

Ökotoxikologische Spurenuntersuchungen
mehrerer
nordbayerischer Fließgewässer

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Cristina Velasco-Schön

geboren in Osterode am Harz

Bayreuth, Januar 2003

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Mai 1998 bis Januar 2003 im Arbeitskreis von Herrn Prof. H. Frank am Lehrstuhl für Umweltchemie und Ökotoxikologie der Universität Bayreuth angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Einreichung der Dissertation:	08.01.03
Zulassung durch die Promotionskommission:	15.01.03
Wissenschaftliches Kolloquium:	24.06.03

Prof. Dr. H. Frank	1. Gutachter
Prof. Dr. R. Herrmann	2. Gutachter
Prof. Dr. C. Unverzagt	Vorsitzender
Prof. Dr. E. Matzner	
Prof. Dr. C. Engels	Vertretung von Prof. Dr. Herrmann
Prof. Dr. K. Bitzer	

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich in verschiedenster Weise während der Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Frank danke ich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Bereitstellung dieses interessanten Themas. In stillem Andenken an Herrn Prof. Herrmann, möchte ich meinen Dank für die Erstellung des Gutachtens ausdrücken, das er trotz der schwierigen Umstände geschrieben hat.

Desweiteren gilt mein Dank:

Herrn Dr. Michael Reissinger für seine stete Diskussionsbereitschaft, die vielen wertvollen Anregungen und seine Hilfe bei der Korrektur des Manuskripts.

Frau Agnes Bednorz für die Durchführung zahlreicher aufwendiger Biotests und Herrn Will für viele wertvolle Ratschläge bei analytischen Fragestellungen im Bereich der Massenspektrometrie. Ebenso Herrn Markus Scholz für die AOX-Untersuchungen.

Dr. Martina Giese möchte ich für die Einführung in das Arbeiten mit biologischen Tests danken. Ebenso danke ich Thomas Haas, Wolfgang Weigl und Stephanie Bopp, die mir durch die Erstellung ihrer Diplomarbeiten geholfen haben, weitere Einblicke in das weite Feld der Ökotoxikologie zu erhalten. Besonders aber danke ich Stephanie Bopp, die den miniaturisierten Algentest am Lehrstuhl eingeführt hat. Auch Cordula Nieslony für die Unterstützung bei der Probenahme der Fischzuchtquelle sei gedankt. Wolfgang Völkl möchte ich für seine regen Diskussionen während seiner Zeit am Lehrstuhl danken.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit, insbesondere Dr. Eugen Christoph, Dr. Ibrahim Hassan, Dr. Radek Cabala, Kamila Jakubowska, Manuela Hollmach, Dr. Carsten Bräuer, Ellen Straube, Andreas Römpf, Dr. M.E.M. ElNour und Magarida Temudo.

Gedankt sei außerdem Frau Hilpert und Frau Lauterbach für ihre Hilfsbereitschaft in allen verwaltungstechnischen und organisatorischen Fragen.

Darüber hinaus bin ich meinem Mann und meiner Familie dankbar, von denen ich immer Unterstützung erhalten habe.

Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1: Physikalisch-chemische Eigenschaften der Leitsubstanzen.....	20
Tab. 4.2: Anwendung, Stoffklasse und physiologische Eigenschaften der Leitsubstanzen.....	21
Tab. 4.3: Nachweisgrenzen für die HPLC-DAD- Methode ohne Aufarbeitung	32
Tab. 4.4: Wiederfindung und Wiederholbarkeit für einige Leitsubstanzen.....	33
Tab. 4.5: LC Parameter	38
Tab. 4.6: Molekülmassen und deren Fragmente im positiven Modus.....	39
Tab. 4.7: Molekülmassen und deren Fragmente im negativen Modus	42
Tab. 4.8: Nachweisgrenzen für die LC-MS/MS Methode ohne Aufarbeitung	44
Tab. 4.9: Nachweisgrenzen für die gesamte Methode einschließlich Aufarbeitung	45
Tab. 4.10: Wiederfindungsraten und Variationskoeffizient; neutrale Anreicherung, gemessen im positiven MRM-Modus.....	47
Tab. 4.11: Wiederfindungsraten und Korrelationskoeffizienten für die saure Anreicherung.....	47
Tab. 4.12: Verhältnis der Steigungsfaktoren einer wässrigen und einer dotierten Kalibriergeraden....	50
Tab. 5.1: Variationskoeffizienten der ausgewerteten Fluoreszenzparameter für die unbelastete Kontrolle	82
Tab. 5.2: Variationskoeffizienten der ausgewerteten Fluoreszenzparameter für die Atrazin-Kontrolle	82
Tab. 5.3: EC ₁₀ -Werte [72 h] einiger Leitsubstanzen.....	88
Tab. 5.4: EC ₁₀ -Werte organischer Lösungsmittel im Microtox TM -Test.....	90
Tab. 5.5: EC-Werte von Herbiziden im Microtox TM -Test	91
Tab. 5.6: Literatur EC ₅₀ -Werte von Pestiziden im Microtox TM -Test.....	92
Tab. 5.7: EC ₁₀ -Werte der Lösungsmittel im Algenfluoreszenztest	93
Tab. 5.8: EC ₁₀ -Werte der Leitsubstanzen im Algenfluoreszenztest.....	94
Tab. 8.1: Fließgewässer der Fränkischen Schweiz.....	129
Tab. 8.2: Fließgewässer Nordostoberfrankens	129
Tab. 8.3: Nachweisgrenzen der Ionenanalytik	130
Tab. 8.4: Leitfähigkeit der untersuchten Proben	131
Tab. 8.5: pH-Werte der untersuchten Proben	131
Tab. 8.6: AOX-Konzentrationen	132
Tab. 8.7: DOC-Konzentrationen	132
Tab. 8.8: UV-Absorptionsmaxima der Leitanalyten.....	135
Tab. 8.9: Chromatographische Bedingungen für die HPLC-DAD-Methode.....	135
Tab. 8.10: Einstellungen am APCI-3000 für alle Analyten gemessen im positiven Modus	136
Tab. 8.11: Einstellungen am APCI-3000 für alle Analyten gemessen im negativen Modus.....	136
Tab. 8.12: Nährmedium nach Kuhl.....	137

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Kartenausschnitte der beiden Regionen Fränkische Schweiz und Nordostoberfranken	7
Abb. 3.2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Leitwerte während der Messperiode	13
Abb. 3.3: DOC-Gehalte in den untersuchten Fließgewässern	14
Abb. 3.4: AOX-Gehalte in den untersuchten Fließgewässern	16
Abb. 3.5: Nitrat-Gehalte und Chlorid-Gehalte der Fließgewässer in der Fränkischen Schweiz	17
Abb. 3.6: Nitrat-Gehalte und Chlorid-Gehalte in den Bächen	18
Abb. 4.1: Atrazin und Desethylatrazin	22
Abb. 4.2: MCPA und 2,4-D	23
Abb. 4.3: Diuron, Isoproturon und Monolinuron	24
Abb. 4.4: Metazachlor und Metolachlor	25
Abb. 4.5: Bromacil	25
Abb. 4.6: Bromoxynil	26
Abb. 4.7: 3,4-Dichloranilin und 3-Chlor-4-methylanilin	27
Abb. 4.8: Fließschema für den geplanten Ablauf der ökotoxikologischen und analytischen Untersuchung der Fließgewässerproben	28
Abb. 4.9: Fließschema für die SPE-Extraktion einschließlich Vorfraktionierung	30
Abb. 4.10: HPLC-UV-Chromatogramme von SPE-Extrakten einer Quelle, eines Flusswassers und eines Kläranlagenauslaufs	32
Abb. 4.11: Ablauf der Ionenbildung in der Ionensprayquelle	35
Abb. 4.12: Fragmentierungsvorschlag für Atrazin	40
Abb. 4.13: Fragmentierungsvorschlag für Desethylatrazin	40
Abb. 4.14: Fragmentierungsvorschlag für Metazachlor	40
Abb. 4.15: Fragmentierungsvorschlag für Metolachlor	40
Abb. 4.16: Fragmentierungsvorschlag für Isoproturon	41
Abb. 4.17: Fragmentierungsvorschlag für Diuron	41
Abb. 4.18: Fragmentierungsvorschlag für Monolinuron	41
Abb. 4.19: Fragmentierungsvorschlag für Bromacil	41
Abb. 4.20: Fragmentierungsvorschlag für 3,4-Dichloranilin	41
Abb. 4.21: Fragmentierungsvorschlag für 3-Chlor-4-methylanilin	41
Abb. 4.22: Fragmentierungsvorschlag für MCPA	42
Abb. 4.23: Fragmentierungsvorschlag für 2,4-D	42
Abb. 4.24: Fragmentierungsvorschlag für 2,4-DNP	43
Abb. 4.25: Fragmentierungsvorschlag für 2,4-DP	43
Abb. 4.26: Fragmentierungsvorschlag für Bromoxynil	43
Abb. 4.27: Fragmentierungsvorschlag für 3,4,5-Trichlorphenol	43
Abb. 4.28: Chromatogramm der Leitsubstanzen in wässriger Lösung (0,5 µg/L), gemessen im positiven Modus	46
Abb. 4.29: Aufgearbeitete Eichgerade - c_{ist} aufgetragen gegen c_{soll}	48
Abb. 4.30: Bestimmung der Konzentration von Atrazin und Desethylatrazin in aufgearbeiteten und nicht aufgearbeiteten Wasserproben der Fischzuchtquelle	49
Abb. 4.31: Steigungsfaktoren von Isoproturon aus Kalibriergeraden zwischen 0,1-10 µg/L aufgetragen über die Zeit	49
Abb. 4.32: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Aufseß-Quelle	52
Abb. 4.33: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Aufseß bei Oberaufseß	53
Abb. 4.34: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Aufseß hinter der Kläranlage Aufseß	54
Abb. 4.35: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Leinleiter Quelle	54
Abb. 4.36: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Leinleiter bei Gasseldorf	55
Abb. 4.37: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Wiesent bei Kirchehrenbach	55
Abb. 4.38: Herbizidkonzentrationen von Dezember 2000 bis April 2001 in der Quelle der Fischzuchtanlage von Aufseß	56
Abb. 4.39: Herbizidkonzentrationen von Juli 2000 bis April 2001 an den Probenahmestellen des Mähringsbachs	57
Abb. 4.40: Herbizidkonzentrationen von Juli 2000 bis April 2001 an den Probenahmestellen des Zinnbachs	57
Abb. 4.41: Verhältnis von Atrazin und Desethylatrazin in den untersuchten Fließgewässern von Juni 2000 - April 2001 (Fränkische Schweiz) bzw. Juli 2000 - April 2001 (Nordostoberfranken)	58

Abb. 4.42: Mediane und Vertrauensintervalle sowie Maxima und Minima für das Konzentrationsverhältnis von Atrazin und Desethylatrazin aller untersuchten Proben	59
Abb. 5.1: Eichung der Photodiode.....	68
Abb. 5.2: Korrelation zwischen Zellzahl und Extinktion.....	69
Abb. 5.3: Wachstumskurve in Titerplatten von <i>C. reinhardtii</i> und <i>S. capricornutum</i>	70
Abb. 5.4: Fließschema für den Mikrotiterplattentest.....	71
Abb. 5.5: Dosis-Wirkungsbeziehung von Bromacil im Algenwachstumstest	73
Abb. 5.6: Kontrollkarten für Wachstumsraten von <i>C. reinhardtii</i> und <i>S. capricornutum</i>	79
Abb. 5.7: Positive Kontrollen von <i>C. reinhardtii</i>	80
Abb. 5.8: Positive Kontrollen von <i>S. capricornutum</i>	80
Abb. 5.10: 1. SPE-Eluat vier verschiedener Festphasen im Microtox TM -Test.....	83
Abb. 5.11: SPE-Eluate vier verschiedener Festphasen im Microtox TM -Test.....	84
Abb. 5.12: SPE-Blindwerte im Algenwachstumstest.....	84
Abb. 5.13: Microtox EC ₅₀ -Werte der Lösungsmittel.....	91
Abb. 5.14: Korrelation zwischen Polarität und dem EC ₁₀ -Wert.....	94
Abb. 5.15: Effekte von Standardmischungen im Algenwachstumstest.....	96
Abb. 5.16: Vergleich der Effekte von Extrakten im Microtox TM -Test verschiedener Sorbentien	97
Abb. 5.17: Vergleich der Effekte von Flusswasser- und Abwasser verschiedener Sorbentien im Algentest mit <i>C. reinhardtii</i>	97
Abb. 5.18: Vergleich der Effekte von Flusswasser- und Abwasser-Extrakten verschiedener Sorbentien im Algenfluoreszenztest mit <i>C. reinhardtii</i>	98
Abb. 5.19: EC ₅₀ -Werte eines Gemisches von Leitsubstanzen.....	101
Abb. 5.20: Extrakte der Aufseßquelle im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001	103
Abb. 5.22: Extrakte der Aufseßquelle im Microtox TM -Test von Juli 2000 bis April 2001	103
Abb. 5.23: Extrakte der Aufseß/Oberaufseß im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001 ...	104
Abb. 5.24: Extrakte der Aufseß/Oberaufseß im Microtox TM -Test von Juli 2000 bis April 2001.....	104
Abb. 5.25: Extrakte der Aufseß/Kläranlage im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001.....	105
Abb. 5.26: Extrakte der Aufseß/Kläranlage im Microtox TM -Test von Juli 2000 bis April 2001.....	106
Abb. 5.27: Extrakte der Leinleiterquelle im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001	107
Abb. 5.28: Extrakte der Leinleiterquelle im Microtox TM -Test von Juli 2000 bis April 2001	107
Abb. 5.29: Extrakte der Leinleiter bei Gasseldorf im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001	108
Abb. 5.30: Extrakte der Leinleiter bei Gasseldorf im Microtox TM -Test von Juli 2000 bis April 2001 ...	108
Abb. 5.31: Extrakte der Wiesent im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001	109
Abb. 5.32: Extrakte der Wiesent bei Kirchehrenbach im Microtox TM -Test von Juli 2000 bis April 2001	110
Abb. 5.33: Extrakte der Quelle des Fischzuchtbeispielbetriebes in allen drei Biotests.....	111
Abb. 5.34: Neutrale Extrakte des Mähringsbachs im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001	112
Abb. 5.35: Saure Extrakte des Mähringsbachs im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001.....	112
Abb. 5.36: Extrakte des Mähringsbachs im Microtox TM -Test von Juli 2000 bis April 2001	113
Abb. 5.37: Neutrale Extrakte des Zinnbachs im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001 ..	113
Abb. 5.38: Saure Extrakte des Zinnbachs im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001	114
Abb. 5.39: Extrakte des Zinnbachs im Microtox TM -Test von Juli 2000 bis April 2001	114
Abb. 5.41: Median, 95%-Perzentil und Standardabweichung der Effekte von neutralen Fraktionen in drei Biotests.....	116
Abb. 5.42: Median, 95%-Perzentil und Standardabweichung der Effekte von sauren Fraktionen in drei Biotests	117
Abb. 5.43: Hemmungen im Algenwachstumstest, aufgetragen gegen den DOC-Gehalt	118
Abb. 5.44: Hemmungen im Microtox-Test, aufgetragen gegen den DOC-Gehalt	119
Abb. 5.45: Hemmungen im Algenwachstumstest, aufgetragen gegen den AOX-Gehalt;.....	119
Abb. 5.46: Hemmungen im Microtox-Test, aufgetragen gegen den AOX-Gehalt.....	119
Abb. 5.47: Hemmungen im Algenwachstumstest aufgetragen gegen den Atrazin-Gehalt in der Wasserprobe	120
Abb. 8.1: unbelastete Kontrolle und Qualitätskontrolle, 100 µg/L Atrazin.....	137
Abb. 8.2: Dosis-Wirkungsbeziehung von Atrazin	138
Abb. 8.3: Dosis-Wirkungsbeziehung von 3,4-Dichloranilin	138
Abb. 8.4: Dosis-Wirkungsbeziehung von Desethylatrazin	139

