c - \mu_i}{\bar{\mu}_c} \cdot 100 \quad \begin{array}{l} I_{\mu i} \\ \mu_i \\ \bar{\mu}_c \end{array} \quad \begin{array}{l} \text{Prozentuale Hemmung der Wachstumsrate} \\ \text{Wachstumsrate des Testsansatzes } i \\ \text{Mittlere Wachstumsrate im Kontrollansatz} \end{array} \quad (II. 2)$$

Über diese prozentuale Hemmung der Wachstumsrate jeder 5-Verdünnungsstufen lässt sich nun ein EC_{50} -Wert berechnen.

II. 3. 3. Berechnung der EC_{50} Werte

Viele log Dosis-Wirkungs-Kurven folgen der bekannten symmetrischen S-Form.

Die Berechnung mit dem Programm Prism GraphPad 6 erfolgte durch eine nicht lineare Regression einer Dosis-Wirkungs Simulation des Logarithmus der Konzentration bezogen auf die prozentuale Hemmung.

II. 3. 4. Die stationäre Phase: Silikonringe

Als stationäre Phase in den 24well Mikrotiterplatten wurden Silikonringe der Firma Altec verwendet (Torus förmig; Materialgüte: Lebensmittel; Innerer Durchmesser: 9,6 mm; Äußerer Durchmesser: 14,4 mm; Durchmesser der Randes: 2,4 mm; Härte: 70°; Order no. ORS-0096-24., British Standard Metric Silicone 'O' Rings, Altec, Cornwall, United Kingdom)

Sie besitzen außerdem folgende **physikalische Eigenschaften**: Dichte $\delta = 1,35 \text{ kg/l}$, Gewicht $m = 231 \cdot 10^{-3} \text{ g}$ und Volumen $= 0,171 \cdot 10^{-3} \text{ L}$.

Um störende Einflüsse von anderen Stoffen auszuschließen, müssen die Ringe vor der Beladung wie folgt gereinigt werden:

1. Über Nacht in Ethylacetat einlegen
2. Drei Mal über Nacht in Methanol einlegen
3. Drei Mal über Nacht in Reinstwasser einlegen

Die gereinigten Ringe sollten bis zur Beladung in Reinstwasser im Kühlschrank konserviert werden. Vor der Beladung sind die Ringe mit einem fusselreien Tuch zu trocknen.

II. 3. 5. Verwendete Lösungen

Tabelle 8 Verwendete Lösungen

Art	Herkunft	Verwendet für
Reinstwasser	Reinstwasseranlage aus dem Labor für Instrumentelle Analytik	Spülung der Ringe, Konservierung der Ringe, Ansetzen des ASW
ASW	Herstellung nach DIN EN ISO 10253	Kultivierung der Algen, Herstellung der Standard Dosing Schadstofflösungen
Stammlösungen 1 - 3	Herstellung nach DIN EN ISO 10253	Kultivierung der Algen, In den Biotests
Methanol	Carl Roth ROTISOLV® ≥99,9 %, Pestilyse®	Beladung und Reinigung
n-Hexan	Carl Roth ROTISOLV® ≥99 %, Pestilyse®	Reinigung

II. 3. 6. Herstellung der Nährstoff-Stammlösungen

Die Nährstoff-Stammlösungen wurden von dem Laborpersonal nach Tabelle 2 der DIN EN ISO 10253: 2006 hergestellt.

Aus diesen wurden die Nährmedien nach **7.1. Herstellung des Mediums** der DIN EN ISO 10253: 2006 hergestellt.

Darüber hinaus wurde für die Tests eine 9-fach konzentrierte Nährmedium (im folgenden 9-fach NM) hergestellt: 13,5 ml Nährstoff-Stammlösung 1, 0,45 ml Nährstoff-Stammlösung 2, und 0,9 ml Nährstoff-Stammlösung 3 zu etwa 90 ml synthetischen Meerwasser gegeben und mit dem gleichen Meerwasser auf 100 ml ausgefüllt.

II. 3. 7. Algenstamm s. I 3 4

Die Algenkultur *Phaeodactylum tricornutum* (Universität Göttingen SAG, 1090-1a) wird in 100 ml Erlmeyerkolben mit Gasdurchlässigem Stopfen in drei Ausführungen kultiviert.

Mind. 3 Tage vor Testbeginn werden die Algenkulturen in neue 100 ml steril überimpft, damit die Algen sich zum Testbeginn in der exponentiellen Wachstumsphase befinden

II. 3. 8. Testgut

Fluoranthen und Naphthalin wurden aus der Gruppe der 16 Vertreter für die Gesamtheit der PAKs gewählt.

Bei jedem Testlauf wurde als Referenz eine weitere 24well Messplatte mit 3,5-Dichlorphenol (im folgenden DCP genannt) in den Beladekonzentrationen, 10 mg/L, 5 mg/L, 2,5 mg/L, 1,25 mg/L und 0,625 mg/L, angesetzt. Die Konzentrationen in den Testgefäßen ergab sich wie folgt: 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L.

Die DCP-Stammlösungen 100 mg/L wurden entweder selber angesetzt (10 mg Feststoff auf 100 ml) oder es wurde eine Referenzlösung benutzt (Dr. U. Noack-Laboratorien, DCP in ASW).

II. 3. 9. Testorganismus, Spezies, Herkunft, Stamm-Nr., Art der Kultivierung

Für die Biotests wurde die Algenkultur *Phaeodactylum tricornutum* (Universität Göttingen SAG, 1090-1a) verwendet.

Durch die Überimpfung der Algenkultur drei bis vier Tag vor Testbeginn wurde sichergestellt, dass sich die Algen zum Testbeginn in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden.

Nach DIN EN ISO 10253 sollte Anfangszellichte den Wert von 10^4 Zellen pro Milliliter nicht überschreiten. Es wurde eine Zelldichte zu Testbeginn zwischen $0,9 \cdot 10^4 \text{ ZZ} \cdot \text{mL}^{-1}$ und $2 \cdot 10^4 \text{ ZZ} \cdot \text{mL}^{-1}$ eingestellt. Siehe dazu die MAT Auswertungen im Anhang.

II. 3. 10. Gerät zur Herstellung der Kultur und Art der Inkubation

Die Algenkultur *Phaeodactylum tricornutum* wurde unter speziellem Pflanzenlicht in sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben mit gasdurchlässigem Papierstopfen als Stammkultur gehalten.

Um ein stetiges Wachstum der Kultur zu gewährleisten, wurde diese mindestens alle zwei Wochen neu steril überimpft. Um bei Testbeginn in der exponentiellen Wachstumsphase zu sein, wurden zwei bis drei Tage vor Testbeginn 1 bis 1,5 ml in einen neuen Kolben mit ca. 100 ml ASW+NM überführt.

Als Lichtquelle für den Biotest dienten fünf Osram 18W/77 FluorA Leuchtstoffröhren:

Tabelle 9 Lichttechnische Daten

Lichttechnische Daten	
Lichtstrom bei 25°C	550 lm
Lichtfarbe	77
Lichtfarbe gemäß EN 12464-1	FLUORA
Farbkoordinaten in der Normfarbtafel	0.338/0.243

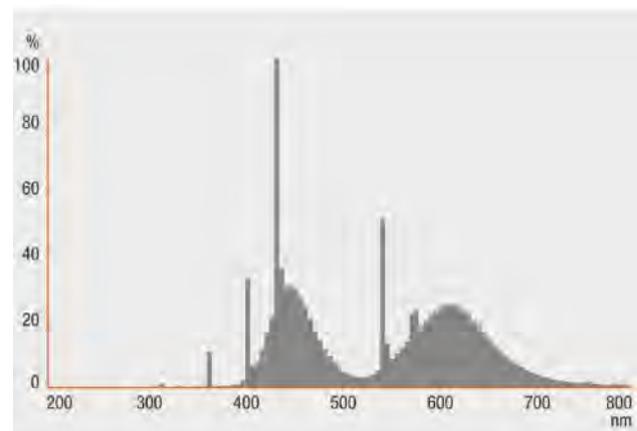


Abbildung 5 Strahlungsverteilung der Osram 18W/77 FluorA, osram.de, Grafiken und Anwendungsbilder

Dabei beträgt der Abstand zur Lichtquelle ca. 17 cm.

Die Lichtintensität im Klimaschrank betrug $82,5 \mu\text{mol} / \text{m}^2 \cdot \text{s} \pm 2,2 \%$ (Buder 2013)

II. 3. 11. Temperatur

Die Temperatur wurde im Brutschrank auf Konstanten $21 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ gehalten.

II. 3. 12. pH-Wert der Test- und Kontrollansätze zu Beginn und Ende der Tests

Aufgrund der geringen Volumina, und um die Schadstoffadsorption zu vermeiden wurde im Vorfeld der pH-Wert des ASW gemessen.

Nach dem Test wurden alle 24 Testfelder eines Wells gemessen.

II. 3. 13. Gültigkeitskriterien

Damit der Test als gültig angesehen werden kann, müssen folgende Bedingungen eingehalten werden:

- a) Die Zelldichte der Kontrolle muss in den 72 Stunden mindestens um den Faktor 16 zugenommen haben. Dies entspricht einer spezifischen Wachstumsrate von 0,9 je Tag und 0,0375 pro Stunde.
- b) Der Variationskoeffizient der spezifischen Wachstumsraten sollte 7 % nicht überschreiten.
- c) Der pH-Wert darf sich während der Tests nicht um mehr als $\pm 1,0$ verändern.

II. 3. 14. Übersicht Testaufbau und Pipettierschema MAT

Für die *Passive Dosing* Tests wurden die erzeugten Schadstoff-Ringe bei Testbeginn direkt in das Testgefäß überführt. Die Standard Dosis für den Standard Dosis Test wurde nach DIN Vorgabe durchgeführt:

Tabelle 10 nach: Prof. Dr. C. Floeter: Pipettierschemata für UAP 24well-MPs

Art des Tests	Verdünnungs-wasser ASW [μL]	9xDIN NM + ASW [μL]	Schadstoffeintrag [μL]	Algen in DIN MA ASW+ NM [μL]	DIN MA ASW+ NM [μL]
PD	1600	200	Schadstoff-Ring	200	-
PD Kontrolle	1600	200	Kontroll-Ring	200	-
PD Blindwerte	1600	200	Schadstoff-Ring	-	200
PD Blindwert Kontrolle	1600	200	Kontroll-Ring	-	200
SD	-	200	1600	200	-
SD Kontrolle	1600	200	-	200	-
SD Blindwerte	-	200	1600	-	200
SD Blindwerte Kontrolle	1600	200	-	-	200

PD: *Passive Dosing*, SD: Standard Dosing

Für jede Konzentration / Verdünnungsstufe wurden drei Replikate auf einer 24well Testplatte gemessen. Die weiteren sechs Testkammern dienten der Blindwertbestimmung für die Fluoreszenzmessung. Die Anordnung der Verdünnungsstufen war wie folgt:

Tabelle 11 Probenverteilung auf der 24well Mikrotiterplatte

	1	2	3	4	5	6
A	K	V4	V3	V1	V4	B2
B	V1	V5	V4	K	V5	B3
C	V2	V1	V5	V2	KB	B4
D	V3	V2	K	V3	B1	B5

V1 = höchste Konz.; V5 = niedrigste Konz.; B1 = höchste Blindwert Konz.; B2 = niedrigste Blindwert Konz.; K = Kontrolle, keine Schadstoffkonzentration