Abkürzungsverzeichnis

μ	Wachstumsrate
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4-DNP	2,4-Dinitrophenol
3,4,5-TCP	3,4,5-Trichlorphenol
3,4-DCA	3,4-Dichloranilin
AOX	Adsorbierbare organische Halogenverbindungen
ATP	Adenosintriphosphat
C4	Silicagel mit Butylliganden
<i>C. reinhardtii</i>	Chlamydomonas reinhardtii
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektor
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff
DP	Declustering Potential
EC ₅₀₍₁₀₎	Effekt-Konzentration, bei der 50 (10) %ige Hemmung eintritt
ESI	Elektrospray Ionisation
FP	Focusing Potential
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
HPLC	Flüssigkeitschromatographie
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie
LOEC	Lowest observed effect concentration
NOEC	No observed effect concentration
MCPA	2-Chlor-4-methylphenoxyessigsäure
MRM	Multiple Reaction Modus
PH	Silicagel mit Phenylliganden
pK _a	Säurekonstante
PS-DVB, SDVB	Polystyrol-Divinylbenzol
RP	Reversed Phase
Rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. capricornutum</i>	Selenastrum capricornutum
SIM	Single Ion Modus
SPE	Festphasenextraktion
TIE	Toxicity Identification Evaluation

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	3
2 Aufgabenstellung	5
3 Regionale Situation und Gewässer in Oberfranken	7
3.1 Untersuchungsgebiete	7
3.1.1 Fränkische Schweiz	7
3.1.2 Nordostoberfranken	8
3.2 Gewässerzustand im Untersuchungsgebiet	9
3.2.1 Fließgewässer der Fränkischen Schweiz	9
3.2.2 Fließgewässer Nordostoberfrankens	10
3.3 Probenahme	11
3.3.1 Fließgewässer der Fränkischen Schweiz	11
3.3.2 Fließgewässer Nordostoberfrankens	11
3.3.3 Witterungsbedingungen während der Probenahme	11
3.3.4 Durchführung der Probenahme	12
3.4 Physikalisch-chemische Charakterisierung der Flussproben	12
3.4.1 pH-Wert	12
3.4.2 Leitfähigkeit	13
3.4.3 DOC	13
3.4.4 AOX	15
3.4.5 Ionenkonzentrationen	17
4 Untersuchungen zur Fremdstoffbelastung	19
4.1 Substanzen, Vorkommen in der Umwelt, toxikologische Eigenschaften	19
4.1.1 Atrazin und Desethylatrazin	21
4.1.2 2,4-D und MCPA	22
4.1.3 Diuron, Isoproturon und Monolinuron	23
4.1.4 Metolachlor, Metazachlor	24
4.1.5 Bromacil	25
4.1.6 Bromoxynil	25
4.1.7 Anilinderivate	26
4.1.8 Phenolderivate	27
4.2 Methoden	28
4.2.1 Fraktionierung der polaren Verbindungen	29
4.2.2 HPLC-Analytik mit DAD-Detektion	31
4.2.3 LC-MS/MS-Analytik	33

4.3 Ergebnisse	52
4.3.1 Herbizidbelastung der Fließgewässer	52
4.3.2 Verhältnis Atrazin und Desethylatrazin	58
4.4 Diskussion	60
5 Ökotoxikologische Bewertung	63
5.1 Biologische Verfahren: Hintergrund und Methodentwicklung	65
5.1.1 Algenarten und ihre Kultivierung	66
5.1.2 Algenwachstumshemmtest	69
5.1.3 Microtox TM -Test	73
5.1.4 Fluoreszenztest und Sauerstoffmessung	75
5.1.5 Qualitätssicherung der Biotests	78
5.1.6 Leerwertproblematik durch Verwendung von Festphasen	82
5.1.7 Sensitivitätsgrenzen der Biotests: Lösungsmittel und Leitsubstanzen	85
5.1.8 Vergleich von Wasserextrakten verschiedener Sorbentien	96
5.1.9 Effekt von natürlichen Inhaltsstoffen wie Huminstoffe im Biotest	99
5.2 Ergebnisse	102
5.2.1 Ökotoxikologisches Flusswassermonitoring in der Fränkischen Schweiz	102
5.2.2 Ökotoxikologisches Flusswassermonitoring des Mähringsbachs und des Zinnbachs	111
5.2.3 Jahreszeitliche Schwankungen der Effekte aller Probenahmestellen	115
5.2.4 Einfluss von AOX, DOC und Ionenkonzentrationen auf die Effekte	118
5.2.5 Atrazin als Ursache für gemessene Effekte	120
5.3 Diskussion	120
6 Zusammenfassung	124
7 Abstract	126
8 Anhang	128
8.1 Chemikalienliste	128
8.2 Probenahmezeitplan	129
8.3 Physiko-chemische Parameter der Flussproben	130
8.3.1 Methoden	130
8.3.2 Zusammensetzung der Flusswasserproben	131
8.4 Analytische Untersuchung	135
8.4.1 HPLC - Parameter	135
8.4.2 MS-MS-Einstellungen	136
8.5 Ökotoxikologische Untersuchungen	137
8.5.1 Nährmedium für Algen	137
8.5.2 Kontrollkarten für den Fluoreszenzparameter F_v/F_m : Jahr 2000	137
8.5.3 Dosis-Wirkungsbeziehung im Mikrotiterplattentest mit <i>C. reinhardtii</i>	138
9 Literaturverzeichnis	140

1 Einleitung

Die Gewässerqualität in Deutschland ist vielerorts aufgrund verschiedener Maßnahmen wie dem Bau von Kläranlagen, dem gezielten Umgang mit Pestiziden in der Landwirtschaft und verstärkten Überwachungsmaßnahmen infolge von nationalen und internationalen Richtlinien deutlich verbessert worden. Um den Erhalt der natürlichen Lebensbedingungen für Oberflächengewässer zu gewährleisten bzw. diese zu erreichen, wurde die Wasser-Rahmenrichtlinie 2000/60/EG erlassen, die am 22.12.2000 in Kraft trat. Maßgebliches Kriterium für die Beurteilung des Gewässerzustandes sind nicht mehr die chemischen und physikalischen Parameter, sondern die Gewässerökologie, vor allem die Gewässerfauna und -flora. Eine Liste mit prioritären Stoffen, die unter anderem hinsichtlich ihrer Wassergefährdung - dazu zählen auch ökotoxikologische Eigenschaften - ausgewählt wurden, soll dazu dienen, die Verschmutzung durch diese Stoffe in Zukunft ganz zu vermeiden bzw. deutlich einzuschränken.

Verunreinigungen werden in der Regel durch Analyse von vermuteten Schadstoffen und in Ergänzung dazu durch den Saprobienindex erfasst. Letzterer stellt jedoch in erster Linie ein Maß für die Nährstoffverhältnisse im Gewässer dar.

Auch die Wasserqualität der Fließgewässer der Fränkischen Schweiz und Nordostoberfrankens hat sich in den letzten Jahren deutlich verbessert. Wenngleich sich viele Gewässer dieser Regionen in einem guten Zustand befinden, hat die aquatische Biodiversität abgenommen, besonders betroffen davon ist die Fischwelt. In den Fließgewässern dieser Region beobachtet man wie überall in Bayern seit Jahren einen Rückgang der Fischartenvielfalt [Schütze, 2000]. Dies war auch Thema einer Zusammenkunft von Vertretern der fränkischen Fischzuchtbetriebe und des Freistaates Bayern.

Eine nicht unwichtige Rolle beim Artenrückgang können Stoffe spielen, die durch unkontrollierten oder diffusen Eintrag in Oberflächengewässer gelangen. Quellen anthropogener Schadstoffe können dabei Abschwemmungen landwirtschaftlicher Oberflächen (Runoff), Spraydrift, Drainagen und unerlaubte Abwassereinleitungen sein.

Solche Verunreinigungen, die die Gewässerqualität beeinträchtigen können, lassen sich nicht durch gängige Gewässergütesysteme wie dem seit 1976 angewandten Saprobienindex erfassen. Letzterer ist in erster Linie ein Maß für die Belastung mit organischen und fäulnisfähigen Stoffen im Gewässer [Friedrich, 1986]. Der Bau von Kläranlagen führte zu guten bis sehr guten Güteklassen im Sinne des Saprobienindex.

Dies trifft auch für die in dieser Arbeit untersuchten Fließgewässer aus zwei Regionen Oberfrankens zu, die als gering bis mäßig belastet eingestuft werden [Pongratz, 2001]. Da es sich jedoch im Falle der Fränkischen Schweiz um ein Karstgebiet handelt, ist das Wasser dort infolge fehlender Reinigungswirkung der Bodenschichten besonders gefährdet. Noch heute kann man Atrazin, das schon seit 1991 verboten ist, in einigen Quellen und Fließgewässern nachweisen. Atrazin, das zu den Herbiziden gehört, kann wie auch andere synthetisch hergestellte Verbindungen zu einer empfindlichen Störung der aquatischen Biosphere führen [Klupp, 2000]. Ein vermindertes Phytoplanktonangebot kann die Folge sein und Auswirkungen auf die Versorgung der Invertebraten und Fische haben [Solomon *et al.*, 1996].

Zwei weitere Fließgewässer, die sich im Nordosten Oberfrankens nahe der Stadt Rehau befinden, sind ebenfalls als gering belastet eingestuft. Für die hier heimischen Arten wie die Flussperlmuschel reicht diese Qualität jedoch nicht aus, da ihr Artenbestand in den letzten Jahren dramatisch abgenommen hat. Flussperlmuscheln gelten als Indikatororganismen für eine intakte Wasserqualität.

Es stellt sich somit die Frage, inwieweit Stoffe, die in subletalen Konzentrationen vorliegen, zur chronischen Beeinträchtigung der aquatischen Biosphere führen. Anhand eines Monitorings von Fließgewässern aus beiden Regionen soll mittels verschiedener Biotests und spurenanalytischer Verfahren untersucht werden, ob eine Untergrundtoxizität vorliegt und ob sich regionale und saisonale Unterschiede in den ökotoxikologischen Effekten und der stofflichen Zusammensetzung der Gewässer widerspiegeln.

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war, mit analytischen und ökotoxikologischen Untersuchungen festzustellen, ob die Wasserqualität verschiedener Fließgewässer Oberfrankens Belastungen aufweist, die mit dem Rückgang autochthoner Arten in Verbindung gebracht werden kann. Dazu wurden Fließgewässer untersucht, die nach bisherigen Maßstäben wie dem Saprobien-System als intakt gelten, jedoch trotzdem einen Rückgang an aquatischer Biodiversität verzeichnen. Die untersuchten Fließgewässer befinden sich in zwei Regionen, in denen die landwirtschaftliche Nutzung überwiegend extensiv betrieben wird. Es sollten außerdem jahreszeitliche Schwankungen dieser Gewässer berücksichtigt werden, so dass die ausgewählten Fließgewässer in vierteljährlichen Abständen untersucht wurden. Das Monitoring umfasste die Untersuchung von fünf Fließgewässern mit insgesamt 10 Probenahmeorten während des Zeitraumes von Juli 2000 bis zum April 2001.

Das Prinzip der biotest-geleiteten Analytik bietet sich an, um diese Problemstellung zu bearbeiten. Die Kombination von Analytik und Biotest ist bereits bei stark belasteten Proben zur Identifizierung von Schadstoffen erfolgreich eingesetzt worden. Dieser Ansatz ermöglicht die Eingrenzung der für das ökotoxikologische Potential verantwortlichen Verbindungsklassen. Im Vordergrund dieser Arbeit stand das mögliche ökotoxikologische Potential der mittel bis stark polaren organischen Verbindungen im Wasser. Dieses sollte anschließend mit dem Vorkommen organischer Spurenstoffe und der physikalisch-chemischen Parameter der Wasserprobe in Bezug gesetzt werden, um daraus mögliche Gefährdungen abzuleiten.

Einer der Schwerpunkte der Arbeit war die Modifikation einer fraktionierten Festphasenextraktion, deren Eluate mit den Biotests kompatibel sein sollten und zu keiner Ökotoxizität durch Artefakte führen durften. Dies stellte eine besondere Herausforderung dar, da es sich bei den untersuchten Proben um geringfügig belastete Proben handelte und mit einer Sensitivitätssteigerung der eingesetzten Biotests eine Aufkonzentrierung der Probeninhaltsstoffe verbunden war. Diese Vorgehensweise erforderte deshalb besondere Aufmerksamkeit gegenüber den Blindwerten.

Zum Nachweis der vorhandenen Schadstoffe wurde eine LC-MS/MS-Methode ausgearbeitet, mit der organische Verbindungen im Spurenbereich detektiert werden konnten.

Das ökotoxikologische Potential der Proben wurde durch den Einsatz von Algen und Bakterien als Testorganismen abgeschätzt. Auf diese Weise war es möglich, zwei verschiedene Energiegewinnungssysteme, die Photosynthese und die Atmung, zu erfassen. Sowohl Algen als auch Bakterien erwiesen sich bereits in anderen Arbeiten gegenüber

aquatischen Fremdstoffen als sehr sensitiv. Die eingesetzten Verfahren sollten darüber hinaus einfach und schnell Aufschluss über Effekte geben. Dazu wurde ein miniaturisierter Algenwachstumstest eingesetzt, der die chronischen Effekte erfasste. Als bakterieller Test wurde der MicrotoxTM-Test angewendet, ein Kurzzeittest, der als ökotoxikologischer Summenparameter empfindlich auf eine Vielzahl von umweltrelevanten Verbindungen reagiert. Die Leitsubstanzen wurden dabei für die Entwicklung jedes Schrittes der analytischen als auch ökotoxikologischen Untersuchung herangezogen.

Vor dem Hintergrund der europäischen Wasserrahmenrichtlinie, deren Aufgabe es ist, das ökologische Gleichgewicht der Gewässer zu erhalten, sollte es sich zeigen, ob ein solches Monitoring zur Untersuchung geringer Belastungen, die einen schädigenden Einfluss auf das System haben können, geeignet ist.

3 Regionale Situation und Gewässer in Oberfranken

3.1 Untersuchungsgebiete

Die Untersuchungsgebiete befinden sich im Norden von Bayern, im Bezirk Oberfranken. Bei beiden Gebieten handelt es sich um dünn besiedelte Regionen, so dass geringe anthropogene Einflüsse zu erwarten sind.

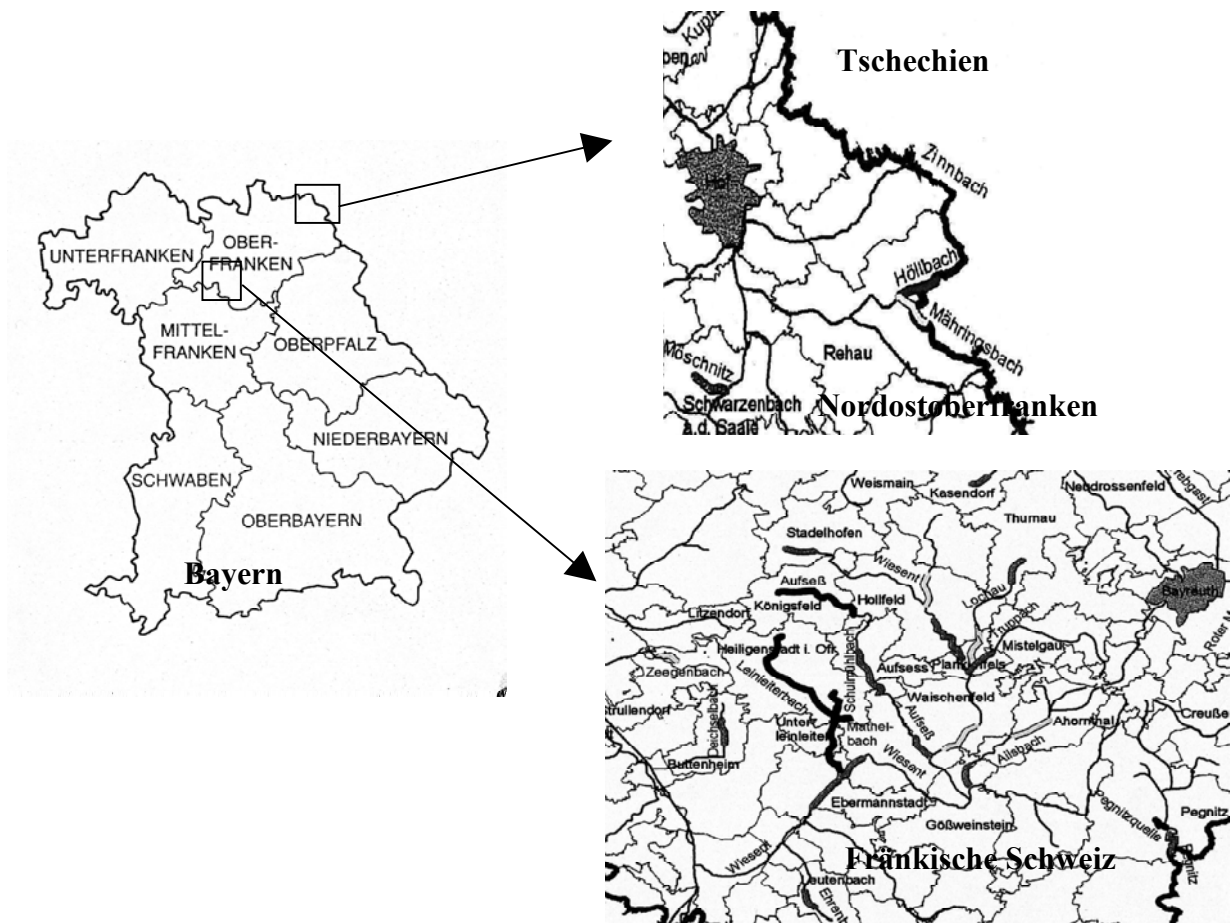


Abb. 3.1: Kartenausschnitte der beiden Regionen Fränkische Schweiz und Nordostoberfranken