II. 4. Übersicht über die durchgeführten MATs

II. 4. 1. Testbeginn und Dauer

Jeder Einzeltest lief 72 (± 2) Stunden. Folgende Tests wurden im Umfang meiner Arbeit durchgeführt und bewertet:

Tabelle 12 Durchgeführte MATs

Nr.	Zeitraum	Beginn	Ende	Art	Anhang	Gültigkeitskriterien
1	08.05.	19:10:05	-	Kalibrierung	nein	-
2	13.05.- 16.05.	12:33:56	13:47:16	Kontrollplatte	nein	nicht erfüllt
3	13.05.- 16.05.	12:55:22	13:53:10	Fluoranthen Passiv	ja	nicht erfüllt
4	13.05.- 16.05.	13:22:52	13:57:20	DCP	ja	nicht erfüllt
5	27.05.- 30.05.	10:16:41	10:00:57	Kontrollplatte	nein	-
6	27.05.- 30.05.	10:16:41	10:00:57	DCP	ja	erfüllt
7	04.06.- 07.06.	11:58:01	11:00:22	Fluoranthen Standard	ja	
8	04.06.- 07.06.	11:10:04	10:51:35	Fluoranthen Passiv	ja	
9	04.06.- 07.06.	12:06:34	11:08:26	DCP	ja	
10	04.06.- 07.06.	11:34:33	10:44:16	Kontrollplatte	nein	
11	10.06.- 13.06.	11:51:24	11:32:05	Naphthalin Standard	ja	
12	10.06.- 13.06.	11:45:31	11:27:14	Naphthalin Passiv	ja	
13	10.06.- 13.06.	11:20:13	11:21:26	DCP	ja	
14	10.06.- 13.06.	11:13:34	11:15:11	Kontrolle	nein	
15	22.07.- 25.07.	13:49:42	13:56:56	Fluoranthen Standard	ja	
16	22.07.- 25.07.	13:28:14	13:50:20	Fluoranthen Passiv	ja	
17	22.07.- 25.07.	13:09:28	13:44:33	DCP	ja	
18	29.07.- 01.08.	13:48:05	13:46:40	Naphthalin Standard	ja	
19	29.07.- 01.08.	13:21:44	13:29:54	Naphthalin Passiv	ja	
20	29.07.- 01.08.	13:38:28	13:38:22	DCP	ja	
21	24.09.-			Fluoranthen	nein	nicht erfüllt

	27.09.			Passiv		
22	24.09. - 27.09			DCP		

Eine Übersicht der Wachstumsraten sowie Hemmungen für jeden Schadstoff ist den Ergebnissen sowie in den folgenden **Anhängen 8 bis 24** zu entnehmen.

II. 4. 2. Nominale und gemessene Konzentration

Mit den Erkenntnissen aus der Konzentrationsberechnung, Punkt II. 2. Seite 18 und den Literaturwerten für die Löslichkeiten der Schadstoffe wurden die voraussichtlichen Testkonzentrationen berechnet.

II. 4. 2. 1. Standard Dosierung

Die Konzentrationen der Standard Dosing Tests wurden aus den Literaturwerten hergeleitet:

Tabelle 13 Konzentrationen im Standard Dosing

	Fluoranthen		Naphthalin	
	Nominale Konzentration Wasser = 0,265 mg/L [mg/L]	Nominale Konzentration im ASW [mg/L]	Nominale Konzentration Wasser = 32 mg/L [mg/L]	Nominale Konzentration im ASW [mg/L]
V1	0,2650	0,1218	32,00	16,9509
V2	0,1325	0,0609	16,00	8,4755
V3	0,0663	0,0304	8,00	4,2377
	0,0331	0,0152	4,00	2,1189
V4	0,0166	0,0076	2,00	1,0594
V5	0,0083	0,0038	1,00	0,5297

$$c_{\text{Salzwasser}} = c_{\text{Wasser}} \cdot \frac{1600 \mu\text{L}}{2000 \mu\text{L}} \cdot \text{Aussalzungskonst.} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right]$$

II. 4. 2. 2. Passive Dosing

Um eine möglichst exakte Aussage über die im *Passive Dosing* Test vorliegenden Konzentrationen treffen zu können, wurden, neben der Nominalen Bestimmung mit Literaturwerten, während der gesamten Arbeit die Lösungen der verschiedenen Beladungs- und Extraktionsschritten koserviert und analysiert.

Somit konnten die Zusammenhänge aus der Literatur wiedergespiegelt und Abweichungen genau dokumentiert werden.

Folgende Lösungen wurden an der HPLC analysiert und ausgewertet:

II. 4. 2. 3. Fluoranthen – Passive Dosing

Tabelle 14 Gemessene Lösungen und Ringe aus den Passive Dosing MATs

	Lösung / Ring vom	Gemessen am
Methanol-Lösung zur Beladung der Ringe	27.05.2013	07.08.2013
	17.07.2013	08.08.2013
Extraktion der Ringe	17.07.2013	02.09.2013
	10.09.2013	18.09.2013
Bindwertproben in ASW aus dem MAT	25.07.2013	14.10.2013
	24.09.2013	14.10.2013

II. 4. 2. 4. Naphthalin – Passive Dosing**Tabelle 15 Gemessene Lösungen und Ringe aus den MATs mit Standard Dosierung**

	Lösung / Ring vom	Gemessen am
Methanol-Lösung zur Beladung der Ringe	17.07.2013	08.08.2013
	10.09.2013	17.09.2013
Extraktion der Ringe	10.09.2013	18.09.2013
Bindwertproben in ASW aus dem MAT	01.08.2013	21.10.2013

Für die Bestimmung der im Test vorliegenden Konzentrationen wurden Mittelwerte aus den verschiedenen Messungen herbeigezogen. Siehe Anhang VI. 4. Anhang 4 Konz. Berechnungen Fluoranthene Seite 61 und VI. 5. Anhang 5 Konz. Berechnungen Naphthalin Seite 62.

Die Formel zur Bestimmung der Endkonzentration im ASW lautet wie folgt:

$$c_{\text{Salzwasser}} = \frac{c_{\text{Methanol}} \cdot \text{Aussalzungskonst.} \cdot 1000}{K_{\text{Methanol:Silikonring}} \cdot K_{\text{Silikonring:Wasser}}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right]$$

Genaue Berechnungen und Herleitungen der folgenden Konzentrationen sind den Konzentrationsberechnungen unter dem Punkt II. 2. Konzentrationsberechnungen, Seite 18, zu entnehmen.

II. 4. 2. 5. Fluoranthene Konzentrationen – Passive Dosing**Tabelle 16 Gemessen und berechnete Konzentrationen in den Passive Dosing MATs**

	Mittelwert [mg/L]	Standardabweichung [mg/L]	SE vom Mittelwert in %
V1	0,090	0,012	13,2
V2	0,051	0,010	19,1
V3	0,025	0,005	19,8
	0,012	0,002	19,6
V4	0,006	0,001	17,4
V5	0,003	0,000	16,8

Siehe auch VI. 4. Anhang 4 Konz. Berechnungen Fluoranthene Seite 61

II. 4. 2. 6. Naphthalin Konzentrationen – Passive Dosing**Tabelle 17 Aus den Messungen berechnete Konzentrationen in den Passive Dosing MATs**

	Mittelwert [mg/L]	Standardabweichung [mg/L]	SE vom Mittelwert in %
V1	11,991	3,514	29,307
V2	7,443	1,546	20,771
V3	3,672	0,505	13,739
	1,874	0,179	9,549
V4	0,892	0,089	9,974
V5	0,467	0,011	2,252

Siehe auch VI. 5. Anhang 5 Konz. Berechnungen Naphthalin Seite 62

III. Ergebnisse

III. 1. Ergebnisse der HPLC Messungen

Alle Ergebnisse der HPLC Messungen und der daraus resultierenden Berechnungen der Konzentrationen sind folgenden Anhängen zu entnehmen:

- VI. 2. Anhang 2 HPLC Kalibrierung Fluoranthen Seite 59
- VI. 3. Anhang 3 HPLC Kalibrierung Naphthalin Seite 60
- VI. 4. Anhang 4 Konz. Berechnungen Fluoranthen Seite 61
- VI. 5. Anhang 5 Konz. Berechnungen Naphthalin Seite 62
- VI. 6. Anhang 6 HPLC Messergebnisse Fluoranthen Seite 63
- VI. 7. Anhang 7 HPLC Messergebnisse Naphthalin Seite 64

III. 2. Ergebnisse der MATs

Es folgen die Ergebnisse der prozentualen Wachstumshemmung der Proben zu den Wachstumsraten der negativ Kontrollen sowie die EC_{50} -Wert Berechnung und die Dosis-Wirkungs-Beziehungen.

Vorständige Auswertungen der Fluoreszenzmessungen, Wachstumskurven und Kontrollwachstumsraten sind den folgenden **Anhängen 8 bis 24** ab Seite 65 zu entnehmen:

III. 2. 1. Ergebnisse Fluoranthen Standard (Testnr.: 7 & 15)

Die Messung der Standard dosierten Proben ergab beim Fluoranthen in keiner Verdünnungsstufe eine Hemmung der Wachstumsrate.

Tabelle 18 MAT Ergebnisse Fluoranthen Standard Dosierung

Konzentration, Fluoranthen [mg/L]	Log(Konz.)	Wachstumshemmung [%]					
		Testnr. 7 04.06.2013			Testnr. 15 22.07.2013		
0,1218	-0,9145	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,0609	-1,2156	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,0304	-1,5166	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,0076	-2,1186	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,0038	-2,4197	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

III. 2. 2. Ergebnisse Naphthalin Standard (Testnr.: 11 & 18)

Die Messung der Standard dosierten Proben ergab beim Naphthalin in keiner Verdünnungsstufe eine Hemmung der Wachstumsrate.

Tabelle 19 MAT Ergebnisse Naphthalin Standard Dosierung

Konzentration, Naphthalin [mg/L]	Log(Konz.)	Wachstumshemmung [%]					
		Testnr. 11 10.06.2013			Testnr. 18 29.07.2013		
16,007	1,2043	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8,004	0,9033	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4,002	0,6023	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,001	0,0002	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,500	-0,3008	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

III. 2. 3. Fluoranthen *Passive Dosing* (Testnr.: 8 & 16)

Die Auswertung der MATs mit den passiven Schadstoffeinträgen des Fluoranthen in den Tests 8 und 16 ergab folgende prozentuale Hemmung der Wachstumsraten im Vergleich zur Kontrolle:

Tabelle 20 MAT Ergebnisse Fluoranthen *Passive Dosing*

Konzentration, Fluoranthen [mg/L]	Log(Konz.)	Wachstumshemmung [%]					
		Testnr. 8 04.06.			Testnr. 16 22.07.		
0,086	-1,065	33,71	23,77	36,45	22,45	25,51	23,83
0,049	-1,309	7,19	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00
0,024	-1,619	0,00	2,55	6,03	0,00	0,00	0,00
0,006	-2,221	6,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,003	-2,522	7,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 21 Fluoranthen Dosis-Wachstumshemmung im Vergleich zu der negativ Kontrolle

Hierbei ist eine deutliche und reproduzierbare prozentuale Hemmung der Wachstumsrate zwischen 22,45 % und 36,45 % bei der ersten Verdünnungsstufe V1 zu erkennen.

Die geringen Hemmungen bei den Verdünnungsstufen V2 bis V5 ließen sich nicht reproduzieren.

Weitere Zusammenhänge der Zellzahlen, Wachstumsraten und Messergebnisse sind den **Anhängen 8 bis 24 ab Seite 65** zu entnehmen.

Für eine genaue Bestimmung des EC₅₀-Wertes sollte eine Hemmung von mindestens 50 % vorliegen.

Aus diesen Hemmungen wurden mit Prism Graph folgende EC₅₀-Werte ermittelt:

Tabelle 22 Fluoranthen Ergebnisse der EC₅₀-Wert Berechnung durch Prism Graph 6

	04.06.	22.07.
	Best-fit values	
LogEC50	-0,9876	~ -1,052
HillSlope	4,386	~ 38,31
EC50	0,1029	~ 0,08864
	Std. Error	
LogEC50	0,02706	~ 15366
HillSlope	1,270	~ 4,490e+007
	95% Confidence Intervals	
LogEC50	-1,046 to -0,9291	(Very wide)
HillSlope	1,642 to 7,129	(Very wide)
EC50	0,08994 to 0,1177	(Very wide)
	Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	13	13
R square	0,8838	0,9966
Absolute Sum of Squares	251,0	4,697
Sy.x	4,394	0,6011

Da der Wert vom 22.07. ein sehr großes Konfidenzintervall besitzt ließe sich ein EC₅₀-Wert nur durch den Test vom 04.06. ermitteln: **EC₅₀ (95%) = 0,1029 ± 0,01296**

III. 2. 4. Kurven

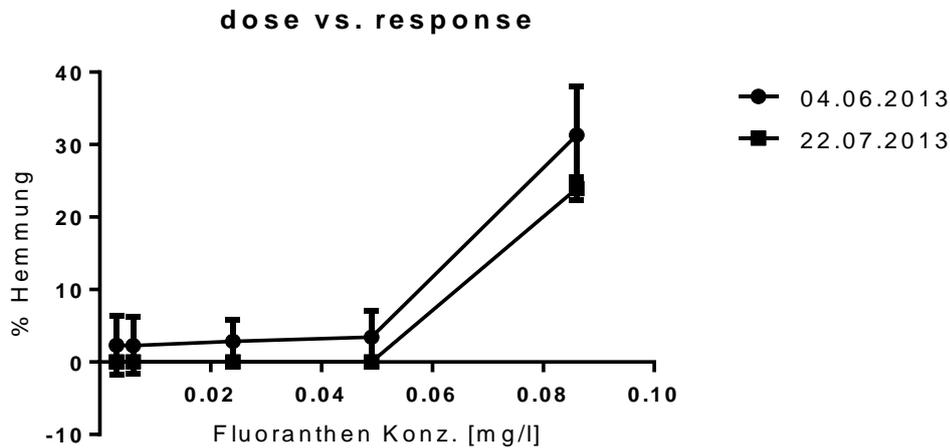


Abbildung 6 Wachstumshemmung aufgetragen gegen die Konzentration im MAT mit Fluoranthen

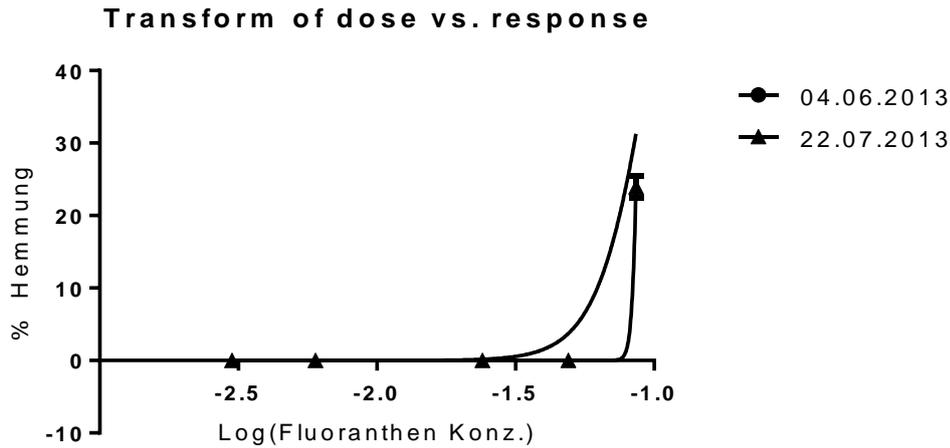


Abbildung 7 Dosis-Wirkungskurven im *Passive Dosing* MAT mit Fluoranthen

III. 2. 5. Ergebnisse Naphthalin *Passive Dosing* (Testnr.: 12 & 19)

Die Auswertung der MATs mit den passiven Schadstoffeinträgen des Naphthalin in den Tests 12 und 19 ergab folgende prozentuale Hemmung der Wachstumsraten im Vergleich zur Kontrolle:

Tabelle 23 MAT Ergebnisse Naphthalin *Passive Dosing*

Konzentration, Naphthalin [mg/L]	Log(Konz.)	Wachstumshemmung [%]					
		Testnr. 12			Testnr. 19		
		10.06.2013			29.07.2013		
11,991	1,0788	100,00	97,21	96,60	100,00	100,00	100,00
7,443	0,8717	90,93	92,64	90,13	81,59	76,30	70,77
3,672	0,56490	92,61	95,49	95,68	93,77	94,40	87,51
0,892	-0,04963	29,41	41,02	33,32	25,35	22,42	28,41
0,467	-0,33068	20,52	20,74	18,19	1,25	0,00	0,00

Tabelle 24 Naphthalin Dosis-Wachstumshemmung im Vergleich zu der negativ Kontrolle

Hierbei ist eine deutliche und reproduzierbare prozentuale Hemmung der Wachstumsrate zwischen 70,77 % und 100 % bei der Verdünnungsstufe V1 bis V3 zu erkennen.

Geringe Abweichungen zeigen sich bei den Verdünnungsstufen V4 und V5. Jedoch lassen sich einzelne Werte sowie die Tendenzen mit einander vergleichen

Weitere Zusammenhänge der Zellzahlen, Wachstumsraten und Messergebnisse sind den **Anhängen 21 und 15** zu entnehmen.

Aus diesen Hemmungen lassen sich nun folgende EC₅₀-Werte herleiten:

Tabelle 25 Naphthalin Ergebnisse der EC₅₀-Wert Berechnung durch Prism Graph 6

	04.06.2013	22.07.2013
	Best-fit values	
LogEC50	0,06411	0,1986

HillSlope	1,833	2,070
EC50	1,159	1,580
Std. Error		
LogEC50	0,02618	0,05853
HillSlope	0,1708	0,3579
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0,007544 to 0,1207	0,07215 to 0,3251
HillSlope	1,464 to 2,202	1,297 to 2,843
EC50	1,018 to 1,320	1,181 to 2,114
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	13	13
R square	0,9788	0,9305
Absolute Sum of Squares	356,4	1596
Sy.x	5,236	11,08

Daraus lässt sich folgender Mittelwert bilden:

Tabelle 26 Mittelwerte der EC₅₀-Werte aus den beiden *Passive Dosing* MATs

Mittelwert EC ₅₀ [mg/L]	Standardabweichung [mg/L]	Variationskoeffizient [%]
1,3695	0,3	21,7

III. 2. 6. Kurven

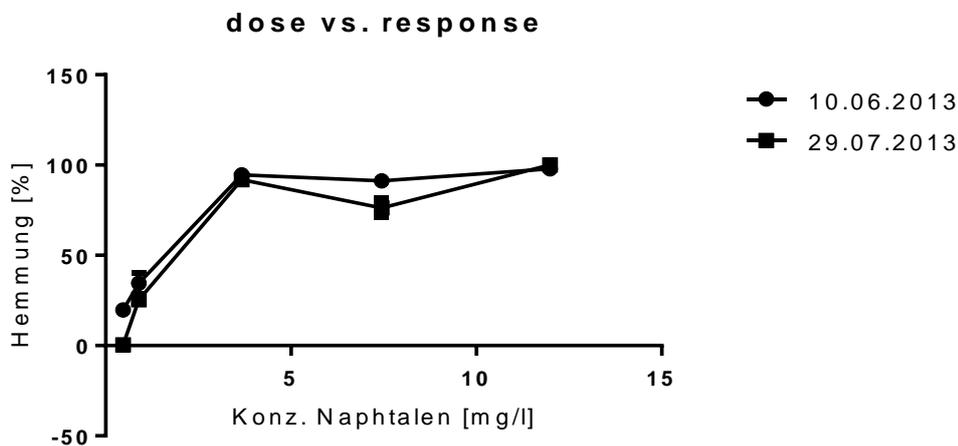


Abbildung 8 Wachstumshemmung aufgetragen gegen die Konzentration im MAT mit Naphthalin

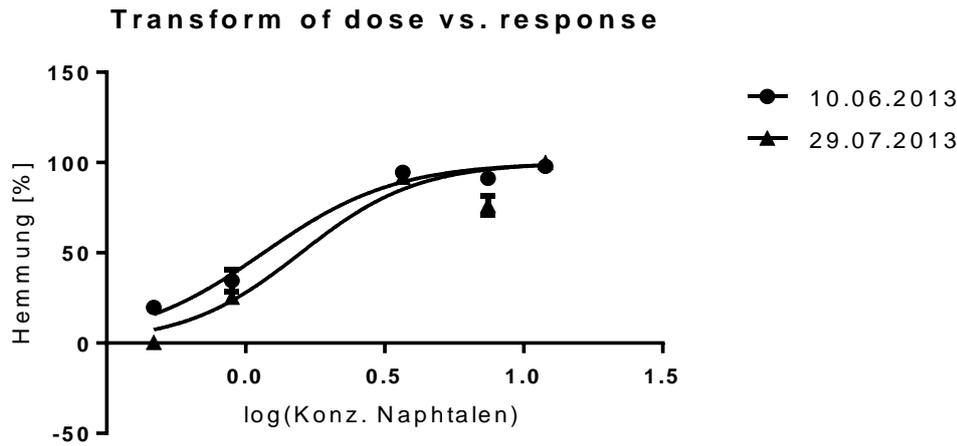


Abbildung 9 Dosis-Wirkungskurven im *Passive Dosing* MAT mit Fluoranthen

III. 2. 7. Ergebnisse DCP (Nr.: 4, 9, 13, 17, 20 & 22)

Für die Einhaltung der Gültigkeitskriterien wurde bei jedem Testlauf eine 24well Testplatte mit 3,5-DCP mit getestet. Hierfür ergaben sich folgende Hemmungen:

Tabelle 27 MAT Ergebnisse DCP erster Teil

Konz. DCP	Log(Konz.)	Hemmung [%]							
		Testnr. 13			Testnr. 9			Testnr. 4	
[mg/L]		22.07			29.07			24.09	
8,00	0,903	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4,00	0,602	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2,00	0,301	47,86	54,35	49,80	42,34	47,50	41,93	54,79	62,51
1,00	0,000	10,30	8,21	11,59	10,97	11,04	12,49	7,14	6,17
0,50	-0,301	0,44	0,00	0,00	1,93	1,01	0,20	0,00	0,00