3.1.1 Fränkische Schweiz

Die Fränkische Schweiz gehört zur nördlichen Frankenalb. Der südliche Teil davon wird von der Hersbrucker Schweiz gebildet. Hier beginnt die Jurastufe. Sie ist die jüngste und markanteste des süddeutschen Schichtstufenlandes und wird als Jurakalk bezeichnet. Der Aufbau dieser Region erfolgt in vertikalen Schichten. Als unterste Stufe tritt der Lias in Erscheinung, der sich durch fruchtbare Böden auszeichnet. Darüber liegt der Dogger, auch als brauner Jura bezeichnet, auf dem sich bewaldete Steinhänge ausgebildet haben. Der Malm, auch weißer Jura genannt, bildet die letzte und oberste Stufe dieser Schichten. Er besteht aus

Paketen geschichteten Kalks und dem witterungsbeständigeren Dolomit. Letzterer bildet die charakteristische Felsformation in der Fränkischen Schweiz. Es handelt sich um ein Karstgebiet mit den typischen Erscheinungsformen, den unterirdischen Hohlräumen, die das Wasser im Laufe der Zeit ausgewaschen hat. Infolgedessen zeichnet sich der Boden durch eine geringe Reinigungskraft aus, da das Regenwasser die unterirdischen Klüfte schnell passieren kann. Dies hat zur Folge, dass Schweb- und Schadstoffe oftmals ungehindert wieder durch die Quellen austreten können. Besonders problematisch ist die Lage dort, wo Abwässer aus Siedlungsgebieten ungeklärt versickern oder der Boden landwirtschaftlich genutzt wird. Da besonders die Hochebenen der Fränkischen Schweiz landwirtschaftlich genutzt werden, besteht dort die Gefahr, dass Stoffe, wie beispielsweise Pestizide, die zu einer Minderung der Wasserqualität führen können, in die Quellen gelangen. Quellen und Brunnen in Karstgebieten müssen deshalb einer sorgfältigen Überprüfung unterzogen werden, wenn ihr Wasser für weitere Zwecke wie Trinkwasser oder auch für Fischzuchtanlagen genutzt wird. In dieser Region wird Ackerbau überwiegend extensiv betrieben. Den größten Anteil der landwirtschaftlichen Erzeugnisse macht Getreide, vor allem Braugerste, aus. Daneben wird auch Mais angebaut. Darüber hinaus beherbergt die Fränkische Schweiz ein großes Obstanbaugebiet, wodurch viele Saftereien und Brennereien entstanden sind. Ein weiteres wirtschaftliches Standbein der Fränkischen Schweiz ist der Tourismus.

3.1.2 Nordostoberfranken

Das Gebiet der untersuchten Fließgewässer befindet sich in den Hügellagen des auslaufenden nördlichen Fichtelgebirges, östlich der Stadt Rehau. Das Fichtelgebirge ist als europäische Wasserscheide von Bedeutung. Ihre Flüsse entwässern in die Nordsee und in den Süden, in das System des Schwarzen Meeres. Der Boden dort besteht zum einen aus Phyllit, der in der Hauptsache aus Quarz und glänzend weißen Glimmern besteht und zu einem geringeren Teil aus Tonschiefer. Dieser metamorphe Gesteinsuntergrund führt dazu, dass das Wasser pufferungsarm ist. Eine Versauerung durch saure Niederschläge und sogar durch erhöhtes Vorkommen von Huminsäuren ist deshalb leicht möglich. Das Wasser fließt größtenteils wegen des festen, undurchlässigen Untergrundes oberirdisch ab. Infolge der kargen Böden hat sich dort kein intensiver Ackerbau entwickeln können. Es werden vorwiegend Weizen, Gerste, Kartoffeln und Ölfrüchte wie Raps angebaut. Die Region gilt zudem als ein gutes Saatguterzeugergebiet für ganz Bayern. Etwa zwei Drittel des Landes sind von Wäldern bedeckt. Unter den Bäumen dominieren die Fichten. Seit 1990 ist das Fichtelgebirge als Naturpark ausgewiesen. Der Einfluss des Menschen hat auch hier seine Spuren hinterlassen, obwohl es durch seine frühere Lage als Randzonengebiet dünn besiedelt ist. Aus diesem

Grund werden große Anstrengungen unternommen, die in den letzten Jahren zurückgegangene biologische Artenvielfalt wieder zu verbessern. Hierzu zählen auch zahlreiche Projekte, die dem Schutz der gefährdeten Perlmuscheln dienen.

Der wichtigste Industriezweig dieser Region ist die Porzellanherstellung. In Rehau und auch in anderen Städten haben sich leder-, kunststoff- und textilverarbeitende Industriezweige entwickelt.

3.2 Gewässerzustand im Untersuchungsgebiet

Die Fließgewässer beider Regionen unterscheiden sich stark in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Flüsse der Fränkischen Schweiz sowie zwei Bäche östlich der oberfränkischen Stadt Rehau untersucht.

Die Fränkische Schweiz weist einen jährlichen Niederschlag von etwa 700 mm auf. Dagegen kommt es in Nordostoberfranken wegen der Erhebungen des Fichtelgebirges zur Bildung von Steigungsregen, der häufig Überschwemmungen zur Folge hat. Der mittlere Jahresniederschlag liegt hier zwischen 1000 - 1400 mm. Im Mittel beträgt die jährliche Niederschlagsmenge für Oberfranken 776 mm, damit liegt diese deutlich unter dem mittleren jährlichen Niederschlag für Bayern von 907 mm [Haussel, 2000].

3.2.1 Fließgewässer der Fränkischen Schweiz

Typisch für Fließgewässer der Fränkischen Schweiz ist ihre zum Teil sehr stark schwankende Wasserführung, die bedingt ist durch das unterirdische Hohlraumsystem. So wurden für die Aufseß Wassermengen zwischen 50 und 2500 L/s gemessen [Pongratz, 2000]. Bei starken Regenfällen wie auch durch die Schneeschmelze im Winter kann es schnell zu Überschwemmungen in den Tälern kommen, da der Boden keine große Rückhaltekapazität besitzt. Dazu kommt die Gefahr, dass von den landwirtschaftlich intensiv genutzten Hochflächen belastetes Oberflächenwasser in die Quellen gelangt [Klupp, 2000].

Trotz der in den letzten Jahrzehnten deutlich verbesserten Wasserqualität [Pongratz, 2001] weisen einige der Fließgewässer streckenweise Pestizidgehalte bis zu 0,5 µg/L auf, wie im Falle der Triazin-Herbizide. Dies ergeben die jährlichen Untersuchungen des Bayerischen Wasserwirtschaftsamts. Zu diesen Gewässern gehören die Leinleiter und die Aufseß, die beide in die Wiesent, den Hauptfluss der Fränkischen Schweiz, münden. Da die Wiesent die Hauptwassermenge mit sich führt und somit das Wasser dieser Region sammelt, wurde dieser Fluss auch mit in das Fließgewässermonitoring aufgenommen. Gemäß der Erhebung von 2000 werden die drei Flüsse, bis auf die Quellen, als mäßig belastet eingestuft [Pongratz, 2001]. Dies bedeutet eine große Artenvielfalt und zudem ertragreiche Fischgewässer. Ende

der sechziger Jahre war der Oberlauf der Aufseß deutlich stärker belastet. Dies gilt allerdings nicht für weite Teile der Leinleiter und der Wiesent, die damals noch als gering belastet eingestuft wurden. Ein weiteres Problem, insbesondere hinsichtlich der Atrazingehalte (durchschnittlich 0,75 µg/L), stellt die Karstquelle des oberfränkischen Fischzucht-Beispielbetriebes dar. Die dort zu verzeichnenden Ertragseinbußen bei den Salmoniden (Forellen und Saiblinge) werden unter anderem auf landwirtschaftliche Einträge zurückgeführt, die in das Quellwasser gelangen. Bakterielle Ursachen dürften eines der Hauptprobleme für die in letzter Zeit zu verzeichnenden Erbrütungsverluste sein [Nieslony, 2001]. Inwieweit Fremdstoffe in geringen Konzentrationen ebenfalls zu einer Schwächung der Tiere beitragen, konnte nicht festgestellt werden.

3.2.2 Fließgewässer Nordostoberfrankens

Das Wasser der Fließgewässer im Nordosten Oberfrankens ist sehr weich und pufferungsarm, da das granitische Ursprungsgestein fast keine löslichen Bestandteile abgibt. In Quellbereichen hat das Wasser aufgrund seiner geringen Pufferungskapazität und der Ablagerung von sauren Stickstoff- und Schwefelverbindungen aus industriellen Gebieten (Tschechische Republik) z.T. pH-Werte unter 4 [Mähner, 2000]. Eine ständige pH-Wertabsenkung kann letale Effekte auf die Fauna haben. Bei Muscheln manifestiert sich das durch eine verschlechterte Schalenbildung.

Die beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bäche, der Zinnbach und der Mähringsbach, zeichnen sich beide durch sauberes Wasser aus, das gemäß dem Saprobienindex gering belastet ist. Der Mähringsbach fließt überwiegend durch Waldgebiet, während der Zinnbach, der streckenweise entlang der Grenze zwischen Deutschland und Tschechien fließt, überwiegend von Wiesen und Feldern gesäumt wird. Einige Randstreifen des Zinnbaches sind als Naturschutzgebiet ausgewiesen. Beide Bäche entspringen in sumpfigen Gebieten. Das vom Mähringsbach durchflossene Gebiet ist zum Teil Wasserschutzgebiet. Die Strömung der beiden Bäche ist ruhig bis lebhaft.

Beide Bäche gehören zu den Fließgewässern dieser Gegend, die für ihr Flussperlmuschelvorkommen bekannt sind. Das Wasser dieser Gegend war seit jeher bekannt für seine außerordentlich gute Qualität, was zur Ansiedelung der Flusswasserperlmuschel in einigen Bächen geführt hat. Trotzdem findet in dieser Region ein Muschelsterben statt, das bereits Anfang des letzten Jahrhunderts begann und in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat [Schmidt, 2000], so dass die Bach- und Flussperlmuschel auch hier als bedrohte Tierarten gelten. Verschiedene Maßnahmen, wie der weitgehende Anschluss aller Haushalte an Kläranlagen und auch der Bau eines Umleitbeckens am Zinnbach haben nicht die erhoffte

Erholung und Verjüngung der Muschelbestände gebracht. Die Gründe für den Populationsrückgang sind nach wie vor nicht geklärt.

3.3 Probenahme

3.3.1 Fließgewässer der Fränkischen Schweiz

Die Proben der Aufseß wurden an drei Stellen genommen. Die Stellen befanden sich direkt an der Quelle bei Königsfeld, nahe dem Ort Oberaufseß und einen halben Kilometer hinter der Kläranlage des Ortes Aufseß. Entlang der Leinleiter wurden zwei Stellen beprobt, zum einen die Quelle und zum anderen eine Probenahmestelle im Ortskern von Gasseldorf. Letztere befindet sich kurz vor der Einmündung der Leinleiter in die Wiesent. Die Wiesent wurde auf Höhe des Ortes Kirchehrenbach beprobt. Um eine mögliche jahreszeitliche Abhängigkeit und auch Wetterabhängigkeit festzustellen, wurden die Proben über das Jahr verteilt genommen. Weiterhin wurde die Karstquelle der Fischzuchtanlage beprobt. Diese Probe wurde monatlich von November 2000 bis April 2001 genommen [Nieslony, 2001].

3.3.2 Fließgewässer Nordostoberfrankens

Die Probenahmestellen des Mähringsbachs befanden sich östlich von Rehau im Rehauer Forst zwischen dem Brandloh und dem Bärenschacht. Die Proben aus dem Zinnbach wurden zwischen der Huschermühle und der Timpermühle entnommen. Auf deutscher Seite wird der Zinnbach durch ein von Wiesen und Feldern geprägtes Gebiet begrenzt, auf tschechischer Seite grenzt ein Waldgebiet an. Auch hier wurden die Proben über das Jahr verteilt während der vier Jahreszeiten genommen.

3.3.3 Witterungsbedingungen während der Probenahme

Probenahmezeit	Wetterlage während der Probenahme
Sommer 2000	Bedeckt, Tage zuvor hat es viel geregnet
Herbst 2000	Bedeckt, neblig, kalt
Winter 2000 / 2001	Bewölkt, leichter Schneefall, sehr kalt, Mähringsbach stellenweise mit Eis bedeckt
Frühjahr 2001	Warm, bedeckt mit sonnigen Abschnitten

Die genauen Probenahmezeitpunkte werden im Anhang 8.2 genannt.

3.3.4 Durchführung der Probenahme

Die Wasserproben wurden in 4L-Glasflaschen genommen. Die Flaschen wurden mit 1 N Natronlauge, 1 N Salzsäure, bidest. Wasser und zum Schluss mit Aceton (HPLC-grade, Promochem) gereinigt. Die Probenahme erfolgte bei breiteren Fließgewässern mittels eines Bechers, der an einer Stange befestigt war, so dass die Wasserprobe über die gesamte Breite des Flusses genommen werden konnte. Bei den Bächen war dies nicht erforderlich, da hier nicht mit einer laminaren Strömung zu rechnen war, denn infolge des kurvenreichen Flussbettes lag eine turbulente Strömung vor. Bei jeder Probenahme wurden 4 L Wasser abgefüllt, wovon je zwei Liter für die Festphasenextraktion und etwa 200 mL für die restlichen Untersuchungen verwendet wurden.

Folgende Untersuchungen wurden am Tag der Probenahme durchgeführt:

- pH
- Leitfähigkeit

Die Festphasenextraktion erfolgte ebenfalls am gleichen Tag. Die verbleibende Probe wurde bei 4°C gelagert.

3.4 Physikalisch-chemische Charakterisierung der Flussproben

Zur weiteren Charakterisierung der Wasserproben wurden folgende physikalisch-chemische Parameter neben den analytisch-chemischen und biologischen Untersuchungen herangezogen: pH-Wert, DOC, Leitfähigkeit, AOX und Ionenkonzentrationen. Die einzelnen Untersuchungsergebnisse wie auch die Methoden sind im Anhang 8.3 aufgeführt.

3.4.1 pH-Wert

Der pH-Wert von Fließgewässern nimmt in der Regel, bedingt durch verschiedene Einleiter, mit dem Flusslauf zu. Durch anthropogene Belastung, u.a. auch durch landwirtschaftliche Aktivität, gelangen vor allem Abbauprodukte von Proteinen wie Ammoniumverbindungen in die Gewässer. Quellwässer haben meistens pH-Werte im Bereich von 4-5. Die pH-Werte der Quellen in Karstgebieten sind aufgrund der Pufferwirkung des Carbonats meist höher. Für die drei Quellen liegen die pH-Werte während des Messzeitraumes zwischen 6.5 und 7.5. Das Wasser an den übrigen Messstellen der Fränkischen Schweiz weist pH-Werte zwischen 7.5 und 8.5 auf, was auf einen natürlichen Verlauf der pH-Wertentwicklung entlang eines Flusses hinweist.

Bei Mähringsbach und Zinnbach liegen die pH-Werte zwischen 6.8 und 7.8. Der pH-Wert des Oberlaufs des Zinnbachs ist allerdings deutlich saurer, er liegt bei etwa 4 [Pongratz, 2001], wobei hier mit der Mobilisierung von weiteren Stoffen zu rechnen ist.

3.4.2 Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit der Quellen und Flüsse der Fränkischen Schweiz liegt erwartungsgemäß infolge des gelösten Kalkes deutlich höher als die der Bäche des nördlichen Fichtelgebirgsvorlandes. Die Werte liegen im Bereich 550 bis 750 $\mu\text{S}/\text{cm}$, wobei sich abzeichnet, dass mit fortschreitendem Flusslauf die Leitfähigkeiten leicht abnehmen, was auf den Einfluss von carbonatärmeren Einträgen wie Regen hindeutet.

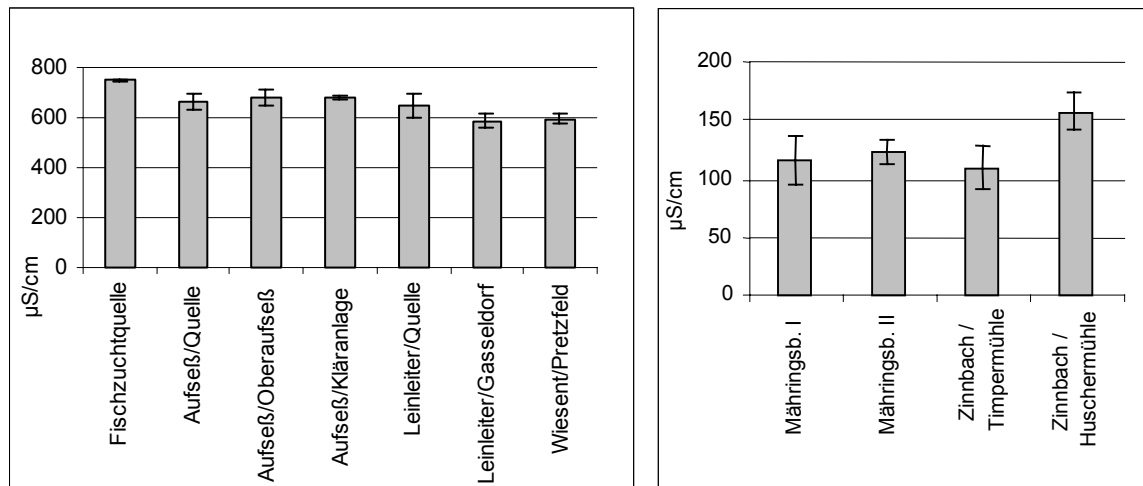


Abb. 3.2: Mittelwerte und Standardabweichungen der Leitwerte während der Messperiode

Zinnbach und Mähringsbach weisen Leitfähigkeiten zwischen 80 und 170 $\mu\text{S}/\text{cm}$ auf. Im Verlauf des Jahres zeigte die Messstelle Zinnbach/Huschermühle jeweils die höchsten Leitfähigkeiten (s. auch Kap. 3.4.4). Im Vergleich zu der Probenahmestelle, die etwa 1 km flussaufwärts liegt, ist der Mittelwert signifikant erhöht.

3.4.3 DOC

3.4.3.1 Herkunft des gelösten organischen Kohlenstoffs

Der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) ist wie der AOX ein Summenparameter, der ein Maß für die Belastung der Gewässer an organischen Stoffen ist. Hiermit werden alle organischen Bestandteile, sowohl abbaubare als auch schwer abbaubare, erfasst. Dazu gehören unter anderem Kohlenhydrate (Zucker), organische Säuren und organische Stickstoffverbindungen (Abbauprodukte von Eiweißen). Bei Gewässern, die keiner größeren Beeinflussung durch den Menschen unterliegen, besteht der DOC hauptsächlich aus Huminstoffen, die aus abgebauten Pflanzenresten stammen. Infolge ihrer Eigenschaften als Kationenaustauscher und Komplexbildner (Hydroxyl-, Carboxyl- und Aminogruppen) können sie Schwermetallionen in Lösung halten; dabei werden besonders Eisen- und Kupferionen komplexiert. Durch Adsorption sind sie weiterhin in der Lage, toxisch wirkende Metallionen

zu binden und die Bioverfügbarkeit herabzusetzen. Offenbar können Huminstoffe sogar wachstumsfördernd auf Algen wirken [Netuchova & Tichy, 1970]. Huminsäuren gehören zu den Polyphenolen und können Phosphatasen hemmen und somit auch die Energiegewinnung und Bildung von ATP unterbinden [Serrano & Boon, 1991]. Im Gegensatz zum Lignin, das überwiegend aus aromatischen Ringen mit sechs Kohlenstoffatomen besteht, kommen besonders bei den kolloidalen Huminsäuren vorwiegend heteroaromatische Ringsysteme wie Pyridin, Pyrimidin, Pyrazin, Furan, Thiophen, Pyrrol, Imidazol und Purin [Brehm & Meertinus P.D.M., 1996] vor. Diese Heterocyklen enthalten Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel. Phenole, Chinone und besonders Polyphenole gehören zu den schwer abbaubaren Verbindungen, da hier C-C-Verbindungen gelöst werden müssen, wozu nur wenige Organismen imstande sind. Freie Phenole kommen jedoch nur in geringen Konzentrationen vor und stammen aus der Hydrolyse der Gerbstoffe aus dem Falllaub (Phenol + Zucker) [Brehm & Meertinus P.D.M., 1996]. Durchschnittlich liegen die DOC-Gehalte von Fließgewässern bei etwa 2-10 mg/L [Hütter, 1994; Anonymus, 1988].

3.4.3.2 DOC-Gehalte in den Fließgewässern

Betrachtet man die Konzentrationen an gelöstem organischen Kohlenstoff in den untersuchten Fließgewässern während eines Jahres, weisen die Probenahmestellen in der Fränkischen Schweiz in der Summe einen niedrigeren DOC-Gehalt als die der Bachproben auf. In Abb. 3.3 sind die summierten DOC-Konzentrationen während eines Jahres dargestellt, wobei sich zeigt, dass die organische Fracht der Bäche im Jahresvergleich etwa 40 % höher ist als die der Fließgewässer der Fränkischen Schweiz.

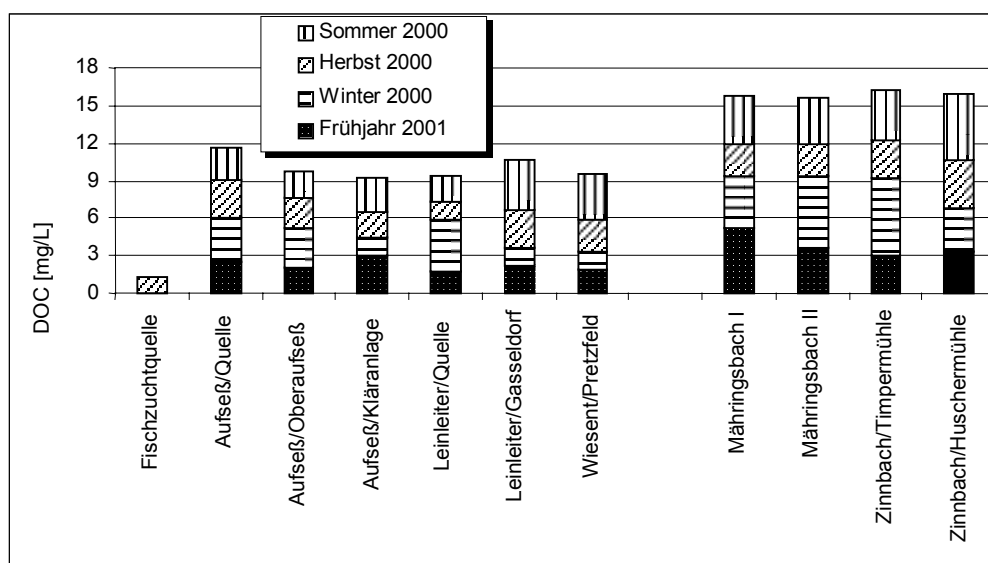


Abb. 3.3: DOC-Gehalte in den untersuchten Fließgewässern

Im Vergleich zu den übrigen Messstellen der Fränkischen Schweiz zeigt die Aufseßquelle die höchste DOC-Summenkonzentration. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass anthropogene Einflüsse vorliegen. Hier wären beispielsweise landwirtschaftliche Einträge zu nennen, die durch den Boden nicht zurückgehalten und abgebaut werden und auf diese Weise in die Quelle gelangen. Im Winter ist die biologische Aktivität am geringsten, so dass hier auch die Konzentration an DOC oftmals erhöht ist, was sich auch für die untersuchten Gewässer abzeichnet.

3.4.4 AOX

3.4.4.1 Bedeutung des AOX

Die Untersuchung des AOX-Parameters ist u.a. im Abwasserabgabengesetz, in der Indirektleiterverordnung und in der Klärschlammverordnung vorgeschrieben. Er wurde 1973 von Kühn und Sontheimer eingeführt. Hiermit werden die an Aktivkohle adsorbierbaren, organisch gebundenen Halogene erfasst. Man hat auf diese Weise ein Maß für die Belastung von Industrieabwässern (Pestizidproduktion, Eisenverhüttung, Papierindustrie, chemische Industrie) und von kommunalen Abwässern geschaffen. AOX-Verbindungen können u.a. bei der Chlorung entstehen (Chlorierung von wasserlöslichen organischen Verbindungen) oder beim Einsatz chlorabspaltender Haushaltsreiniger. Erfasst werden außerdem Pestizide und Biphenyle, die zur Gruppe der schwerflüchtigen Kohlenwasserstoffe zählen [Gremm & Frimmel, 2000]. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass ein Teil der AOX-Verbindungen natürlichen Ursprungs ist [Archibald *et al.*, 1998; Niedan & Schoeler, 1997]. Verschiedene chlorierte Verbindungen wurden bisher identifiziert, darunter flüchtige Kohlenwasserstoffe, Lignine, Essigsäuren, Benzoessäuren, Phenyllessigsäuren und Huminstoffe. Der größte Teil der AOX-Verbindungen ist bisher jedoch unbekannt.

Die Belastung von Oberflächengewässern wird bis zu 5 µg/L als gering und bis zu 20 µg/L AOX-Konzentrationen als mäßig eingestuft. Im österreichischen Jahresbericht 2000, in dem die Jahresdaten einer flächendeckenden Untersuchung der österreichischen Fließ- und Karstgewässer ausgewertet wurden, wird eine mittlere AOX-Konzentration von 7 µg/L aufgeführt.

Die AOX-Konzentrationen (Abb. 3.4) der Fließgewässer der Fränkischen Schweiz entsprechen tendenziell einer geringen bis mäßigen Belastung; die Werte liegen hier zwischen 5 und 20 µg/L. Im Vergleich zu den Quellen, die im Mittel bei einem AOX-Gehalt von 5 µg/L liegen, weisen die übrigen Probenahmestellen in der Fränkischen Schweiz bereits leicht erhöhte Werte mit bis zu 8 µg/L auf. Dies kann bereits auf anthropogene Einflüsse wie

Kläranlagen zurückzuführen sein. Deutlicher zeigt sich dieser Einfluss an der Messstelle hinter der Kläranlage Aufseß, die die höchste Summenkonzentration der gesamten Messstellen in der Fränkischen Schweiz aufweist.

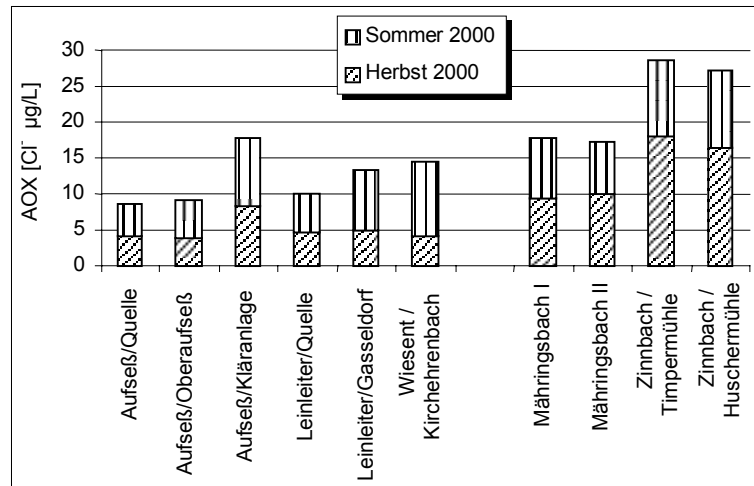


Abb. 3.4: AOX-Gehalte [Chlorid in µg/L] in den untersuchten Fließgewässern

Die AOX-Werte des Mähringsbaches sind vergleichbar mit denen der Flüsse aus der Fränkischen Schweiz. Der Zinnbach weist dagegen Konzentrationen zwischen 10 und 18 µg/l auf. Während die Konzentrationen im Mähringsbach zu beiden Probenahmezeitpunkten gleich sind, weisen beide Zinnbachproben im November eine fast doppelt so hohe Konzentration auf. Dies führt zu einer deutlich höheren Summenkonzentration im Zinnbach als im Mähringsbach. Ob ein Teil der AOX-Verbindungen vom Boden herrühren, es sich also um Altlasten handelt, müsste durch eine Sedimentuntersuchung geklärt werden, da hier durchaus auch längerfristig AOX gebunden werden kann, der langsam durch mikrobielle Aktivität freigesetzt wird. Die Mühlen, die sich auf Höhe der Probenahmestellen befinden, von denen jedoch nur die Timpermühle bewohnt ist, können auch als Verursacher des erhöhten AOX-Gehaltes in Frage kommen.

Der AOX-Gehalt kann jedoch auch natürlicherweise einen höheren Gehalt aufweisen, wie Asplund & Grimvall [1991] postulieren. Sie haben in einer Untersuchung von mehr als 135 schwedischen Seen bei 60% der Proben AOX-Konzentrationen zwischen 20-60 µg/L festgestellt, wobei in oligotrophen Seen mit einem hohen Huminsäureanteil die Konzentration höher war. Organismen wie Pilze, Flechten und Bakterien tragen auch zur natürlichen Entstehung von Halogenverbindungen bei.

3.4.5 Ionenkonzentrationen

Die im Wasser vorkommenden Ionen und deren Gehalte sind abhängig von den geologischen Gegebenheiten. Zur Charakterisierung und zur Erkennung von möglichen anthropogenen Einflüssen wurden eine Reihe von Kationen (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und NH_4^+) und Anionen (SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^-) untersucht.

3.4.5.1 Fließgewässer der Fränkischen Schweiz

Die Fließgewässer der Fränkischen Schweiz zeichnen sich durch einen hohen Kalziumcarbonatgehalt aus, der durch den karstigen Untergrund bedingt ist. Neben Kalzium liegen auch Magnesium und Chlorid (Abb. 3.6) in deutlich höheren Konzentrationen vor als in den Bächen des Fichtelgebirges, was ebenfalls auf das Vorhandensein von löslichen Verbindungen im Boden zurückzuführen ist. Die Rangfolge der Kationen Kalzium > Magnesium > Natrium > Kalium (s. Anhang 8.3.2.2) entspricht den Verhältnissen wie man sie in hartem Wasser vorfindet [Sommer, 2001].

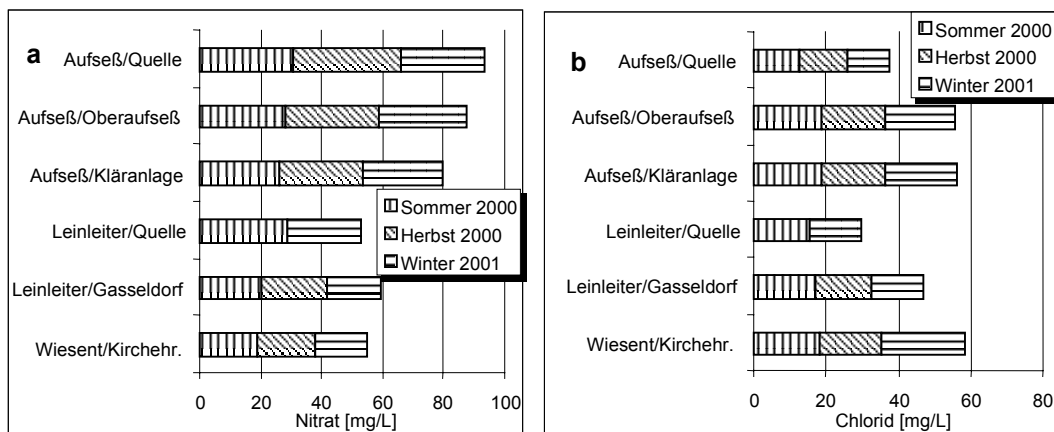


Abb. 3.5: Nitrat-Gehalte (a) und Chlorid-Gehalte (b) der Fließgewässer in der Fränkischen Schweiz

Ein Hinweis auf den Einfluss landwirtschaftlicher Aktivität sind die erhöhten Nitratwerte, die eine Konzentration bis zu 35 mg/L (Abb. 3.5) erreichen. Auffällig ist, dass die höchste Konzentration im Quellwasser (Aufseßquelle, Herbst 2000) gemessen wurde. Im Vergleich zum österreichischen Grenzwert für Flachlandgewässer, der 5,5 mg/L [Umweltbundesamt, 2000] beträgt, sind die hier gemessenen Konzentrationen deutlich höher.