Tabelle 28 MAT Ergebnisse DCP zweiter Teil

Konz. DCP	Log(Konz.)	Hemmung [%]							
		Testnr. 17			Testnr. 20			Testnr. 22	
[mg/L]		22.07			29.07			24.09	
8,00	0,903	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
4,00	0,602	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
2,00	0,301	39,68	38,09	37,26	18,24	20,72	17,91	35,26	57,23
1,00	0,000	7,29	5,44	6,27	3,19	0,59	2,45	26,93	29,57
0,50	-0,301	4,81	2,20	2,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Daraus ergeben sich folgende EC₅₀-Werte

Tabelle 29 DCP Ergebnisse der EC₅₀-Wert Berechnung durch Prism Graph 6

	10.06.	04.06.	13.05.	22.07.	29.07.	24.09.
Best-fit values						

LogEC50	0,2905	0,3160	0,2623	0,3336	0,3542	0,2551
HillSlope	4,141	4,288	3,948	6,091	11,88	2,563
EC50	1,952	2,070	1,829	2,156	2,260	1,799
Std. Error						
LogEC50	0,008237	0,01089	0,01065	0,008066	0,04192	0,04288
HillSlope	0,4030	0,5926	0,4060	1,146	9,366	0,5820
95% Confidence Intervals						
LogEC50	0,2727 to 0,3083	0,2925 to 0,3395	0,2393 to 0,2853	0,3162 to 0,3511	0,2636 to 0,4447	0,1562 to 0,3540
HillSlope	3,270 to 5,011	3,008 to 5,568	3,071 to 4,825	3,614 to 8,568	-8,357 to 32,11	1,221 to 3,905
EC50	1,874 to 2,034	1,961 to 2,185	1,735 to 1,929	2,071 to 2,244	1,835 to 2,784	1,433 to 2,259
Goodness of Fit						
Degrees of Freedom	13	13	13	13	13	8
R square	0,9941	0,9890	0,9914	0,9949	0,9993	0,9396
Absolute Sum of Squares	161,3	294,4	234,7	140,6	21,21	965,1
Sy.x	3,523	4,759	4,249	3,289	1,277	10,98

Hieraus ergibt sich nun folgender Mittelwert:

Tabelle 30 Mittelwert der EC₅₀-Werte der DCP MATs

Mittelwert [mg/L]	Standardabweichung [mg/L]	Abweichung zum Ringversuch [%]
2,011	0,18	25,5

Folgender Wert wird in der DIN EN ISO 10253:2006 als Ergebnis von Ringversuchen angegeben.

Tabelle 31 DIN EN ISO 10253:2006, Tabelle 3 – Ergebnisse des Ringversuchs

Ringversuch [mg/L]	Standardabweichung [mg/L]	Variationskoeffizient [%]
2,7	0,2	8,6

Ergebnis: Der Test ist verglichen mit den Ringversuchen zu sensitiv

III. 2. 8. Kurven

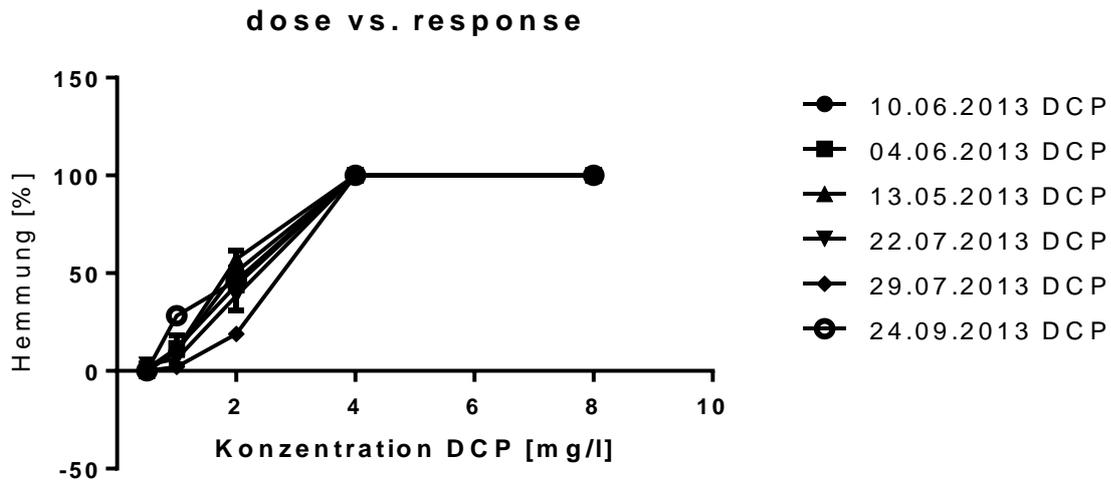


Abbildung 10 Wachstumshemmung aufgetragen gegen die Konzentration im MAT mit DCP

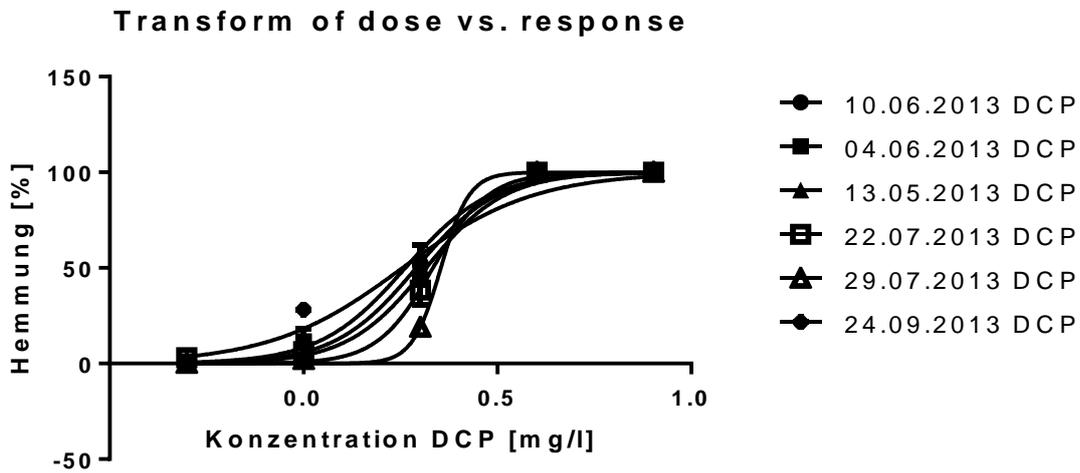


Abbildung 11 Dosis-Wirkungskurven im MAT mit DCP

III. 3. Diskussion

Die im Punkt II. 3. 13. erwähnten Gültigkeitskriterien wurden im Großteil der durchgeführten MATs eingehalten. Tests bei denen diese Kriterien nicht erfüllt waren wurden verworfen:

- a) Die Zelldichte der Kontrolle muss in den 72 Stunden mindestens um den Faktor 16 zugenommen haben. Dies entspricht einer spezifischen Wachstumsrate von 0,9 je Tag und 0,0375 pro Stunde:
Mit Wachstumsraten der Kontrollen zwischen 0,037 und 0,051 wurde dieses Kriterium eingehalten.
- b) Der Variationskoeffizient der spezifischen Wachstumsraten sollte 7 % nicht überschreiten:
Dabei variieren die Wachstumsraten der einzelnen Replikate zwischen 3 % und 5 %.
- c) Der pH-Wert darf sich während der Tests nicht um mehr als $\pm 1,0$ verändern:
Auch dieses Kriterium wurde durch pH-Wert Messungen vor und nach den Tests eingehalten.

Die durchgeführten 3,5-Dichlorphenol Tests verliefen gut und die Ergebnisse ließen sich sehr gut reproduzieren. Einzig die Abweichung des ermittelten EC_{50} -Wertes, zu dem Wert aus den Ringversuchen, aus der DIN EN ISO 10253: 2006 zeigt, dass der Test etwas zu sensitiv ist.

Im Hinblick auf die unterschiedlichen Effekte zwischen dem *Passive Dosing* und der Standard Dosierung mit wässriger Lösung wird besonders deutlich, dass die Effekte des *Passive Dosing* wesentlich größer sind als diese der Standard Dosierung, wo fast keine Effekte festgestellt werden konnten.

Die unterschiedlichen Löslichkeiten sowie das Gefährdungspotential von Fluoranthen und Naphthalin spiegeln sich auch in den Ergebnissen des *Passive Dosing* wieder. Bei Fluoranthen wurde selbst bei maximaler Konzentration nur eine Hemmung von ca. 30 % erreicht. Naphthalin zeigte hingegen aufgrund der besseren Löslichkeit sowie der höheren akuten Toxizität bereits ab einer Konzentration von ca. 3,672 mg/L (4:1 Verdünnung) eine fast vollständige Hemmung.

Bei fast allen ermittelten EC_{50} -Werten ist das 95% Konfidenzintervall sehr groß. Dies liegt daran, dass weder beim Fluoranthen noch beim Naphthalin der Bereich der Hemmung von 0 % bis 100 % vollständig abgedeckt werden konnten.

Fluoranthen erreichte selbst bei maximaler Konzentration nur eine Hemmung zwischen 22,45 % und 36,45 %. Daher ist das 95% Konfidenzintervall bei der Extrapolation durch Prism Graph 6 sehr groß. Der aus den ersten Versuchsergebnissen abgeleitete EC_{50} -Wert von 0,1029 mg/L hat ein 95% Konfidenzintervall von 0,08994 mg/L bis 0,1177 mg/L. Das 95% Konfidenzintervall für den zweiten EC_{50} -Wert ($\sim 0,08864$ mg/L) ist sehr weit.

Bei dem Naphthalin wird eine vollständige Hemmung schon bei der 4:1 Verdünnung erreicht. Daher fehlen hier Ergebnisse für den Bereich der unteren Grenze der Hemmung. Die sich aus den beiden Versuchsergebnissen abgeleiteten EC_{50} -Werte: 1,159 mg/L und 1,580 mg/L haben ein 95% Konfidenzintervall von 1,018 mg/L bis 1,320 mg/L und 1,181 mg/L bis 2,114 mg/L.

Dennoch haben sich die Ergebnisse des ersten Versuches in der Wiederholung mit einer Standardabweichung um den Mittelwert von ca. 20 % relativ gut reproduzieren lassen.

Zudem liegen ermittelten EC_{50} -Werte unterhalb der Wasserlöslichkeit, weshalb auch durch diese Schadstoffe von schwerwiegenden Folgen für die aquatische Umwelt auszugehen ist.

Auffällig waren außerdem, die an der HPLC gemessenen Konzentrationen der beiden untersten Verdünnungsstufen, der *Passive Dosing* Blindwert-Lösungen aus den MATs, von Fluoranthen und Naphthalin. Während die Abweichungen zu den berechneten Konzentrationen bei den Verdünnungsstufen V1 bis V3 nur ca. 25 % betrug gab es bei den Stufen V4 und V5 weit über 100% Abweichung. Siehe dazu VI. 4. Anhang 4 Konz. Berechnungen Fluoranthen Seite 61 und VI. 5. Anhang 5 Konz. Berechnungen Naphthalin Seite 62 jeweils die gemessenen Konzentrationen im ASW.

Dabei war außerdem die gemessene Konzentration von V5 immer fast doppelt so hoch wie diese von V4.

Gründe für die nicht festgestellten Effekte des Standard Dosing Tests könnten beim Fluoranthen die sehr geringe Wasserlöslichkeit, Adsorption an den Gefäßwänden sowie die hohe Bioakkumulation und zusätzlich beim Naphthalin der geringe Dampfdruck sein.