3.4.5.2 Fließgewässer Nordostoberfrankens

Die Bäche haben klares Wasser, das aufgrund von humusreichen und moorigen Böden einen erhöhten Anteil an farbigen Huminstoffen aufweist. Die Rangfolge der Kationenkonzentrationen Kalzium > Natrium > Magnesium > Kalium ist charakteristisch für

weiches Wasser [Sommer, 2001]. An dieser Stelle soll kurz auf die gemessenen Nitratkonzentrationen (Abb. 3.6) eingegangen werden.

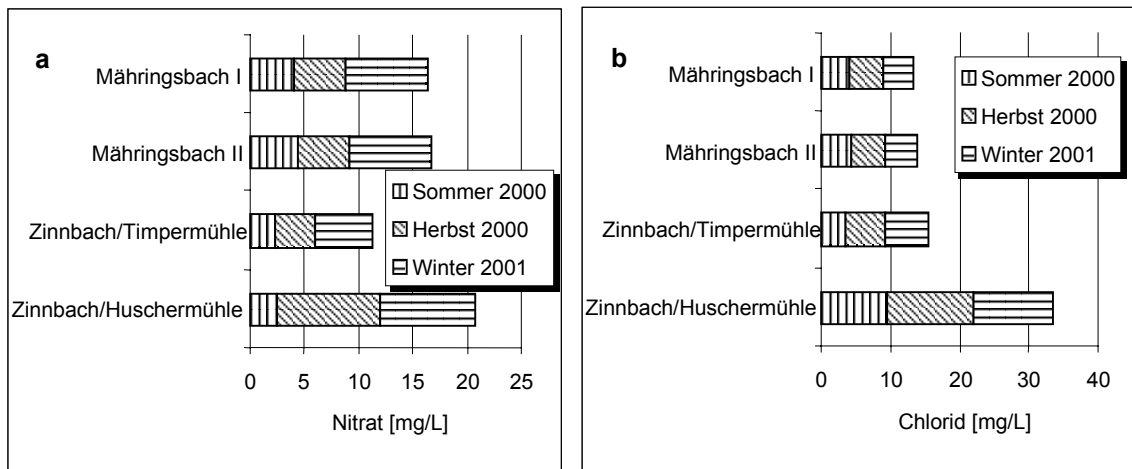


Abb. 3.6: Nitrat-Gehalte (a) und Chlorid-Gehalte (b) in den Bächen

Allgemein lässt sich feststellen, dass in der kälteren Jahreszeit die Nitratkonzentrationen bei allen Messstellen tendenziell ansteigen. Dies hängt mit der reduzierten mikrobiellen Aktivität zusammen. Es fallen jedoch die Summenwerte für den Zinnbach auf, die sowohl den niedrigsten als auch den höchsten Wert darstellen. Die beiden Messstellen des Mähringsbachs zeigen dagegen vergleichbare Summenkonzentrationen. Im Falle von Chlorid zeigt die Messstelle an der Huschemühle die mit Abstand höchste Summenkonzentration, die Messstelle an der Timpermühle weist dagegen im Vergleich zum Mähringsbach nur leicht erhöhte Konzentrationen auf.

Es liegt die Vermutung nahe, dass sich zwischen Timpermühle und Huschemühle ein möglicher Einleiter von belasteten Abwässern befindet; dies deuten jedenfalls die erhöhten Parameter wie AOX, Leitfähigkeit und Anionenkonzentration an.

4 Untersuchungen zur Fremdstoffbelastung

4.1 Substanzen, Vorkommen in der Umwelt, toxikologische Eigenschaften

Zur Etablierung der Methode wurde eine Reihe von Verbindungen, die folgende Kriterien erfüllen sollen, ausgewählt.

1. Mittelpolare bis polare Verbindungen;
2. Vorkommen im aquatischen Kompartiment;
3. ökotoxikologische Relevanz;
4. verschiedene Eigenschaften (physikalisch, chemisch).

Eine solche Gruppe stellen die Herbizide und deren Abbauprodukte dar. Ihre ökotoxikologische Bedeutung liegt zum Teil in ihrer hohen Persistenz und zum Teil hohen Toxizität begründet, wie z.B. 3,4-Dichloranilin. An Boden und Sediment gebundene Xenobiotika, die auf diese Weise einem biologischen oder chemischen Abbau entgangen waren, können durch mikrobielle Freisetzung oder durch Überschwemmungen remobilisiert werden. Eine Auswahl wurde gemäß ihres Auftretens in deutschen Gewässern und ihrer Häufigkeit, mit der sie den Trinkwassergrenzwert überschreiten, getroffen. Für die in der genannten Tabelle mit Stern versehenen Herbizide gibt es sogenannte Zielvorgaben, die von der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser [LAWA, 1998] formuliert wurden. Für alle nicht in dieser Liste aufgeführten Pestizide gilt der Trinkwassergrenzwert von 0,1 µg/L. Die Zielvorgaben dienen dem Schutz verschiedener Gewässer, unter anderem auch den fischereilich genutzten Gewässern, um das biologische Gleichgewicht der Ökosysteme zu sichern. Diese Richtwerte begründen sich aus Ergebnissen verschiedener Biotests, die aus allen vier Trophiestufen stammen. Die daraus resultierenden Werte liegen in der Regel über dem Trinkwassergrenzwert von 0,1 µg/L. Eine Ausnahme jedoch stellt Atrazin dar, dem kein Grenzwert zugeteilt wurde, da sein Einsatz verboten ist. Manche Arbeitsgemeinschaften, wie die der Wasserwerke des Rheineinzugsgebietes, haben für einige Herbizide noch niedrigere Grenzwerte als die der Trinkwasserverordnung festgelegt. Atrazin, 2,4-D und MCPA fallen durch ein Überschreiten der Zielvorgaben (2 µg/L) in bis zu 25 % der Messungen auf. Häufiger noch, nämlich mehr als 25 %, überschreiten Diuron und Isoproturon die Zielvorgaben (0,05 bzw. 3 µg/L). Drei der Leitanalyten stehen auf der "Liste der prioritär gefährlichen Stoffe", die im Rahmen der europäischen Wasserrahmenrichtlinie 2000/60/EG am 20. November 2001 erstellt wurde. Es handelt sich dabei um die Stoffe Atrazin, Diuron und Isoproturon. Der Einsatz dieser Verbindungen soll in Zukunft soweit wie möglich

reduziert bzw. ganz ausgeschlossen werden, da sie für die Umwelt ein nicht abzuschätzendes Risiko darstellen.

Weiterhin wurde bei der Auswahl der Leitsubstanzen berücksichtigt, dass sie unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen, verschiedenen Substanzklassen angehören und ihre Wirkung in biologischen Systemen auf unterschiedlichen Mechanismen beruht. Die Löslichkeit der ausgewählten Verbindungen in Wasser umfasst einen weiten Bereich, angefangen vom Desethylatrazin, dem Abbauprodukt des Atrazins, mit 3200 mg/L bis zum Atrazin selbst, das sich nur bis etwa 30 mg/L in Wasser löst. Der Logarithmus des 1-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (log K_{OW}) ist für alle Leitsubstanzen kleiner als drei, woraus sich eine geringe Akkumulationsneigung ableiten lässt. Zudem schließen die Leitsubstanzen saure (Phenoxyessigsäuren), neutrale (Acetanilide) und basische (Harnstoffderivate) Pestizide ein. Diese Eigenschaft wird durch den pK_a -Wert ausgedrückt.

Tab. 4.1: Physikalisch-chemische Eigenschaften der Leitsubstanzen

Substanz	Wasserlöslichkeit [mg/l]	pK_a	Lg P_{ow}	Henry-Konstante [Pa · m ³ / mol]	K_{oc} [mL/g]	Halbwertszeit [d] DT ₅₀
Diuron*	42 ⁸	15,45 ¹	2,68 ⁴ /2,85 ⁸	7,04 x 10 ⁻⁶ (⁸)	64 ¹¹	90 _b ⁹
Isoproturon*	65 ⁸	18,7 ¹	2,2 ⁴ /2,5 ⁸	1,46 x 10 ⁻⁵ (⁸)	107 ¹¹	12 _b ⁹
Monolinuron	735 ⁸	-	1,9 ⁴ /2,2 ⁸	5,65 x 10 ⁻⁴ (⁸)	250-500 ⁸	45-60 _b ⁹
Atrazin*	33 ⁸	1,7 ⁸	2,5 ² / 2,7 ⁶	1,5 x 10 ⁻⁴ (⁸)	124 ¹¹	16-77 _b ⁸ 10-105 _w ⁸
Bromacil*	700 ⁸	9,27 ⁸	1,88 ⁸	1,9 x 10 ⁻³ (¹¹)	32 ¹¹	60 _b ¹¹
Metolachlor*	530 ⁶ /488 ⁸	-	2,9 ⁴	2,4 x 10 ⁻³ (⁸)	121-309 ⁸	20 _b ⁸
Metazachlor*	430 ⁸	-	2,13 ⁸	5,74 x 10 ⁻⁵ (⁸)	80-92 ⁹	3-9 _b ⁸
MCPA*	274 (pH7) ⁸	3,07 ¹¹	2,75 ⁸	5,5 x 10 ⁻⁵ (⁸)	50 ¹¹	25 _b ⁹
2,4-D*	23180 (pH7) ⁸	2,73 ⁸	2,81 ⁸	1,32 x 10 ⁻⁵ (⁸)	39 (pH 5) ¹¹	2-10 _b ⁹
Bromoxynil	130 ⁸	3,86 ¹¹	2,8 ⁹	1,34 x 10 ⁻⁵ (⁸)	170 ¹¹	7 _b ⁹
Desethylatrazin	3200 ⁶	-	0,7-1,5 ⁴ / 1,6 ⁶	-	-	-
3-Chlor-4-methylanilin	-	3,92 ¹	2,33 ¹	-	-	-
3,4-Dichloranilin	580 ¹⁰	3,2 ³	2,47 ¹	0,03-0,42 (¹⁰)	-	-
3,4,5-Trichlorphenol (3,4,5-TCP)	-	8,35 ¹²	4,01 ¹²	-	-	-
2,4-Dinitrophenol	0,34-6 ⁷	3,94-4,09 ⁷	1,67 ⁷			

¹ berechnet mit PALLAS-Programm, ² [Dugay *et al.*, 1998], ³ [Geerdink, 1988], ⁴ [Pichon *et al.*, 1996], ⁵ [Coquart & Hennion, 1991], ⁶ [Dupas *et al.*, 1996], ⁷ [Hottenroth, 2001], ⁸ [Tomlin, 2000], ⁹ [Bach *et al.*, 2000], ¹⁰ [Strüder *et al.*, 1998], ¹¹ [Barceló & Hennion, 1997], ¹² [Anonymous, 1997]

⁺ Halbwertszeiten im Boden=_b und Wasser=_w, * LAWA-Zielvorgaben liegen vor

Der in Tab. 4.1 aufgeführte DT_{50} -Wert gibt den Zeitraum an, innerhalb dessen 50 % der Verbindung nicht mehr im entsprechenden Kompartiment nachweisbar ist. Dabei wird die Abbaurrate im Boden maßgeblich durch Temperatur und Bodenwassergehalt bestimmt.

Tab. 4.2: Anwendung, Stoffklasse und physiologische Eigenschaften der Leitsubstanzen

Substanz	Anwendung	Stoffklasse	Physiologische Eigenschaften
Diuron, Isoproturon, Monuron	Herbizid	Harnstoffderivate	Totalherbizid, Wirkung auf die Photosynthese
Atrazin	Herbizid	Triazine	Photosynthesehemmer
Bromacil	Herbizid	Uracil	Totalherbizid, Wirkung auf die Photosynthese
Metolachlor, Metazachlor	Herbizid	Chloracetanilide	Hemmung des Wachstums und der Zellteilung
2,4-Dinitrophenol, 3,4-Dichlorphenol, 3,4,5-Trichlorphenol	Herbizid, Metabolit	Phenolderivate	Entkoppler der Phosphorylierung
MCPA, 2,4-D	Herbizid	Phenoxyessigsäuren	Auxin-Herbizid, wirken ähnlich wie Wachstumshormone
Bromoxynil	Herbizid	Hydroxybenzonnitril	Photosynthesehemmer, Entkoppler der Phosphorylierung
3-Chlor-4-methylanilin, 3,4-Dichloranilin	Metabolit	Chlorierte Anilinderivate	

Quelle: Hock *et al.* [1995]

In Tab. 4.2. sind die physiologischen Eigenschaften der untersuchten Leitanalyten aufgeführt, die die Entwicklung der Pflanze auf verschiedenste Weise hemmen.

4.1.1 Atrazin und Desethylatrazin

Aus der Gruppe der 1,3,5-Triazine wurden Atrazin und dessen Metabolit Desethylatrazin als Leitsubstanzen herangezogen. Triazin-Herbizide sind Verbindungen, die in 2- und 4-Position Alkylaminogruppen tragen und in 6-Position entweder chlosubstituiert sind oder eine Methylthio- oder Methoxy-Gruppe besitzen. Atrazin ist seit 1991 in Deutschland verboten. Es wurde früher vor allem im Maisanbau eingesetzt. Die Aufwandmengen lagen bei 500-3000 g/ha [Hock *et al.*, 1995]. Zu den Hauptmetaboliten des Atrazins gehören Desethylatrazin und Hydroxyatrazin. Neben Atrazin waren Desethylatrazin und Simazin zwischen 1990 und 1995 die am häufigsten untersuchten und nachgewiesenen Stoffe. Zum Teil liegen die Konzentrationen über dem Trinkwassergrenzwert von 0,1 µg/L. Dies bestätigen auch die Befunde der nationalen Messstellen Deutschlands von 1998.

Von Pflanzen wird Atrazin zu Konjugaten metabolisiert oder angereichert. Bei einigen Algenarten beträgt der Biokonzentrationsfaktor für Atrazin 10 bis 100. Für *Selenastrum capricornutum* hat Mallhot [1987] einen Wert von 20 bestimmt. Infolge langjähriger Anwendung von Atrazin und anderen Triazinen sind weltweit resistente Unkräuter aufgetreten, deren Photosynthese nicht mehr durch diese Verbindungen inhibiert wird. Grund hierfür ist eine Mutation des D2-Bindeproteins [Hock *et al.*, 1995].

Gegenüber Süßwasserfischen wie der Regenbogenforelle hat man bereits ab Atrazinkonzentrationen von wenigen µg/L Reaktionen beobachten können. So stellte das Umweltbundesamt [1993] in einer Studie Veränderungen bei der Proteinsynthese fest, während Davies *et al.* [1993] histologische Auffälligkeiten im Gewebe der Regenbogenforelle nachweisen konnte. Dagegen regiert der Wasserfloh *Daphnia magna* erst im mittleren mg/L-Bereich auf Atrazin. Gegenüber Leuchtbakterien des MicrotoxTM-Tests nimmt die Toxizität von den Chlor-, über die Methoxy- bis zu den Methylthiotriazinen zu. Simetryn beispielsweise hat einen EC₁₀-Wert von 0,01 mg/L, der Wert für Atrazin liegt dagegen bei 13 mg/L [Kaune, 1997].

Die Abbaurate von Atrazin im Wasser beträgt 10-105 Tage, wobei im Grundwasser sogar Abbauraten von 200 Tagen [Agertved *et al.*, 1992] nachgewiesen wurden. Der Abbau im Boden findet in einigen Fällen aufgrund der erhöhten mikrobiellen Aktivität vergleichsweise schnell statt. Gaynor & Volk [1981] haben festgestellt, dass die Abbaurate in gekalkten Böden niedriger ist als in ungekalkten Böden.