Die Löslichkeiten im Methanol sowie die Verteilungen durch die Silikonringe erwiesen sich in der Analyse mit einer maximalen Abweichung in dem Mittelwert von 20 % als relativ konstant.

Allerdings lagen die gemessenen Konzentrationen im Methanol immer relativ weit unterhalb der Literaturangaben. Als Grund dafür sind die geringeren Temperaturen in dem Labor anzunehmen.

Bei der Messung der Fluoranthen und Naphthalin Standards konnte festgestellt werden, dass diese auch nach zwei wöchiger Lagerung und ohne vorherige Ultraschallung relativ konstant geblieben waren.

III. 4. Schlussfolgerung

Abschließend ist festzuhalten, dass die durchgeführten Tests sich bei einfacher Wiederholung gut reproduzieren ließen. Dies macht eine qualitative Aussage über die toxischen Effekte in den beiden Testverfahren möglich. Allerdings ist eine genaue quantitative Aussage über die Effekte aufgrund der Abweichungen zwischen 13 und 30 % bei der Konzentrationsberechnung sowie den hohen Konfidenzintervallen bei den ermittelten EC₅₀-Werten nicht gewährleistet.

III. 5. Ausblick für weitere Tests:

Um sicherere Aussagen bei der EC₅₀-Wert Bestimmung und über die Verteilungen der Schadstoffe in den Tests machen zu können, sollte ein Verfahren entwickelt werden, mit welchem man sowohl in dem Standard Dosierte Tests als auch in den *Passive Dosing* Tests die gewünschten Konzentrationen möglichst exakt herstellen kann.

IV. Danksagungen

Ich danke den Mitarbeitern aus dem Ökotox-, Instrumentelle Analytik- und Biologi Laboren. Vor allem geht mein Dank an Herrn Robin Ernst, der mich bei meiner Laborarbeit stets fleißig unterstützt hat.

Des weiteren Danke ich auch Frau Prof. Dr. Witt und Frau Prof. Dr. Floeter, die mich unterstützt und mir die Möglichkeit zu dieser Arbeit gegeben haben.

Sowie den Gruppen des Umweltanalytik Praktikums für ihre Pionierarbeit und Herrn Philipp Mayer von der Aarhus Universität in Dänemark.

V. Literaturverzeichnis

Acree, Jr.W.E., Abraham, M.H. „Solubility predictions for crystalline polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dissolved in organic solvents based upon the Abraham general solvation model; Gefunden über: Open Notebook Science, Solubility of fluoranth.“
<http://lxsrv7.oru.edu/~alang/onsc/solubility/ugidata.php?solute=fluoranthene&solvent=methanol> (Stand 06.12.2013), 2002.

AGS, Ausschuss für Gefahrstoffe. „Begründung zu Naphthalin in TRGS 900.“ 2011.

AGS, Ausschuss für Gefahrstoffe. *TRGS 900: Grenzwerte in der Luft am Arbeitsplatz "Luftgrenzwerte"*. Ausgabe 2006, 2013.

Altec Products Limited. *British Standard Metric Silicone 'O' Rings, Innendurchmesser: 9,60mm, Außendurchmesser: 14,40mm, Querschnitt: 2,40mm, Material: Silicone, Härte: 70°Shore'A', Bestellnummer: ORS-0096-24*. 06. 12 2013.

<http://www.altecproducts.co.uk/home.asp?cat=Subcategory8220&kw=> (Zugriff am 06. 12 2013).

BAuA, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. „BUA Stoffbericht 39: Naphthalin.“ Bib. der TUHH, VCH 06/89.

Biolabor. „Berechnung des EC50-Wertes mit GraphPad Prism 6.“ 2013.

Buder, M., Heseding, J., Floeter, C., Witt, G. „Passive Dosing im marinen Algentest zur Bestimmung der Wachstumshemmung von *Phaeodactylum tricornutum* durch Phenanthren.“ 2013.

Deutsches Institut für Normung e.V., DIN. „DIN EN ISO 10253, Wasserbeschaffenheit - Wachstumshemmtest mit marinen Algen *Skeletonema costatum* und *Phaeodactylum tricornutum*.“ 2006.

DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft. „MAK- und BAT-Werte-Liste 2013, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 49.“ 2013.

DFG, Deutsche Forschungsgemeinschaft. „Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten; Naphthalin MAK.“ 2012.

DGUV, Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung. „IFA Report 1/2013 Grenzwerteliste 2013.“ 2013.

en.Wikipedia.org. *Fluoranthene*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluoranthene>.

en.wikipedia.org. *Naphthalene*. 04. 12 2013. <http://en.wikipedia.org/wiki/Naphthalene> (Zugriff am 06. 12 2013).

EPA, U.S. Environmental Protection Agency. „Priority Pollutants List.“ kein Jahr.

European Chemicals Bureau. *Technical Guidance Document on Risk Assessment Part II*. Institute for Health and Consumer Protection, 2003.

Fent, Karl. *Ökotoxikologie: Umweltchemie - Toxikologie - Ökologie*. Thieme, 2013.

Floeter, Prof. Dr. C. **Bestimmung der Zellzahl von *Phaeodactylum tricornutum* mit der Naubauer improved Zählkammer.** Arbeitsanweisung, Biologielabor: Arbeitsanweisungen des Praktikum Umweltanalytik und Ökotoxikologie (UAP), 2013.

Floeter, Prof. Dr. C. **Erstellung einer Kalibriergeraden Zellzahl – Fluoreszenz auf 24well Mikroliterplatte mit *Phaeodactylum tricornutum*.** Arbeitsanweisung, Biologielabor: Arbeitsanweisungen des Praktikum Umweltanalytik und Ökotoxikologie (UAP), 2013.

Floeter, Prof. Dr. C. **Pipettierschemata für UAP 24well-MPs.** Biologielabor: Arbeitsanweisungen des Praktikum Umweltanalytik und Ökotoxikologie (UAP), 2013.

GESTIS-Stoffdatenbank Fluo., Institut für Arbeitsschutz (IFA). **Fluoranthen.** 06. 12 2013.
[http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/030010.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/030010.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0)
(Zugriff am 06. 12 2013).

GESTIS-Stoffdatenbank Naph., Institut für Arbeitsschutz (IFA). **Naphthalin.** 06. 12 2013.
[http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/015510.xml?f=templates\\$fn=default.htm\\$3.0](http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/015510.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0)
(Zugriff am 06. 12 2013).

GISCHEM, Gefahrstoffinformationssystem Chemie. **Naphthalin Datenblatt.**
http://www.gischem.de/download/01_0-000091-20-3-000000_1_1_1.PDF:
Berufsgenossenschaft Rohstoffe und chemische Industrie (BG RCI), 2013.

Gold, G., und S. Rodriguez. „The effect of temperature and salinity on the Setschenow parameters of naphthalene in seawater.“ Department of Chemistry, University of the Pacific, Stockton, CA 95211, U.S.A, 1988.

Hillenbrand, T., Marscheider-Weidemann, F., Strauch, M., Heitmann, K.
„Wasserrahmenrichtlinie, Forschungsvorhaben: Emissionsminderung für prioritäre und prioritäre gefährliche Stoffe der; Prioritäre Stoffe der Wasserrahmenrichtlinie: Datenblatt PAK.“ 2006.

HSDB, Hazardous Substances Data Bank. **Fluoranthene.** <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+5486>: TOXNET Toxicology, Data Network, U.S. National Library of Medicine, 06.12.2013.

HSDB, Hazardous Substances Data Bank. **Naphthalene.** <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+184>: TOXNET Toxicology Data Network, U.S. National Library of Medicine, 06.12.2013.

IARC, (International Agency for Research on Cancer). **Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man.** <http://monographs.iarc.fr/index.php> : World Health Organization, Volume 32.

Jonker, Michiel T.O., und Barry Muijsr. **Using solid phase micro extraction to determine salting-out (Setschenow) constants for hydrophobic organic chemicals.** Utrecht, Netherlands: Institute for Risk Assessment Sciences, Utrecht University, 2010.

Klöpffer, Walter. **Verhalten und Abbau von Umweltchemikalien.** Wiley-VCH, 2012.

Könemann, H. „Relationship for 50 industrial pollutants. .“ **Toxicology**, 19. 03 1981: 209-221.

mdl. Mitteilung Floeter, C. 2013.

O'Neil, M.J. (ed.). *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th Edition.* Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001.

OSPAR Commission. *Background Document on Hazardous Substances Series.* Hazardous Substances Series, 2009.

OSPAR Convention. „List of Chemicals for Priority Action.“ 2011.

Riedel, Erwin. *Anorganische Chemie 8. Auflage.* De Gruyter, 2011.

Sagunski, Dr. H., Heger, W. *Richtwerte für die Innenraumluft: Naphthalin.* Behörde für Umwelt und Gesundheit Hamburg, Umweltbundesamt, Berlin, 2004.

Shayanfar, A., S. Soltani, F. Jabbaribar, und A.A., Acree, Jr.W.E. and Jouyban, A. Hamidi. „Naphthalene Solubility in Binary Solvent Mixtures of 2,2,4-Trimethylpentane + Alcohols at 298.15 K.“ <http://lxsrv7.oru.edu/~alang/onsc/solubilit>, 2008.

Smith, K.E.C., G.J. Oostingh, und P. Meyer. „Passive Dosing for Producing Defined and Constant Exposure of Hydrophobic Organic Compounds during in Vitro Toxicity Tests; Chem. Res. Toxicol. 2010, 23, 55-65;.“ 2009.

Smith, K.E.C., N. Dom, R. Blust, und P. Mayer. „Controlling and maintaining exposure of hydrophobic organic compounds in aquatic toxicity tests by passive dosing; Aquatic Toxicology.“ *ELSEVIER*, 12. 01 2010.

Umweltbundesamt. „Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe - Umweltschädlich! Giftig! Unvermeidbar?“ Berlin, 2012.

— *Umweltprobenbank des Bundes, Home, Steckbriefe, Analyte, Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe, Fluoranthen:.* 2013.

<http://www.umweltprobenbank.de/de/documents/profiles/analytes/10088> (Zugriff am 24. 10 2013).

Verordnung (EG) Nr. 1272/2008. „Über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen; Anhang 1: Vorschriften für die Einstufung und Kennzeichnung von Gefährlichen Stoffen und Gemischen, 31.12.2008.“ 2008.

WHO, World Health Organisation. „Leitlinien für Innenraumluftqualität: ausgewählte Schadstoffe.“ 2011.