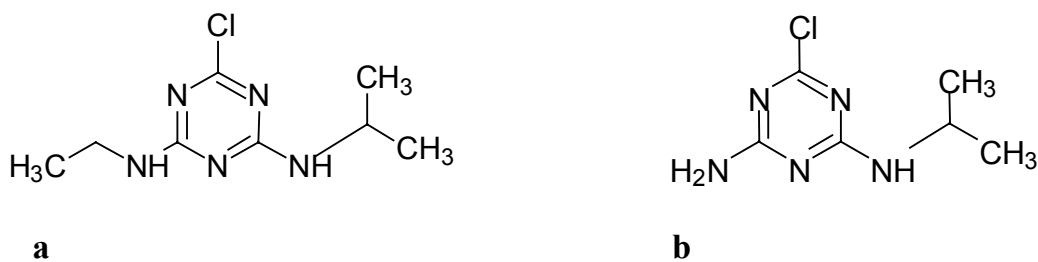


Abb. 4.1: Atrazin (a) und Desethylatrazin (b)

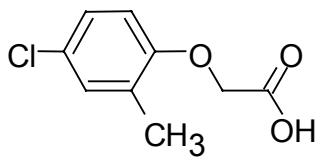
4.1.2 2,4-D und MCPA

Die Chlorphenoxyessigsäuren 2,4-Dichlor- und 4-Chlor-2-methylphenoxyessigsäure gehören zu den synthetischen Wuchsstoffen und besitzen Auxincharakter. Auxine sind Phytohormone, die das Wachstum der Pflanzen steuern, wie beispielsweise die Indollessigsäure. In höheren Konzentrationen führen sie zur Hemmung des Wachstums [Nultsch, 2001]. Ein zu trauriger Berühmtheit gelangtes Herbizid dieser Gruppe ist die 3,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure,

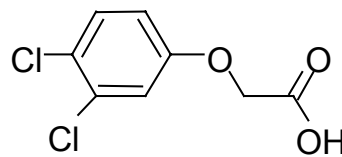
bekannt auch unter dem Namen "Agent Orange", das als Entlaubungsmittel in Vietnam zum Einsatz kam. Pflanzen können diese Verbindungen u.a. enzymatisch hydroxylieren, decarboxylieren und eine Ringspaltung herbeiführen. Dabei anfallende Abbauprodukte sind u.a. Essigsäure und Benzoesäure [Tomlin, 2000]. Ihre Anwendung liegt vor allem bei der Bekämpfung von dikotylen Unkräutern im Getreideanbau. Dabei liegen die Aufwandmengen zwischen 280-2300 g/ha [Hock *et al.*, 1995].

Sie gehören zu den mäßig persistenten Verbindungen, die im Wasser-Sediment-System nach 22 Tagen abgebaut sind [Umweltbundesamt, 1993]. Phenoxyessigsäuren sind durch ihre verhältnismäßig hohe Wasserlöslichkeit abschwemmungsgefährdet und können damit leicht über den Runoff ins Oberflächenwasser gelangen.

Ihre Toxizität gegenüber Regenbogenforellen und Daphnien liegt bei EC_{50} -Werten von 100 mg/L [Tomlin, 2000]. Die ebenfalls im Handel befindlichen Ester der 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) weisen eine höhere Toxizität auf als die Säure. 2,4-D ist eine starke Säure, und in hartem Wasser kann es zur Ausfällung von Kalzium- und Magnesiumsalzen kommen.



a



b

Abb. 4.2: MCPA (a) und 2,4-D (b)

4.1.3 Diuron, Isoproturon und Monolinuron

Zu den Phenylharnstoffderivaten gehören Diuron, Isoproturon und Monolinuron. Sie wirken bereits in $\mu\text{g/L}$ -Konzentrationen auf den photosynthetischen Elektronentransport. Die Metabolisierung von Diuron findet in der Pflanze hauptsächlich durch Hydroxylierung an der iso-Propylgruppe statt. Durch biologischen Abbau oder Hydrolyse können Anilinderivate freigesetzt werden, wie das 3,4-Dichloranilin, das auch Gegenstand der Untersuchung war (s. Kap. 4.1.7).

Diuron fungiert als Totalherbizid, das in Mengen bis zu 5000 g/ha aufgebracht wird. Es wird u.a. im Obstanbau und gegen Unkräuter auf Bahngleisen eingesetzt. Isoproturon findet seine Anwendung vor allem gegen Gräser im Getreideanbau. Die Aufwandmengen liegen hier zwischen 1000 und 1500 g/ha. Monolinuron wird im Mais- und Gemüseanbau [Tomlin, 2000]

angewendet. Im Bezugsjahr 1993/1994 wurden in Deutschland etwa 200-500 t Diuron, von Isoproturon sogar mehr als 1000 t, verkauft.

Isoproturon gehört zu den hoch persistenten Verbindungen in Wasser-Sediment-Systemen. Erst nach mehr als 200 Tagen ist die Hälfte der Ausgangsmenge abgebaut.

Die Konzentrationen an Diuron und Isoproturon in Oberflächengewässern Deutschlands betragen im Zeitraum 1990-1995 in 15 % der Fälle mehr als 0,1 µg/L .

Hinsichtlich ihrer Toxizität gegenüber Fischen und Daphnien liegen die EC₅₀-Werte der drei ausgewählten Phenylharnstoffderivate zwischen 10 und 100 mg/L. Im Vergleich ist Diuron die toxischste Verbindung der drei genannten Harnstoffherbizide, wobei der LC₅₀-Wert für die Regenbogenforelle 5.6 mg/L und für den Wasserfloh 12 mg/L beträgt.

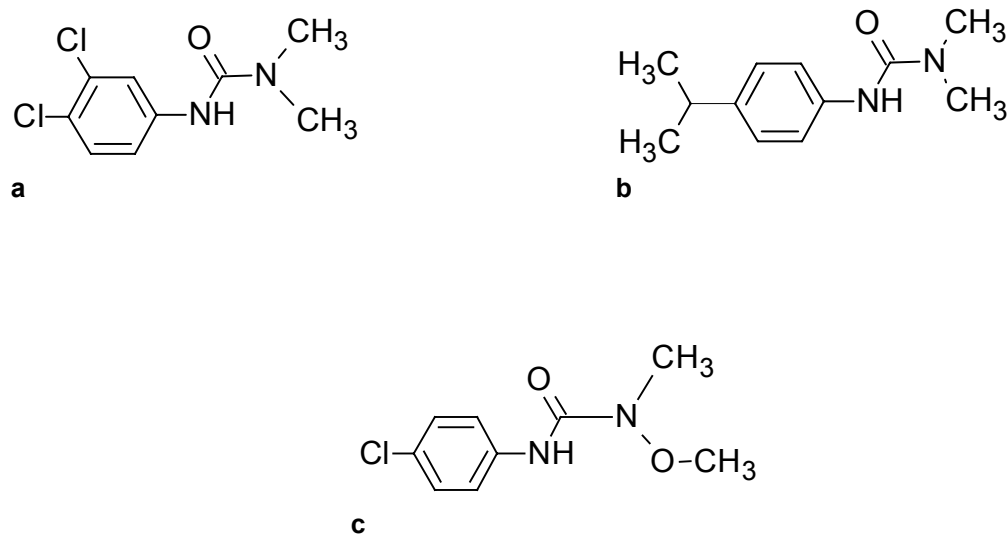


Abb. 4.3: Diuron (a), Isoproturon (b) und Monolinuron (c)

4.1.4 Metolachlor, Metazachlor

Metolachlor und Metazachlor gehören zur Gruppe der Chloracetanilide. Beide üben eine hemmende Wirkung auf die Zellteilung aus. Darüber hinaus ist bekannt, dass Metazachlor die Lipid-Biosynthese [Grimme *et al.*, 1998] hemmt. Bodenorganismen können Metazachlor zu Glutathionkonjugaten metabolisieren. Metolachlor wird in der Pflanze an der Chloracetyl- und Ethergruppe konjugiert, wobei letztere auch hydrolysiert werden kann. Eines der Hauptabbauprodukte beider Verbindungen sind Oxalsäurederivate. Seine Anwendung findet Metazachlor im Rapsanbau. Metolachlor wird vorwiegend für Mais und Hülsenfrüchte [Bach *et al.*, 2000] verwendet.

Der Abbau von Metazachlor im Boden findet schnell (DT₅₀: 3-9 d) statt, das gleiche gilt für das aquatische Kompartiment. Dagegen gilt Metolachlor als nicht abbaubar im Wasser-

Sediment-System [Bach *et al.*, 2000]. Der DT_{50} -Wert für die Hydrolyse (pH 7-9, 20°C) von Metolachlor beträgt mehr als 200 Tage. In der Zeit von 1990-1995 fand man in weniger als 5 % der untersuchten Proben Konzentrationen über 0,1 µg/L.

Die EC_{50} -Werte für Fische und Daphnien liegen im Bereich von wenigen mg/L bis zu 30 mg/L.

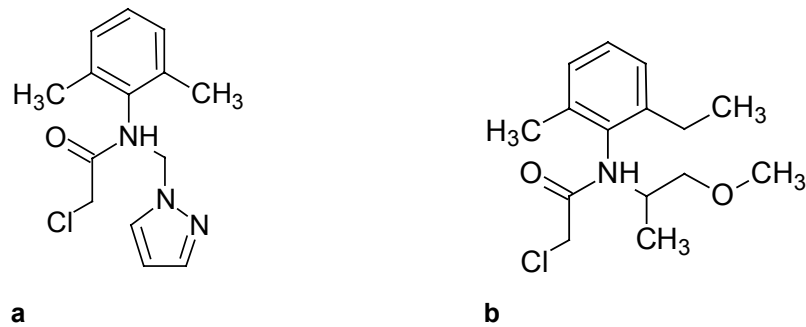


Abb. 4.4: Metazachlor (a) und Metolachlor (b)

4.1.5 Bromacil

Bromacil gehört zu den Verbindungen aus der Gruppe der Uracile. Es ist ein typischer Inhibitor des Elektronentransports im Photosystem II am D1-Protein.

Es handelt sich um ein Totalherbizid, von dem etwa 5000 bis 15000 g/ha benötigt werden.

Im Boden bleibt es ca. fünf Monate aktiv. Bromacil ist nach den Triazinen das am häufigsten nachgewiesene Pestizid in deutschen Oberflächengewässern [Umweltbundesamt, 2002]. Die Daphnien- und Fischtoxizität (EC_{50}) liegt im Bereich von 70 - 120 mg/L [Tomlin, 2000].

In Gegenwart von Kalzium kann es zu Ausfällung von Kalziumsalzen kommen. Es handelt sich um eine schwache Säure.

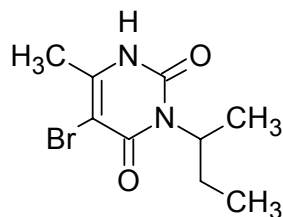


Abb. 4.5: Bromacil

4.1.6 Bromoxynil

Diese Verbindung gehört zur Gruppe der Hydroxybenzonnitrile. Seine Wirkung beruht auf der Blockierung des Elektronentransports am Plastochinonpool, dort wo auch Triazine, Phenylharnstoffderivate und Uracile angreifen. Im Boden wird es hydrolytisch abgebaut. Dabei entstehen Hydroxybenzoesäure und andere weniger toxische Verbindungen. Es ist

allgemein mikrobiell gut abbaubar [Bach *et al.*, 2000]. Dieses Herbizid wird in Mengen zwischen 400-600 g/ha beim Anbau von Getreide und Mais eingesetzt. Es fällt durch eine verhältnismäßig hohe Fischtoxizität auf, wobei die EC_{50} -Werte zwischen 0,063 und 0,46 mg/l und bei Daphnien bei 13 mg/L [Tomlin, 2000] liegen.

Sowohl im saurem und im basischem Milieu und auch gegenüber UV-Licht ist die Verbindung sehr stabil.

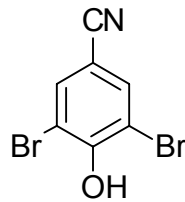


Abb. 4.6: Bromoxynil

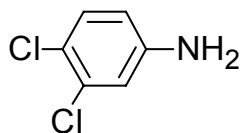
4.1.7 Anilinderivate

Bei 3,4-Dichloranilin (3,4-DCA) und 3-Chlor-4-methylanilin handelt es sich um Herbizidmetabolite.

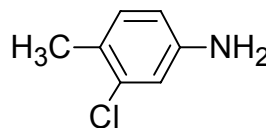
3,4-DCA wird aus Diuron und Linuron, beides Harnstoffherbizide, gebildet, wobei Diuron durch sein häufiges Auftreten im aquatischen Kompartiment als Vorläufersubstanz maßgeblich ist. Eine weitere Quelle ist die Herbizidproduktion [Girling *et al.*, 2000a]. Bekannt ist auch, dass es aus Dichlornitrobenzolen durch metabolische Reduktion entstehen [Umweltbundesamt, 1990] kann. Es handelt sich dabei um eine gut wasserlösliche Verbindung, die infolge ihrer Henry-Konstanten eine geringe Tendenz zeigt, in die Atmosphäre überzutreten. Zwischen 3,4-Dichloranilin und Huminsäuren kommt es zudem zur Bildung sowohl physikalischer als auch kovalenter Bindungen [Parris, 1980]. Dies hat zur Folge, dass sich diese Verbindung bevorzugt im Boden und Sediment anreichert. Allner [1997] konnte im Rahmen einer Dissertation zeigen, dass 3,4-DCA leicht von Fischen aufgenommen wird und zu 3,4-Dichloracetanilid metabolisiert wird. Auch eine endokrine Wirkung wurde in dieser Arbeit bei Konzentrationen zwischen 200 - 400 µg/L beobachtet. Der Hauptabbauweg wird dem photolytischen Abbau zugeschrieben. Versuche mit Klärschlämmen haben gezeigt, dass hierbei fast kein Abbau stattfindet. Teilweise findet man nach der Klärschlammbehandlung sogar höhere Konzentrationen im Wasser, was auf die Metabolisierung von Dichlornitrobenzolen zurückgeführt wird. Dabei zeigt die Verbindung unter akuten Bedingungen eine relativ geringe Toxizität, jedoch eine verhältnismäßig hohe chronische Toxizität. Dieses Verhalten beobachtet man gewöhnlich bei lipophilen

Verbindungen [Crossland, 1990]. In einem von der Europäischen Union geförderten Projekt wurde eine PNEC von 1 µg/L ermittelt [Girling *et al.*, 2000a]. In der Wassergefährdungskategorie wird 3,4-Dichloranilin deshalb als stark wassergefährdend eingestuft.

Bei 3-Chlor-4-methylanilin handelt es sich um einen Metaboliten des Herbizids Chlortoluron. Dieser Stoff ist als wassergefährdend eingestuft worden.



a



b

Abb. 4.7: 3,4-Dichloranilin (a) und 3-Chlor-4-methylanilin (b)

4.1.8 Phenolderivate

Phenol und seine Chlor-, Nitro- und Alkylderivate kommen ubiquitär vor. In dieser Arbeit wurden repräsentativ 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) und 3,4,5-Trichlorphenol (3,4,5-TCP) in die Untersuchung mit aufgenommen.

Nitrophenole

Einige von ihnen zeigen hohe Toxizität wie z.B. 4-Nitrophenol, das einen EC₅₀-Wert von 4,5 mg/L im MicrotoxTM-Test [Aitken *et al.*, 1994] aufweist. Verschiedene Nitrophenole waren früher als Pestizide im Einsatz, wie z.B. 2,4-DNP, das als Holzschutzmittel eingesetzt wurde. Neben der industriellen Herstellung bei der Produktion von Chemikalien sind auch biogene Quellen bekannt. Auch weiß man, dass Nitrophenole bei Verbrennungsprozessen, wie z.B. im Kraftfahrzeugmotor, gebildet werden [Trempe *et al.*, 1993]. Bei neueren Untersuchungen von Nebel und Regen aus dem Fichtelgebirge [Hottenroth, 2001] wurden Konzentrationen (Mediane) von 2 bzw. 0,8 µg/L für 2,4-DNP gemessen. Es hat sich gezeigt, dass das Regenwasser von Fichtennadelbeständen höhere Konzentrationen an Mono- und Nitrophenolen aufweist als dasjenige anderer Baumbestände [Schleyer *et al.*, 1995]. In einem Berliner Oberflächenwassermonitoring wurden Mononitrophenole in Konzentrationen von 100 ng/L gemessen. 2,4-DNP hingegen lag unterhalb der Nachweisgrenze von 25 ng/L [Schmidt-Bäumler *et al.*, 1999].

Chlorphenole

Chlorphenole werden zum Teil industriell hergestellt, aber auch metabolisch aus Chlorbenzolen gebildet. Ihre Stabilität, vor allem die der höher chlorierten Verbindungen, und ihre hohe Toxizität haben die Behörden dazu veranlasst, neben anderen Phenolen diese in Monitoringprogramme aufzunehmen. Vielfache Anwendung finden Chlorphenole in Desinfektionsmitteln. Sie wirken bakterizid, wie das 2,4-Dichlorphenol, oder bakteriostatisch [Kunz & Frietsch, 1986]. Die Herstellung von Trichlorphenolen hat allerdings aufgrund der Gefahr der Bildung von Dioxinen abgenommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde 3,4,5-Trichlorphenol als Vertreter der Chlorphenole in die Gruppe der Leitsubstanzen aufgenommen.

4.2 Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Vorkommen mittelpolarer bis polarer Verbindungen in Flusswasser, die ein ökotoxikologisches Potential besitzen, untersucht. Anhand von Leitsubstanzen wurden flüssigkeitschromatographische Methoden erarbeitet.

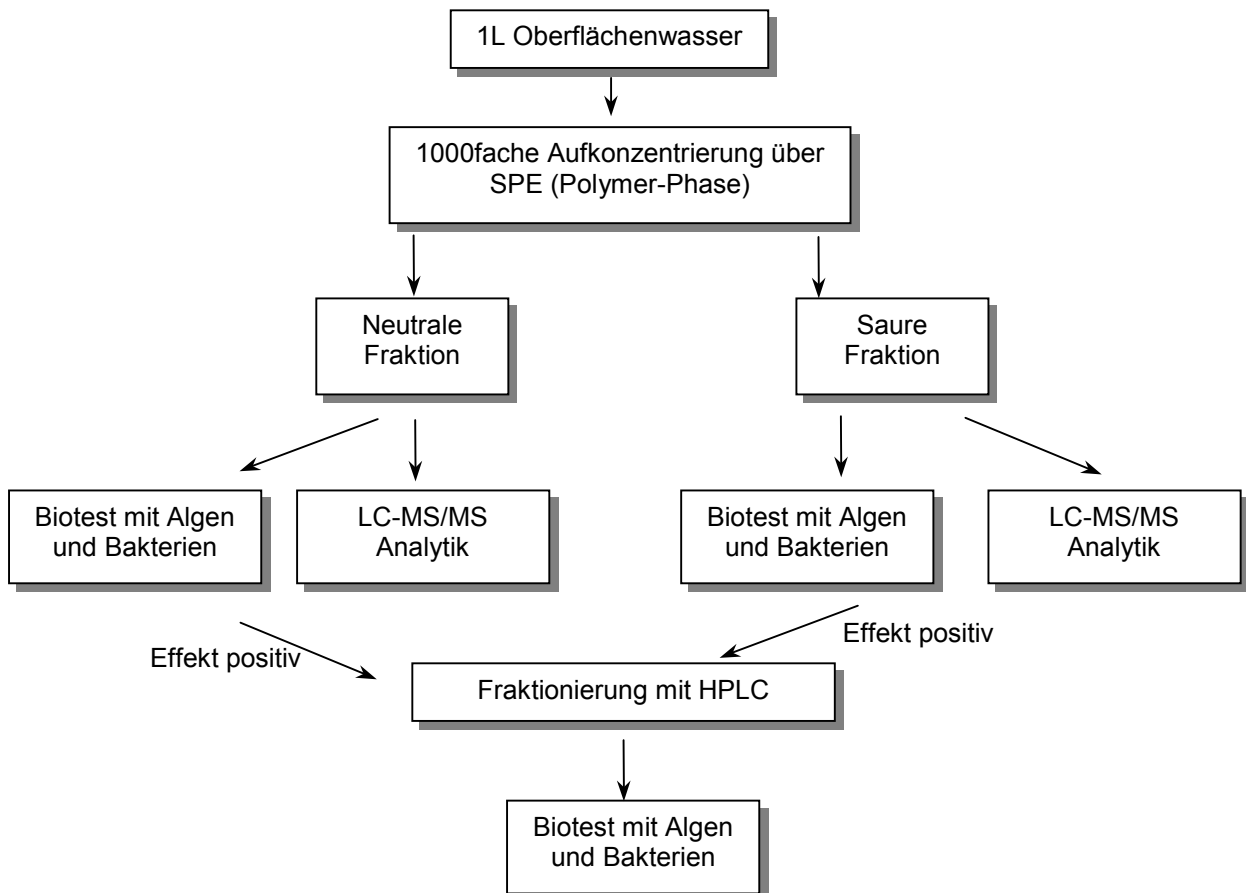


Abb. 4.8: Fließschema für den geplanten Ablauf der ökotoxikologischen und analytischen Untersuchung der Fließgewässerproben

In Abb. 4.8 ist die Vorgehensweise für die ökotoxikologische und analytische Untersuchung dargestellt. Da von den Flusswasserproben keine akute Wirkung ausging, war eine Anreicherung der organischen Fraktion erforderlich. Für die Extraktion organischer Verbindungen ist die Festphasenextraktion eine geeignete Anreicherungsverfahren. Sie ermöglicht zum einen einen hohen Probendurchsatz, und zum anderen erfordert sie einen geringen Lösungsmiteleinsatz, was bei Verwendung von Biotests unumgänglich ist, da diese oftmals in geringen Konzentrationen toxisch wirken. Auch im Bereich der toxizitätsgeleiteten Fraktionierung von Umweltproben wurde diese Form der Anreicherung gewählt [Fiehn, 1997; Kosian *et al.*, 1998; Baun *et al.*, 1999; Reineke *et al.*, 2002]. Zur Detektion und zur Fraktionierung der Proben wurde zunächst die HPLC-Technik und später die LC-MS/MS-Technik eingesetzt.

4.2.1 Fraktionierung der polaren Verbindungen

Unter der Vielzahl von Sorbentien, die in der Festphasenextraktion eingesetzt werden, wurde eine Phase gewählt, die zum einen mittelpolare bis polare Verbindungen extrahiert und zum anderen eine möglichst große Stoffgruppe erfasst. Zu den Festphasen gehören modifizierte Kieselgele, die sogenannten "Reversed-Phasen". Sie enthalten unterschiedliche Liganden, u.a. Dodecyl-, Butyl-, oder Phenolreste und werden zur Extraktion unpolarer Verbindungen ($\log K_{OW} > 3$) [Tölgyessy & Liska, 1999] eingesetzt. Darüber hinaus gibt es Sorbentien auf Polymerbasis, welche unterschiedliche Selektivität gegenüber polaren organischen Wasserinhaltsstoffen aufweisen. Es wurde ein Polystyrol-Divinylbenzol-Sorbens (SDVB) gewählt, das mittelpolare bis polare Verbindungsklassen effektiv extrahiert [Purvis *et al.*, 1999]. Dieses Sorbens eignet sich zudem für Screeninguntersuchungen [Kolbe *et al.*, 1999], da hiermit gute Wiederfindungsraten für viele wässrige organische Spurenstoffe, die einen weiten Bereich verschiedener Eigenschaften abdecken, erzielt werden. Diese liegen in der Regel bei mehr als 60 % [Tölgyessy & Liska, 1999].

Das eingesetzte Sorbens Isolute ENV+ (Fa. International Sorbent Technology) besitzt eine Porengröße von 850 Å und eine Oberfläche von 1100 m²/g. Durch die große Oberfläche der SDVB-Phasen ist die Kapazität sehr hoch, und auch die Adsorption gegenüber polaren Pestiziden ist 20-60fach höher als die ihrer Vorgänger [Hennion *et al.*, 1998], die XAD-Phasen. Die hohe Affinität gegenüber polaren Substanzen führt zwar zu guten Ausbeuten, unerwünschte Begleitsubstanzen wie Huminsäuren werden jedoch gleichfalls extrahiert. Dabei werden vor allem Huminstoffe mit niedrigen Molekülmassen zurückgehalten, da die Phase ähnliche Eigenschaften wie die Ionenausschlusschromatographie aufweist und größere

Moleküle nicht retiniert werden. Die Anreicherung eines großen Teils des organischen Inventars der Probe war im Rahmen einer Non-Target-Analytik, die zum Ziel hat, unbekannte Stoffe zu detektieren, erwünscht.

Saure Verbindungen, die unter neutralen Bedingungen dissoziiert vorliegen, werden mit der SDVB-Phase nicht erfasst. Neben der neutralen Anreicherung wurde auch eine saure Extraktion durchgeführt, um auch diese Verbindungsklasse, wozu eine Reihe von Herbiziden und andere ökotoxikologisch relevante Stoffe wie phenolische Verbindungen gehören, in die Untersuchung einzubeziehen. Die pH-Wert-Einstellung der Probe entscheidet somit, welche organische Fraktion der Probe extrahiert wird. Eine solche Vorfraktionierung wurde zur Untersuchung von belasteten Oberflächengewässern und Grundwässern auch von anderen Arbeitsgruppen [Hendriks *et al.*, 1994; Baun *et al.*, 1999] durchgeführt.

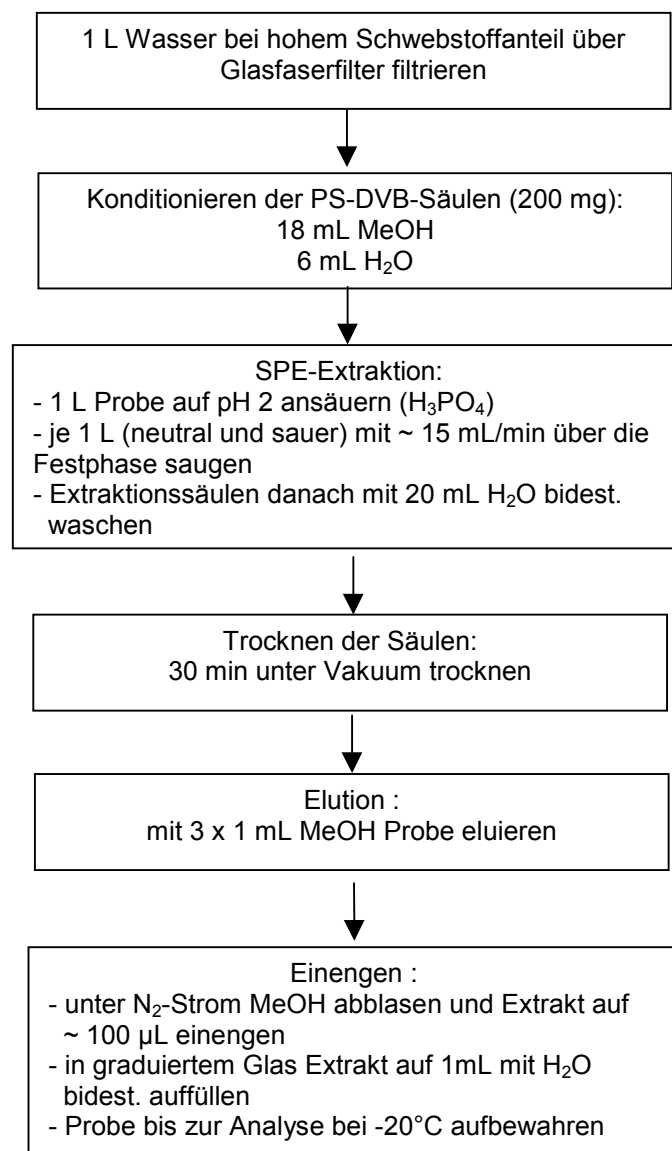


Abb. 4.9: Fließschema für die SPE-Extraktion einschließlich Vorfraktionierung

In Abb. 4.9 ist der Verlauf der Anreicherung einschließlich Vorfraktionierung dargestellt.

Die neutralen und sauren Extrakte wurden jeweils aus der ursprünglichen Probe gewonnen, um eine Veränderung durch den Einsatz von Festphasen so gering wie möglich zu halten. Somit enthält das neutral angereicherte Extrakt zum Teil auch basische Verbindungen, während das unter sauren Bedingungen angereicherte Extrakt saure und neutrale Verbindungsklassen vereint. Darüber hinaus wurden die Proben vor der Extraktion über einen Glasfilter filtriert, um ein Verstopfen der Festphasen zu vermeiden. Die Filtratrückstände wurden nicht zusätzlich untersucht, da die Targetsubstanzen zu 99 % in Lösung vorliegen [Mitobe *et al.*, 2001].

4.2.2 HPLC-Analytik mit DAD-Detektion

Zur Bestimmung der Herbizide und für eine weitere Fraktionierung des Festphasenextrakts im Sinne der biotest-geleiteten Analytik wurde eine HPLC-Methode mit UV-Detektion erarbeitet. Als Detektor wurde ein Diodenarray-Detektor eingesetzt, wodurch die Aufnahme von UV-Spektren und weitere Identifizierungsmöglichkeiten gegeben waren. Im Anhang 8.4.1 werden die Parameter für die HPLC-Methode, u.a die UV-Maxima der Leitsubstanzen, aufgeführt. Da die Maxima der meisten Leitsubstanzen größer als 200 nm sind, heben sie sich vom matrixbedingten Untergrund ab, der ab 220 nm absorbiert. Die Maxima für Metolachlor und Metazachlor liegen jedoch bei 200 nm, wodurch die Identifizierung erschwert wird. Als Kompromiss zwischen den verschiedenen Maxima wurde das Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 240 nm aufgenommen. Die Nachweisgrenze wird zudem durch die Koelution vieler wässriger Matrixkomponenten reduziert. Hinzu kommt, dass Matrixkomponenten das UV-Spektrum der Analyten beeinflussen und so eine Identifizierung aufgrund des Spektrums erschwert ist. Dies gilt besonders für die früh eluierenden Substanzen wie Phenoxyessigsäuren, die durch die ebenfalls zu Beginn eluierenden UV-aktiven Humin- und Fulvosäuren gestört werden. In Abb. 4.10 sind die HPLC-Chromatogramme von Extrakten eines wässrigen Standards, eines dotierten Quellwassers und einer dotierten Flusswasserprobe gegenübergestellt. Anhand der Grundlinie ist ersichtlich, dass die Matrixeffekte mit der Belastung des Wassers zunehmen.

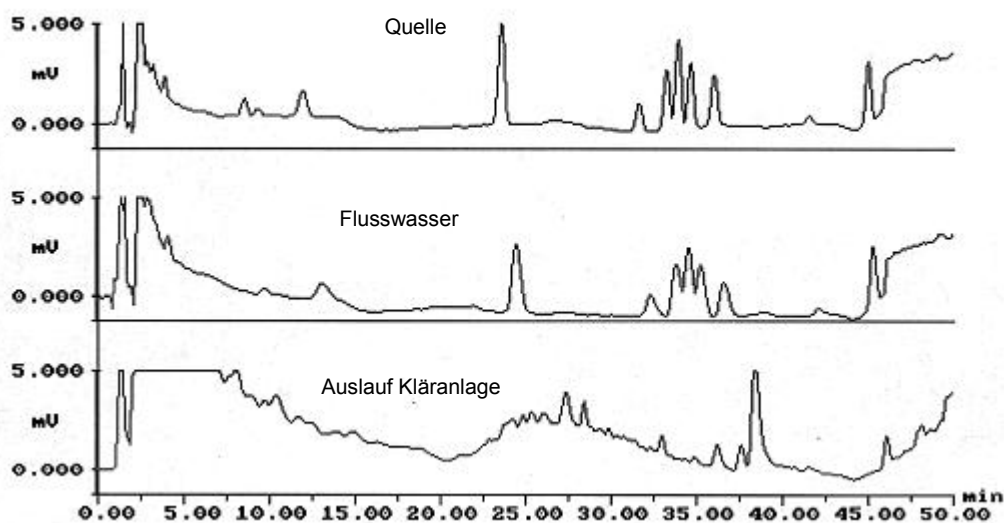


Abb. 4.10: HPLC-UV-Chromatogramme von SPE-Extrakten einer Quelle, eines Flusswassers und eines Kläranlagenauslaufs

Die chromatographischen Bedingungen wurden nach folgenden Gesichtspunkten optimiert. Mit der HPLC-Analytik sollte sowohl die Möglichkeit gegeben werden, verschiedene Analyten eines großen Polaritätsbereichs zu erfassen als auch die aus der chromatographischen Trennung gewonnenen Fraktionen anschließend einem Biotest unterwerfen zu können. Da die Fraktionen zur Untersuchung mit dem Biotest zuvor eingengt werden müssen, dürfen die Fließmittel keine Puffer und Lösungsmittel enthalten, die sich durch den Aufkonzentrierungsschritt negativ auf die Biotests auswirken. Dazu gehört z.B. ein zu hoher Salzgehalt wie auch ein zu niedriger pH-Wert. Phosphatpuffer (5 mM) und Acetonitril wurden als organisches Lösungsmittel gewählt. Üblicherweise wird die mobile Phase angesäuert [Peruzzi *et al.*, 2000], um eine verbesserte Trennung der Phenoxyessigsäuren zu erzielen. Diese Möglichkeit wurde jedoch für diese Methode ausgeschlossen, da die Phosphorsäure bei Aufkonzentrierung der Fraktionen zu stark sauren Lösungen geführt hätte. Die instrumentellen Nachweisgrenzen, die für einen Teil der Leitanalyten (s. Tab. 4.3) bestimmt wurden, liegen zwischen 10 - 500 µg/L.