VI. Anhang

Tabelle 32 Liste alle Anhänge

Nummer	Name
VII. 1.	Anhang 1 Durchführungsvorschriften <ul style="list-style-type: none"> • SOP Fluoranthen • SOP Naphthalin
VII. 2.	Anhang 2 HPLC Kalibrierung Fluoranthen
VII. 3.	Anhang 3 HPLC Kalibrierung Naphthalin
VII. 4.	Anhang 4 Konz. Berechnungen Fluoranthen
VII. 5.	Anhang 5 Konz. Berechnungen Naphthali
VII. 6.	Anhang 6 HPLC Messergebnisse Fluoranthen
VII. 7.	Anhang 7 HPLC Messergebnisse Naphthalin
VII. 8.	Anhang 8 Auswertung Test 3
VII. 9.	Anhang 9 Auswertung Test 4
VII. 10.	Anhang 10 Auswertung Test 6
VII. 11.	Anhang 11 Auswertung Test 7
VII. 12.	Anhang 12 Auswertung Test 8
VII. 13.	Anhang 13 Auswertung Test 9
VII. 14.	Anhang 14 Auswertung Test 11
VII. 15.	Anhang 15 Auswertung Test 12
VII. 16.	Anhang 16 Auswertung Test 13
VII. 17.	Anhang 17 Auswertung Test 15
VII. 18.	Anhang 18 Auswertung Test 16
VII. 19.	Anhang 19 Auswertung Test 17
VII. 20.	Anhang 20 Auswertung Test 18
VII. 21.	Anhang 21 Auswertung Test 19
VII. 22.	Anhang 22 Auswertung Test 20
VII. 23.	Anhang 23 Auswertung Test 21
VII. 24.	Anhang 24 Auswertung Test 22

VI. 1. Anhang 1 Durchführungsvorschriften

Die Arbeitsschritte der Beladung und Berechnung der Silikonringe für die Biotests ist in den folgenden zwei Vorschriften (Standard Operating Procedures (SOPs)) dokumentiert.

Eine allgemeine Vorschrift, ohne die spezifischen Stoffeigenschaften von Fluoranthen und Naphthalin, ist der SOP im Anhang zu entnehmen.

Grundlage dieser Arbeitsvorschriften sind die Paper:

- Smith, K.E.C.; Dom, N.; Blust, R.; Mayer, P.: Controlling and maintaining exposure of hydrophobic organic compounds in aquatic toxicity tests by *Passive Dosing*; Aquatic Toxicology, ELSEVIER, 12.01.2010
- Smith, K.E.C.; Oostingh, G.J.; Meyer, P.: *Passive Dosing* for Producing Defined and Constant Exposure of Hydrophobic Organic Compounds during in Vitro Toxicity Tests; Chem. Res. Toxicol. 2010, 23, 55-65; Received 08.08.2009

Sowie die gesammelten praktischen Erfahrungen im Labor bei der Beladung der Ringe.

VI. 1. 1. SOP Fluoranthen

Diese Standard Operating Procedure (SOP) entsteht auf Grundlage des Papers von Smith et al. (Smith, Dom, et al. 2010) (Smith, Oostingh und Meyer 2009). den Anleitungen des Umwelt Analytik Praktikums (Floeter 2013) sowie der Laborarbeit im Rahmen der Laborarbeit im Rahmen der Bachelorarbeit von Konopka, K.-F.¹⁰

Zeitaufwand ca. 76 Stunden.

Aufgrund der Toxizität von Fluoranthen ist auf eine sichere und verantwortungsvolle Arbeitsweise zu achten.

Arbeitsgeräte	
Laborwaage	Hohe Genauigkeit, unter einem Abzug stehend
Wägeschiffchen	
Spatel / Pinzette	Für die Gefäße geeignet
Papiertaschentücher	
Alufolie	Ausgeheizt
12 ASE Gläser mit Deckel	Oder vergleichbare geeignete Geräte
30 Silikonringe	6 Verdünnungen á 5 Ringen
Messkolben	50 mL
Fluoranthen	Feststoff, 99% Reinheit
Vollpipette	5 mL / 10 mL / 20 mL
Methanol	
n-Hexan	
ASW	

¹⁰ Konopka, K.-F.: Effekte von ausgewählten PAKs im marinen Algentest: *Passive Dosing* versus Standard Dosierung mit wässriger Lösung

VI. 1. 1. 1. Wichtige Werte und Funktionen

V_{Methanol}	Volumen des Methanol für einen Silikon Ring	(VII. 1. 1)
$V_{\text{PDMS}} = \frac{m_{\text{Silikon}}}{\rho_{\text{PDMS}}}$	Volumen des Silikon Rings	(VII. 1. 2)
$c_{\text{Methanol}} = c_{\text{Silikon}} \cdot K_{\text{Methanol,Silikon}}$	Schadstoffkonzentration in der Methanol Lösung	(VII. 1. 3)
$c_{\text{Silikon}} = \frac{c_{\text{Methanol}}}{K_{\text{Methanol,Silikon}}}$	Schadstoffkonzentration im Silikon Ring	(VII. 1. 4)
$c_{\text{Wasser}} = c_{\text{Silikon}} \cdot K_{\text{Wasser,Silikon}}$	Schadstoffkonzentration in wässriger Lösung	(VII. 1. 5)
$K_{\text{Methanol,Silikon}} = \frac{c_{\text{Methanol}}}{c_{\text{Silikon}}}$	Verteilungskoeffizient Methanol zu Silikon	(VII. 1. 6)
$K_{\text{Silikon,Methanol}} = \frac{c_{\text{Silikon}}}{c_{\text{Methanol}}}$	Verteilungskoeffizient Silikon zu Methanol	(VII. 1. 7)
$K_{\text{Silikon,Wasser}} = \frac{c_{\text{Silikon}}}{c_{\text{Wasser}}}$	Verteilungskoeffizient Silikon zu Wasser	(VII. 1. 8)
$K_{\text{Wasser,Silikon}} = \frac{c_{\text{Wasser}}}{c_{\text{Silikon}}}$	Verteilungskoeffizient Wasser zu Silikon	(VII. 1. 9)

VI. 1. 1. 2. Wichtige Stoffeigenschaften (Fluoranthen)

$K_{\text{Silikon,Methanol}} =$	0,252 [L L ⁻¹]	(VII. 1. 10)
$K_{\text{Methanol,Silikon}} =$	3,97 [L L ⁻¹]	(VII. 1. 11)
$K_{\text{Silikon,Wasser}} =$	15986 [L L ⁻¹]	(VII. 1. 12)
$K_{\text{Wasser,Silikon}} =$	0,00006255 [L L ⁻¹]	(VII. 1. 13)
$c_{\text{Löslichkeit,Fluoranthen,Methanol}} =$	13,15 [g/L] bei 25°C ¹¹	(VII. 1. 14)
$c_{\text{Löslichkeit,Fluoranthen,Wasser}} =$	0,000265 [g/L] bei 25°C ¹²	(VII. 1. 15)
<i>Anzahl der benötigten Ringe</i> =	4 + 1 = 5	(VII. 1. 16)

VI. 1. 1. 3. Vorbereitung der Ringe

Um störende Einflüsse von anderen Stoffen auszuschließen, müssen die Ringe vor der Beladung wie folgt gereinigt werden:

1. Über Nacht in Ethylacetat einlegen
2. Drei Mal über Nacht in Methanol einlegen
3. Drei Mal über Nacht in Reinstwasser einlegen

Die gereinigten Ringe sollten bis zur Beladung in Reinstwasser im Kühlschrank konserviert werden. Vor der Beladung sind die Ringe mit einem fusselfreien Tuch zu trocknen.

VI. 1. 1. 4. Schadstoffverbrauch im Methanol verhindern

Die Schadstoffmenge im Methanol sollte durch die Beladung der Ringe nicht um mehr als 5% reduziert werden. Daher muss die Menge des Schadstoffe im Methanol viel größer sein, als der Ring aufnehmen kann. Die Mindestmenge an Methanol für einen Ring wird wie folgt bestimmt:

¹¹ (Acree 2002)

¹² (IARC Volume 32)

$$\begin{aligned}
0,95 &= \frac{c_{\text{Methanol}} \cdot V_{\text{Methanol}}}{c_{\text{Methanol}} \cdot V_{\text{Methanol}} + c_{\text{Silikon}} \cdot V_{\text{Silikon}}} <=> 0,95 = \frac{1}{1 + \frac{c_{\text{Silikon}} \cdot V_{\text{Silikon}}}{c_{\text{Methanol}} \cdot V_{\text{Methanol}}}} <=> \\
0,95 &= \frac{1}{1 + K_{\text{Silikon,Methanol}} \frac{V_{\text{Silikon}}}{V_{\text{Methanol}}}} <=> \frac{1}{0,95} = 1 + K_{\text{Silikon,Methanol}} \frac{V_{\text{Silikon}}}{V_{\text{Methanol}}} <=> \\
\frac{1}{0,95} - 1 &= K_{\text{Silikon,Methanol}} \frac{V_{\text{Silikon}}}{V_{\text{Methanol}}} <=> \frac{\left(\frac{1}{0,95} - 1\right)}{K_{\text{Silikon,Methanol}} \cdot V_{\text{Silikon}}} = \frac{1}{V_{\text{Methanol}}} <=> \\
\frac{K_{\text{Silikon,Methanol}} \cdot V_{\text{Silikon}}}{\left(\frac{1}{0,95} - 1\right)} &= V_{\text{Methanol}} <=> \\
\frac{0,252 \cdot 0,000201[\text{L}]}{\left(\frac{1}{0,95} - 1\right)} &= V_{\text{MeOH}} = 0,000962 [\text{L}] \\
V_{\text{MeOH,Gerundet}} &= 0,001 [\text{L}] \quad (\text{VII. 1. 17})
\end{aligned}$$

Das Ergebnis soll für einen Verbrauch von unter 95% und einfacheren Handhabung aufgerundet werden.

VI. 1. 1. 5. Ansetzen der gesättigten Methanol Lösung

Ist die Mindestmenge an benötigter Methanol-Lösung für einen Ring bestimmt (17), muss nun die gesättigte Lösung dafür angesetzt werden. Hierbei muss die Anzahl der Ringe sowie die spätere 1:1 Verdünnung berücksichtigt werden:

$$V_{\text{Methanol,Ges.Lsg.}} = V_{\text{Methanol,Gerundet}} (\text{VII. 1. 17}) \cdot 2 (\text{verdünnung}) \cdot \text{Anzahl Ringe} (\text{VII. 1. 16})$$

$$V_{\text{Methanol,Ges.Lsg.}} = 0,001 [\text{L}] \cdot 2 \cdot 5 = 0,01 [\text{L}] = 10 [\text{mL}] \quad (\text{VII. 1. 18})$$

$$m_{\text{Schadstoff}} = c_{\text{Löslichkeit,Schadstoff,Methanol}} (\text{VII. 1. 14}) \cdot V_{\text{Methanol,Ges.Lsg.}} (\text{VII. 1. 18})$$

$$m_{\text{Schadstoff}} = 13,15 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right] \cdot 0,01[\text{L}]$$

$$m_{\text{Schadstoff}} = 0,1315 [\text{g}] \quad (\text{VII. 1. 19})$$

$$\text{Einwaage} = 0,2[\text{g}] \quad (\text{VII. 1. 20})$$

Die Einwaage sollte in etwa um den Faktor 1,2 höher sein als die errechnete Menge.

Da die Lösung gesättigt sein muss, **sollte sich ein Teil des Schadstoffes nicht lösen.**

Die Lösung sollte nun bis zur vollständigen Sättigung auf einen Schüttler gestellt werden. Die Lösung ist gesättigt, sobald keine Schlieren in Richtung Methanol mehr an den restlichen Feststoffen zu erkennen sind.

Die Lösung darf nicht in ein Ultraschallbad gestellt werden, da sich sonst zunächst mehr Feststoff löst und anschließend stark ausflockt. **Es darf nur unter dem Abzug mit Handschuhen und mit großer Vorsicht gearbeitet werden!**

VI. 1. 1. 5. 1. Ansetzen der gesättigten ASW Lösung

Zugleich sollte man 50 mL der gesättigte ASW-Lösung für den parallel laufenden Standard Dosing Test ansetzen. Dafür ergibt sich mit der Löslichkeit für Wasser folgende Mindestmenge:

$$m_{\text{Fluoranthren}} = c_{\text{Löslichkeit, Schadstoff, Wasser}} \text{ (VII. 1. 15)} \cdot V_{\text{ASW}} \text{ (s. Text)} = 0,000265 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] \cdot 0,05 \text{ L} \\ = \mathbf{0,0000132 \text{ g} \approx 0,00002 \text{ g}}$$

Da die Lösung hier auch wieder gesättigt sein soll, sollte die Einwaage etwas höher sein. Die Aussalzung wurde hier noch nicht berücksichtigt, kann aber erst einmal vernachlässigt werden. Die Lösung muss vor Licht geschützt und kühl aufbewahrt werden.

VI. 1. 1. 6. Verdünnung

Die gesättigte Lösung wird nun in 6 Schritten in geeigneten Gefäßen, z.B. ASE-Gläser, immer je 1:1 verdünnt. So erhält man folgende Lösungen mit entsprechenden Volumina und nominalen Konzentrationen:

V_{MeOH}	V_{PDMS}	c_{MeOH}	c_{Wasser}	Anzahl Ringe		
0,005	0,000201	13,15	0,000252	5		
$K_{(\text{MeOH:PDMS})}$	$K_{(\text{PDMS:MeOH})}$	$K_{(\text{PDMS:Wasser})}$	$K_{(\text{Wasser:PDMS})}$	Setschernow Konst.	Aussalzungs Konst.	
3,97	0,25	15986	0,00006			
$m_{\text{MeOH, min}}$	$m_{\text{MeOH, min, round}}$	$m_{\text{MeOH, min, round, alle}}$	$m_{\text{Schadstoff}}$	$m_{\text{Schadstoff, Faktor, A}}$		
0,00096	0,00100	0,01	0,132	0,2		
	Ges. Lsg.	2:1	4:1	8:1	16:1	32:1
	V1	V2	V3		V4	V5
c_{MeOH}	13,15	6,58	3,29	1,64	0,82	0,41
c_{PDMS}	3,31	1,66	0,83	0,41	0,21	0,10
c_{Wasser}	0,00020720	0,00010360	0,00005180	0,00002590	0,00001295	0,00000648
Volumen	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
Anzahl Ringe	5	5	5		5	5

$$c_{\text{Silikon, V1}} = \frac{c_{\text{Methanol, V1}}}{K_{\text{Methanol, Silikon}}} = \frac{13,15 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right]}{3,97 [-]} = 3,31 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] \quad (\text{VII. 1. 21})$$

$$c_{\text{Wasser, V1}} = \frac{c_{\text{Silikon, V1}} \text{ (VII 1. 21)}}{K_{\text{Silikon, Wasser}}} = \frac{3,31 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right]}{15986 [-]} = 0,000207 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] \quad (\text{VII. 1. 22})$$

VI. 1. 1. 7. Beladungsdauer

Die vollständige Beladung der Ringe erfolgt bereits nach 24 Stunden. (Smith, Oostingh und Meyer 2009, 59, Figure 1) Zur Sicherheit sollten die Ringe aber mindestens **72 Stunden** in den Lösungen gehalten werden.

VI. 1. 1. 8. Entnahme und Spülung

Die Ringe werden nach 72 Stunden entnommen und auf Papiertüchern getrocknet.

Nach der Trocknung müssen alle äußerlich sichtbaren Kristalle vorsichtig, mit Handschuhen(!), mit einem möglichst wenig fuselnden Tuch entfernt werden.

Anschließend werden alle Ringe in sauberen ASE-Gläsern **je drei Mal eine Stunde mit 1 ml Reinstwasser pro Ring** gespült.

Warum können die Ringe mit dem Reinstwasser gespült werden, ohne dass zu viel Schadstoff verloren geht?

$$c_{\text{Wasser}} = c_{\text{Silikon}} \cdot K_{\text{Wasser,Silikon}}$$

$$c_{\text{Wasser}} = 3,31 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] \cdot 0,00006$$

$$c_{\text{Wasser}} = 0,000198 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] \equiv 0,198 \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right]$$

$$\text{Anteil } x = \frac{c_{\text{Wasser}} \cdot V_{\text{Wasser}}}{c_{\text{Wasser}} \cdot V_{\text{Wasser}} + c_{\text{Silikon}} \cdot V_{\text{Silikon}}}$$

$$x = \frac{1}{1 + K_{\text{Silikon,Wasser}} \frac{V_{\text{Silikon}}}{V_{\text{Wasser}}}}$$

$$x = \frac{1}{1 + 15986[-] \cdot \frac{0,000201[\text{L}]}{0,001[\text{L}]}}$$

$$x = 0,000311 = 0,03\%$$

Der Anteil vom Schadstoffauftrag in das Reinstwasser ist mit 0,03% sehr gering. Bei drei Spülgängen mit je 1 ml Reinstwasser entspricht dies eine Reduktion der Konzentration um 0,09%

VI. 1. 1. 9. Konservierung

Die gespülten Ringe werden nun zum trocknen auf Papiertücher gelegt, abgetupft und in Alufolie gewickelt im Gefrierschrank gelagert.

Die Ringe sind so einige Wochen haltbar.

Die Lösungen sollten für eine spätere Messung ebenfalls konserviert werden. Z.B. je 1 ml in GC-Vials, welche auch in einem Gefrierschrank gelagert werden sollten.

VI. 1. 1. 10. HPLC Mesung

Um die Konzentrationen sicher bestimmen zu können, sollten die angesetzten Lösungen am 3. Versuchstag an der HPLC gemessen werden.

Verdünnung der Beladelösungen: 1:2.000, ASW Lösung: 1:1 oder unverdünnt.

Siehe dazu Methodenentwicklung und Messung an der HPLC.

VI. 1. 2. SOP Naphthalin

Diese Standard Operating Procedure (SOP) entsteht auf Grundlage des Papers von Smith et al. (Smith, Dom, et al. 2010) (Smith, Oostingh und Meyer 2009). den Anleitungen des Umwelt Analytik Praktikums (Floeter 2013) sowie der Laborarbeit im Rahmen der Bachelorarbeit von Konopka, K.-F.¹³ und des Umweltanalytik Praktikum 2013.

Zeitaufwand ca. 76 Stunden.

Aufgrund der Toxizität der Stoffe ist auf eine sichere und verantwortungsvolle Arbeitsweise zu achten.

Arbeitsgeräte	
Laborwaage	Hohe Genauigkeit, unter einem Abzug stehend
Wägeschiffchen	
Spatel / Pinzette	Für die Gefäße geeignet
Papiertaschentücher	
Alufolie	Ausgeheizt
12 ASE Gläser mit Deckel	Oder vergleichbare geeignete Geräte
30 Silikonringe	6 Verdünnungen á 5 Ringen
Messkolben	50 mL
Naphthalin	Feststoff, 99% Reinheit
Vollpipette	5 mL / 10 mL / 20 mL
Methanol	
n-Hexan	
ASW	

VI. 1. 2. 1. Wichtige Werte und Funktionen

V_{Methanol}	Volumen des Methanol für einen Silikon Ring	(VII. 2. 1)
$V_{PDMS} = \frac{m_{\text{Silikon}}}{\rho_{PDMS}}$	Volumen des Silikon Rings	(VII. 2. 2)
$c_{\text{Methanol}} = c_{\text{Silikon}} \cdot K_{\text{Methanol,Silikon}}$	Schadstoffkonzentration in der Methanol Lösung	(VII. 2. 3)
$c_{\text{Silikon}} = \frac{c_{\text{Methanol}}}{K_{\text{Methanol,Silikon}}}$	Schadstoffkonzentration im Silikon Ring	(VII. 2. 4)
$c_{\text{Wasser}} = c_{\text{Silikon}} \cdot K_{\text{Wasser,Silikon}}$	Schadstoffkonzentration in wässriger Lösung	(VII. 2. 5)
$K_{\text{Methanol,Silikon}} = \frac{c_{\text{Methanol}}}{c_{\text{Silikon}}}$	Verteilungskoeffizient Methanol zu Silikon	(VII. 2. 6)
$K_{\text{Silikon,Methanol}} = \frac{c_{\text{Silikon}}}{c_{\text{Methanol}}}$	Verteilungskoeffizient Silikon zu Methanol	(VII. 2. 7)
$K_{\text{Silikon,Wasser}} = \frac{c_{\text{Silikon}}}{c_{\text{Wasser}}}$	Verteilungskoeffizient Silikon zu Wasser	(VII. 2. 8)
$K_{\text{Wasser,Silikon}} = \frac{c_{\text{Wasser}}}{c_{\text{Silikon}}}$	Verteilungskoeffizient Wasser zu Silikon	(VII. 2. 9)

¹³ Konopka, K.-F.: Effekte von ausgewählten PAKs im marinen Algentest: Passive Dosing versus Standard Dosierung mit wässriger Lösung

VI. 1. 2. 2. Wichtige Stoffeigenschaften (Naphthalin)

$$K_{\text{Silikon,Methanol}} = 0,36 \text{ [L L}^{-1}\text{]} \quad (\text{VII. 2. 10})$$

$$K_{\text{Methanol,Silikon}} = 2,78 \text{ [L L}^{-1}\text{]} \quad (\text{VII. 2. 11})$$

$$K_{\text{Silikon,Wasser}} = 704 \text{ [L L}^{-1}\text{]} \quad (\text{VII. 2. 12})$$

$$K_{\text{Wasser,Silikon}} = 0,00142 \text{ [L L}^{-1}\text{]} \quad (\text{VII. 2. 13})$$

$$c_{\text{Löslichkeit,Naphthalin,Methanol}} = 69,212 \text{ [g/L] bei } 25^{\circ}\text{C}^{14} \quad (\text{VII. 2. 14})$$

ggf. weitere Werte:
76,92 [g/L] bei ??°C¹⁵

$$c_{\text{Löslichkeit,Naphthalin,Wasser}} = 0,032 \text{ [g/L] bei } 20^{\circ}\text{C}^{16} \quad (\text{VII. 2. 15})$$

$$\text{Anzahl der benötigten Ringe} = 4 + 1 = 5 \quad (\text{VII. 2. 16})$$

VI. 1. 2. 3. Vorbereitung der Ringe

Um störende Einflüsse von anderen Stoffen auszuschließen, müssen die Ringe vor der Beladung wie folgt gereinigt werden:

1. Über Nacht in Ethylacetat einlegen
2. Drei Mal über Nacht in Methanol einlegen
3. Drei Mal über Nacht in Reinstwasser einlegen

Die gereinigten Ringe sollten bis zur Beladung in Reinstwasser im Kühlschrank konserviert werden. Vor der Beladung sind die Ringe mit einem fusselfreien Tuch zu trocknen.

VI. 1. 2. 4. Schadstoffverbrauch im Methanol verhindern

Die Schadstoffmenge im Methanol sollte durch die Beladung der Ringe nicht um mehr als 5% reduziert werden. Daher muss die Menge des Schadstoffes im Methanol viel größer sein, als der Ring aufnehmen kann. Die Mindestmenge an Methanol für einen Ring wird wie folgt bestimmt:

$$0,95 = \frac{c_{\text{Methanol}} \cdot V_{\text{Methanol}}}{c_{\text{Methanol}} \cdot V_{\text{Methanol}} + c_{\text{Silikon}} \cdot V_{\text{Silikon}}} \quad \Leftrightarrow \quad 0,95 = \frac{1}{1 + \frac{c_{\text{Silikon}} \cdot V_{\text{Silikon}}}{c_{\text{Methanol}} \cdot V_{\text{Methanol}}}} \quad \Leftrightarrow$$

$$0,95 = \frac{1}{1 + K_{\text{Silikon,Methanol}} \frac{V_{\text{Silikon}}}{V_{\text{Methanol}}}} \quad \Leftrightarrow \quad \frac{1}{0,95} = 1 + K_{\text{Silikon,Methanol}} \frac{V_{\text{Silikon}}}{V_{\text{Methanol}}} \quad \Leftrightarrow$$

$$\frac{1}{0,95} - 1 = K_{\text{Silikon,Methanol}} \frac{V_{\text{Silikon}}}{V_{\text{Methanol}}} \quad \Leftrightarrow \quad \frac{\left(\frac{1}{0,95} - 1\right)}{K_{\text{Silikon,Methanol}} \cdot V_{\text{Silikon}}} = \frac{1}{V_{\text{Methanol}}} \quad \Leftrightarrow$$

$$\frac{K_{\text{Silikon,Methanol}} \cdot V_{\text{Silikon}}}{\left(\frac{1}{0,95} - 1\right)} = V_{\text{Methanol}} \quad \Leftrightarrow$$

¹⁴ (Shayanfar, et al. 2008)

¹⁵ (O'Neil 2001)

¹⁶ (GESTIS-Stoffdatenbank Naph. 2013)

$$\frac{0,36 \cdot 0,000201[\text{L}]}{\left(\frac{1}{0,95} - 1\right)} = V_{\text{MeOH}} = 0,00137 [\text{L}]$$

$$V_{\text{MeOH, Gerundet}} = 0,002 [\text{L}] \quad (\text{VII. 2. 17})$$

Das Ergebnis soll für einen Verbrauch von unter 95% und einfacheren Handhabung aufgerundet werden.

VI. 1. 2. 5. Ansetzen der gesättigten Methanol Lösung

Ist die Mindestmenge an benötigter Methanol-Lösung für einen Ring bestimmt (III. 3. 17), muss nun die gesättigte Lösung dafür angesetzt werden. Hierbei muss die Anzahl der Ringe sowie die spätere 1:1 Verdünnung berücksichtigt werden:

$$V_{\text{Methanol, Ges. Lsg.}} = V_{\text{Methanol, Gerundet}} (\text{VII. 2. 17}) \cdot 2 (\text{verdünnung}) \cdot \text{Anzahl Ringe} (\text{VII. 2. 16})$$

$$V_{\text{Methanol, Ges. Lsg.}} = 0,002 [\text{L}] \cdot 2 \cdot 5 = 0,02 [\text{L}] = 20 [\text{mL}] \quad (\text{VII. 2. 18})$$

$$m_{\text{Schadstoff}} = c_{\text{Löslichkeit, Schadstoff, Methanol}} (\text{VII. 2. 14}) \cdot V_{\text{Methanol, Ges. Lsg.}} (\text{VII. 2. 18})$$

$$m_{\text{Schadstoff}} = 69,212 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right] \cdot 0,02 [\text{L}]$$

$$m_{\text{Schadstoff}} = 1,384 [\text{g}] \quad (\text{VII. 2. 19})$$

$$\text{Einwaage} = 1,7 [\text{g}] \quad (\text{VII. 2. 20})$$

Die Einwaage sollte in etwa um den Faktor 1,2 höher sein als die errechnete Menge.

Da die Lösung gesättigt sein muss **sollte sich ein Teil des Schadstoffes nicht lösen.**

Die Lösung sollte nun bis zur vollständigen Sättigung auf einen Schüttler gestellt werden. Die Lösung ist gesättigt, sobald keine Schlieren in Richtung Methanol mehr an den restlichen Feststoffen zu erkennen sind.

Die Lösung darf nicht in ein Ultraschallbad gestellt werden, da sich sonst zunächst mehr Feststoff löst und anschließend stark ausflockt. **Es darf nur unter dem Abzug mit Handschuhen und mit großer Vorsicht gearbeitet werden!**

VI. 1. 2. 6. Ansetzen der gesättigten ASW Lösung

Zugleich sollte man 50 mL der gesättigte ASW-Lösung für den parallel laufenden Standard Dosing Test ansetzen. Dafür ergibt sich mit der Löslichkeit für Wasser folgende Mindestmenge:

$$m_{\text{Naphthalin}} = c_{\text{Löslichkeit, Schadstoff, H}_2\text{O}} (\text{VII. 2. 15}) \cdot V_{\text{ASW}} (\text{s. Text}) = 0,032 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right] \cdot 0,05 \text{ L} = 0,0016 \text{ g}$$

Da die Lösung hier auch wieder gesättigt sein soll, sollte die Einwaage etwas höher sein. Die Aussalzung wurde hier noch nicht berücksichtigt, kann aber erst einmal vernachlässigt werden. Die Lösung muss vor Licht geschützt und kühl aufbewahrt werden.

VI. 1. 2. 7. Verdünnung

Die gesättigte Lösung wird nun in 6 Schritten in geeigneten Gefäßen, z.B. ASE-Gläser, immer je 1:1 verdünnt. So erhält man folgende Lösungen mit entsprechenden Volumina und Konzentrationen:

V_{MeOH}	V_{PDMS}	c_{MeOH}	c_{Wasser}	Anzahl Ringe		
0,005	0,000201	69,212	0,032	5		
$K_{(\text{MeOH:PDMS})}$	$K_{(\text{PDMS:MeOH})}$	$K_{(\text{PDMS:Wasser})}$	$K_{(\text{Wasser:PDMS})}$	Setschernow Konst.	Aussalzungs Konst.	
2,78	0,36	704	0,00142			
$m_{\text{MeOH,min}}$	$m_{\text{MeOH,min,rou}}$	$m_{\text{MeOH,min,rou}}$	$m_{\text{Schadstoff}}$	$m_{\text{Schadstoff,Fakt}}$		
0,00137	0,00200	0,02	1,384	1,7		
	Ges. Lsg.	2:1	4:1	8:1	16:1	32:1
	V1	V2	V3		V4	V5
c_{MeOH}	69,21	34,61	17,30	8,65	4,33	2,16
c_{PDMS}	24,90	12,45	6,22	3,11	1,56	0,78
c_{Wasser}	0,0354	0,0177	0,0088	0,0044	0,0022	0,0011
Volumen	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
Anzahl Ringe	5	5	5		5	5

$$c_{\text{Silikon,V1}} = \frac{c_{\text{Methanol,V1}}}{K_{\text{Methanol,Silikon}}} = \frac{69,212 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right]}{2,78[-]} = 24,89 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] \quad (\text{VII. 2. 21})$$

$$c_{\text{Wasser,V1}} = \frac{c_{\text{Silikon,V1}} (\text{VII 2. 21})}{K_{\text{Silikon,Wasser}}} = \frac{24,89 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right]}{704[-]} = 0,0354 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] \quad (\text{VII. 2. 22})$$

VI. 1. 2. 8. Beladung

Die vollständige Beladung der Ringe erfolgt bereits nach 24 Stunden (Smith, Oostingh und Meyer 2009, 59, Figure 1). Zur Sicherheit sollten die Ringe aber mindestens **72 Stunden** in den Lösungen gehalten werden.

VI. 1. 2. 9. Entnahme und Spülung

Die Ringe werden nach 72 Stunden mit entnommen und auf Papiertüchern getrocknet.

Nach der Trocknung müssen alle äußerlich sichtbaren Kristalle vorsichtig, mit Handschuhen(!), mit einem möglichst wenig fuselnden Tuch entfernt werden.

Anschließend werden alle Ringe in sauberen ASE-Gläsern **je drei Mal eine Stunde mit 1 ml Reinstwasser pro Ring** gespült.

Warum können die Ringe mit dem Reinstwasser gespült werden, ohne dass zu viel Schadstoff verloren geht?

$$c_{\text{Wasser}} = c_{\text{Silikon}} \cdot K_{\text{Wasser,Silikon}}$$

$$c_{\text{Wasser}} = 24,90 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] \cdot 0,00142$$

$$c_{\text{Wasser}} = 0,035 \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] \equiv 35,35 \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right]$$

$$\text{Anteil } x = \frac{c_{\text{Wasser}} \cdot V_{\text{Wasser}}}{c_{\text{Wasser}} \cdot V_{\text{Wasser}} + c_{\text{Silikon}} \cdot V_{\text{Silikon}}}$$

$$x = \frac{1}{1 + K_{\text{Silikon,Wasser}} \frac{V_{\text{Silikon}}}{V_{\text{Wasser}}}}$$

$$x = \frac{1}{1 + 704[-] \cdot \frac{0,000201[\text{L}]}{0,001[\text{L}]}}$$

$$x = 0,00701 = 0,7\%$$

Der Anteil vom Schadstoffaustrag in das Reinstwasser ist mit 0,7% sehr gering. Bei drei Spülgängen mit je 1 ml Reinstwasser entspricht dies eine Reduktion der Konzentration um 2,1%

VI. 1. 2. 10. Konservierung

Die gespülten Ringe werden nun zum trocknen auf Papiertücher gelegt, abgetupft und in Alufolie gewickelt im Gefrierschrank gelagert.

Die Ringe sind so einige Wochen haltbar.

Die Lösungen sollten für eine spätere Messung ebenfalls konserviert werden. Z.B. je 1 ml in GC-Vials, welche auch in einem Gefrierschrank gelagert werden sollten.

VI. 1. 2. 11. HPLC Mesung

Um die Konzentrationen sicher bestimmen und Abweichungen bei den Löslichkeiten früh feststellen zu können, sollten die angesetzten Lösungen am 3. Versuchstag an der HPLC gemessen werden.

Dabei müssen die hoch konzentrierten methanolischen Beladelösungen stark herunter verdünnt werden.

Siehe dazu: **II. 2. 5 Messung an der HPLC ab Seite 20**

VI. 2. Anhang 2 HPLC Kalibrierung Fluoranthen

VI. 3. Anhang 3 HPLC Kalibrierung Naphthalin

VI. 4. Anhang 4 Konz. Berechnungen Fluoranthen

VI. 5. Anhang 5 Konz. Berechnungen Naphthalin

VI. 6. Anhang 6 HPLC Messergebnisse Fluoranthen

VI. 7. Anhang 7 HPLC Messergebnisse Naphthalin

VI. 8. Anhang 8 Auswertung Test 3

VI. 9. Anhang 9 Auswertung Test 4

VI. 10. Anhang 10 Auswertung Test 6

VI. 11. Anhang 11 Auswertung Test 7

VI. 12. Anhang 12 Auswertung Test 8

VI. 13. Anhang 13 Auswertung Test 9

VI. 14. Anhang 14 Auswertung Test 11

VI. 15. Anhang 15 Auswertung Test 12

VI. 16. Anhang 16 Auswertung Test 13

VI. 17. Anhang 17 Auswertung Test 15

VI. 18. Anhang 18 Auswertung Test 16

VI. 19. Anhang 19 Auswertung Test 17

VI. 20. Anhang 20 Auswertung Test 18

VI. 21. Anhang 21 Auswertung Test 19

VI. 22. Anhang 22 Auswertung Test 20

VI. 23. Anhang 23 Auswertung Test 21

VI. 24. Anhang 24 Auswertung Test 22