Tab. 4.3: Nachweisgrenzen [µg/L] für die HPLC-DAD- Methode ohne Aufarbeitung

Bromacil	Atrazin	3-Chlor-4-methyl-anilin	Isopro-turon	Diuron	Metaza-chlor	3,4,5-TCP	Metola-chlor	MCPA	2,4-D
10	10	10	10	10	10	10	500	50	50

Vergleichbare Nachweisgrenzen für die genannten Verbindungen sind mit off-line und on-line Methoden in anderen Arbeiten [Aguilar *et al.*, 1996] erzielt worden. Durch den Anreicherungsschritt mittels Festphase verbessern sich die Nachweisgrenzen, so dass diese für die gesamte Methode unter Berücksichtigung von Blindwert und Wiederfindung zwischen 0,1 und 5 µg/L liegen. In Tab. 4.4 sind Wiederfindung und Wiederholbarkeit für einige Leitanalyten, die unter neutralen Bedingungen angereichert wurden, aufgeführt. Die geringen Ausbeuten von 3-Chlor-4-methyl-anilin und Trichlorphenol können unterschiedliche Ursachen haben. In Frage kommen unvollständige Adsorption, unvollständige Elution bzw. Verluste bei der Einengung des Eluats. Phenoxyessigsäuren mit pK_a -Werten < 3 werden unter diesen Bedingungen nicht angereichert, da sie dissoziiert vorliegen und somit nicht an der unpolaren Oberfläche des Sorbens retiniert werden.

Tab. 4.4: Wiederfindung¹ und Wiederholbarkeit für einige Leitsubstanzen (n=3)

	Bromacil	Atrazin	3-Chlor- 4-methyl- anilin	Isoproturon	Diuron	Metaza- chlor	3,4,5- TCP	Metolachlor
Wieder- findung [%]	89	118	57	80	88	72	39	85
Wiederhol- barkeit [%]	5,4	5,2	3,2	7,0	7,9	2,5	5,0	5,8

¹dotiertes Flusswasser (je 1 µg/L)

Bei der Untersuchung von zwei Flusswasserextrakten wurden Desethylatrazin und Atrazin in Konzentrationen von etwa 100 ng/L nachgewiesen. Spätere Messungen mit der LC-MS/MS-Analytik zeigten (s. Kap. 4.3), dass weitere Leitsubstanzen zwar enthalten waren, ihre Konzentrationen jedoch unterhalb der Nachweisgrenze für die HPLC-Methode lagen.

4.2.3 LC-MS/MS-Analytik

Es wurde eine LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung der Leitanalyten ausgearbeitet, um auch Wasserbelastungen im Spurenbereich erfassen zu können. Dadurch konnten die Nachweisgrenzen gegenüber der HPLC-Methode deutlich verbessert werden. Sie liegen im unteren ng/L-Bereich.

4.2.3.1 LC-MS/MS in der Umweltanalytik

Zur Bestimmung mittelpolarer Substanzen, wozu viele Vertreter der Pestizide und auch die meisten Arzneimittel gehören, eignet sich in besonderer Weise die Flüssigkeitschromato-

graphie mit einer MS/MS-Kopplung. Hiermit können auch Abbauprodukte von Pestiziden, die meistens einen polaren Charakter haben als ihre Vorläufer, und unbekannte toxische Verbindungen im aquatischen Bereich gemessen werden. Vorteil dieser Technik ist die Messung wenig flüchtiger Verbindungen ohne eine aufwendige Derivatisierung, wie sie in der GC/MS erforderlich ist. Die LC-MS, insbesondere die LC-MS/MS-Technik, stellt eine selektive und zugleich empfindliche Detektionsmöglichkeit dar. Im Vergleich zur HPLC-Analytik ist sie bis zu drei Größenordnungen empfindlicher. Einige Arbeiten belegen Nachweisgrenzen für verschiedene Pestizide im unteren ng/L-Bereich [Curini *et al.*, 2000; Di Corcia *et al.*, 2000]. Mit dieser Technik können polare organische Substanzen im unteren Massenbereich detektiert werden. Zu nennen sind hier unter anderem Herbizide und deren Metabolite, Antibiotikarückstände wie auch Abbauprodukte aus der Atmosphäre, wie Nitrophenole [Hottenroth, 2001] und Halogenessigsäuren [Takino *et al.*, 2000; Gros, 2002]. Bei der Identifizierung von Abwasserinhaltsstoffen [Ceglarek *et al.*, 1999; Schröder, 1993; Castillo & Barceló, 1999] oder in der klinischen und forensischen Toxikologie zur Bestimmung von Drogen und Giften [Marquet & Lachatre, 1999] bietet diese Technik viele Möglichkeiten. Neben dem Einsatz für die Targetanalytik im Spurenbereich [Steen *et al.*, 1999] ist die LC-MS/MS-Technik auch geeignet, unbekannte mittelpolare bis polare Substanzen zu bestimmen. Dies ist vor allem für den aquatischen Bereich von Bedeutung, da gerade solche Verbindungen in der ökotoxikologischen Bewertung eine Rolle spielen. Allerdings gestaltet sich die Interpretation der Massenspektren schwieriger als in der GC-MS, da entsprechende Bibliotheken fehlen. Der Grund für fehlende Vergleichspektren liegt darin, dass Spektren zum einen von den jeweiligen Einstellungen am LC-MS, zum anderen von den HPLC-Bedingungen abhängig sind. Schröder [1997] konnte mittels Fließinjektionsanalyse und MS/MS-Detektion verschiedene Tenside und aromatische Sulfonsäuren im Elbewasser identifizieren.

4.2.3.2 Prinzip der LC-MS/MS-Detektion

Zur Ionisierung und Verdampfung der LC-Eluenten wird eine Spraytechnik, die bei Atmosphärendruck arbeitet, angewendet. In dieser Arbeit wurde ein API 3000-Gerät von der Firma Sciex (Canada) eingesetzt. Die Ionisierung findet in einer TurboIonSpray-Quelle statt, bei der ein pneumatisch unterstütztes Elektrospray zur Anwendung kommt. Bei höheren Flüssen kann die Zerstäubung durch ein heizbares Hilfsgas verbessert werden. Es handelt sich hierbei um eine schwache Ionisierung, die zur Bildung von Quasi-Molekülen führt. Im Gegensatz dazu steht die APCI-Quelle (chemische Ionisierung mittels Gasmolekülen), bei der eine härtere Ionisierung stattfindet. Die Verdampfung des Eluenten und die Ionisierung der

Analyten beruht auf einer besonderen Technik der Electro-Spray-Ionisation (ESI). Mittels einer speziellen Kapillare, an die eine positive oder negative Ionisierungsspannung (IS) von mehreren Tausend Volt angelegt wird, wird die Probe zerstäubt (Abb. 4.11) und ein Teil der Verbindungen ionisiert. Nicht ionisierte Teilchen verdampfen, was zu einer Erhöhung der Ladung auf den gebildeten Tröpfchen führt. Dadurch kommt es zur elektrischen Abstoßung gleich geladener Teilchen, und es treten Ionen aus dem Tropfen aus. Dieser Vorgang findet solange statt, bis ebenso viele positive wie negative Ionen vorliegen [Budzikiewicz, 1998]. Zurück bleiben unlösliche Rückstände. Dieser Prozess ist um so effizienter, je geringer die Oberflächenspannung des Lösungsmittel ist und je niedriger die Flussraten sind. Die geladenen Teilchen treten anschließend über das Orifice in das unter Hochvakuum stehende Quadrupolsystem ein.

TurboIonSpray Source:

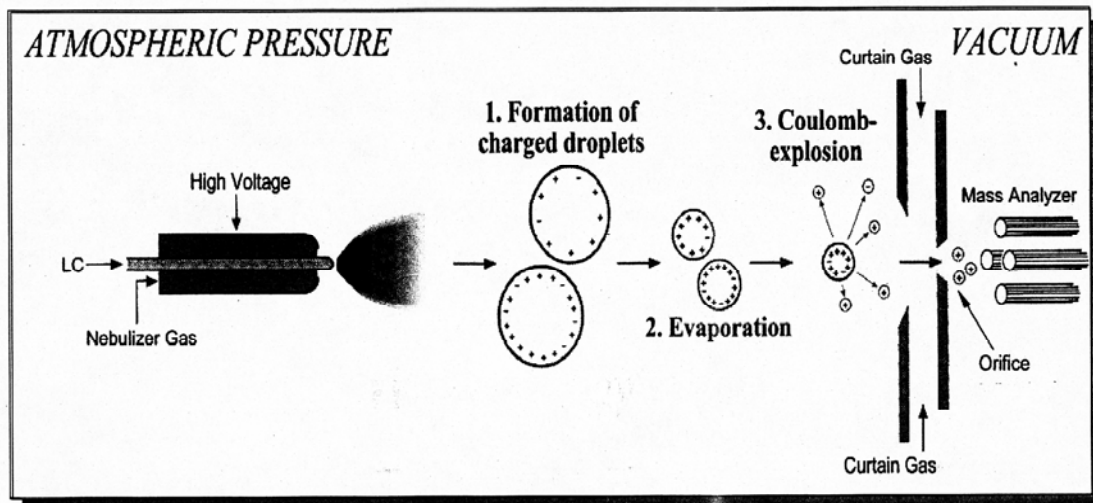


Abb. 4.11: Ablauf der Ionenbildung in der Ionensprayquelle

Quelle: Applied Biosystems

Das Curtain-Gas verbessert die Empfindlichkeit, da unerwünschte nicht ionisierte Matrix-Komponenten und Lösungsmittelmoleküle durch den Stickstoffstrom entfernt werden. Die hohe Sensitivität und Selektivität dieser Technik beruht zudem auf der Kopplung dreier Quadrupole, daher auch der Name Tandem-Massenspektrometrie. Im ersten der Quadrupole wird das Molekülion isoliert und mittels verschiedener Spannungen in den zweiten Quadrupol geleitet. Der zweite Quadrupol wird als Kollisionszelle genutzt, in der das Molekülion (Precursorion) durch den Zusammenstoß mit Gasmolekülen und verstärkt durch die

Einwirkung einer Zugspannung (CE - Kollisionenergie) in mehrere Fragmentionen (Produktion) zerfällt. Das intensivste dieser Fragmentionen wird anschließend detektiert.

Das System bietet verschiedene Messverfahren an, darunter den Scan-Modus und das Single-Ion-Monitoring (SIM). Bei der hier angewendeten Methode kam der MRM-Modus, das "Multiple-Reaction-Monitoring", zum Einsatz, mit der die parallele Detektion von Vorläufer- und Produkt-Ionen möglich ist. Zunächst fokussiert der erste Quadrupol das ausgewählte Molekülion, im zweiten Quadrupol wird anschließend durch Kollision mit Gasmolekülen eine Fragmentierung dieses Molekülions bewirkt, und im dritten Quadrupol wird das intensivste Fragmention detektiert und quantifiziert.

Schließlich beruht die hohe Selektivität darauf, dass zur Identifizierung einer Substanz drei Parameter, die Retentionszeit, das Vorläuferion und das Fragmention übereinstimmen müssen.

Neben den gebildeten Quasi-Molekülionen $[M+H]^+$ und $[M-H]^-$ entstehen geladene Cluster. Cluster sind Molekülaggregate, die aus einer Verbindung mit einem oder mehreren Solvensmolekülen wie Wasser, organischen Molekülen (Acetonitril, Methanol etc.) oder Pufferionen (Kalium, Natrium, Ammonium) bestehen. Matrixbestandteile wie beispielsweise Huminstoffe haben einen Einfluss auf die Ionisierungsausbeute, weshalb dies auch bei der Validierung überprüft werden sollte [Hogendoorn *et al.*, 1999]. Geerdink *et al.* [1999] überprüften drei Monate lang die Stabilität von Massenspektren und stellten für eine Reihe von Herbiziden fest, dass diese einer Schwankung von 30-100 % unterliegen. Ebenso hat die Flussrate einen Einfluss auf das Ionensignal, welches bei höheren Fließgeschwindigkeiten reduziert wird. Asperger *et al.* [2001] demonstriert, dass bereits ab einer Fließgeschwindigkeit von 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ die Peakfläche aller getesteten Pestizide um 40 bis 80 % reduziert wird.

4.2.3.3 Methodenentwicklung

Zur Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode ist es zunächst erforderlich, die Molekülmassen der jeweiligen Analyten zu kennen. Die Struktur der Analyten gibt zudem Aufschluss darüber, welche Fragmentionen gebildet werden können.

Je nach Struktur der Verbindung wird meist entweder der negative oder der positive Modus favorisiert. Die Molekülionen im positiven Modus $[M+H]^+$ werden durch Anlagerung eines Protons oder Kations positiv geladen, dagegen wird im negativen Modus ein Proton $[M-H]^-$ abgespalten oder ein Anion addiert. Basische Verbindungen werden gemäß ihrer Neigung, Protonen aufzunehmen, leichter im positiven Modus gemessen. Beispiele hierfür sind die Harnstoffderivate und Triazinderivate. Saure Verbindungen hingegen lassen sich, auf Grund ihrer Eigenschaft Protonen abzugeben, empfindlicher im negativen Modus messen. Zu ihnen

gehören Phenoxy-carbonsäuren und Phenolderivate. Schließlich gibt es Verbindungen, die sowohl im positiven als auch im negativen Modus detektiert werden können. Dazu gehören z.B. Bromacil oder Verbindungen, die saure und basische Gruppen aufweisen.

Für jede Verbindung werden die Einstellungen optimiert, um eine Substanz eindeutig zu detektieren und möglichst empfindlich quantifizieren zu können. Hierbei werden verschiedene Spannungen, die an den Quadrupolen anliegen, optimiert. Dazu wird eine Standardlösung ($c = 1 \text{ mg/L}$) mittels einer Spritzenpumpe mit einem Fluss von etwa 5 - 10 $\mu\text{L/min}$ in die Ionenquelle (TurboIonSpray) eingeführt. Die Lösungen werden in einem Gemisch aus Lösungsmittel und wässriger Lösung in einem Verhältnis von 1:1 hergestellt. Zur Verbesserung der Empfindlichkeit werden die Pestizidstandards in verschiedenen Ammoniumacetat- und -formiat-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 1 bis 10 mM angesetzt. Diese Lösungen zeigen jedoch durch Bildung von Clustern ein erhöhtes Grundrauschen; sie führen eher zu einer Erniedrigung der Ionenausbeute des betreffenden Analyten. D'Ascenzo *et al.* [1998] zeigten, dass durch Anwesenheit von Kationen die Bildung von $[\text{MH}]^+$ -Ionen unterdrückt wird, da die Bildung von $[\text{MK}]^+$ und $[\text{MNa}]^+$ in Konkurrenz tritt. Der Einsatz von Ameisensäure (1-10 mM) führt zu einer Verstärkung und Stabilisierung des Signals, da so das Gleichgewicht auf die Seite der $[\text{MH}]^+$ -Ionen verlagert wird. Auch Baltussen *et al.* [1998] stellten fest, dass der Zusatz von Ammoniumacetat ein komplexeres Grundrauschen hervorbringt. Zu einer deutlichen Verbesserung des Ionensignals kommt es durch Ansäuern der Lösung mit 0,1 % (=18 mM) Ameisensäure.

Bei der Optimierung der instrumentellen Parameter kommt es vor allem auf die Ionisierungsspannung (IS) und die Declusteringsspannung (DP) am Orifice an, die für die Ausbeute des Molekülions verantwortlich sind. Die Kollisionsenergie hat dagegen einen wesentlichen Einfluss auf die Ausbeute des Fragmentions. Weitere Spannungen, die optimiert werden, sind die Fokussierungs-Spannung (FP) und die Ausgangs-Spannung (CXP) in der Kollisionszelle. Bei höheren Flüssen, wie sie durch Kopplung mit der HPLC vorkommen, ist vor allem sicherzustellen, dass die in der Ionenquelle ankommende mobile Phase vollständig verdampft wird, um nicht bereits in der Ionenquelle Ionen durch nicht verdampfte Tröpfchen einzubüßen. Weiterhin sei darauf hingewiesen, dass eine Erhöhung der Declusteringsspannung zwar, wie der Name bereits impliziert, eine Reduzierung der Cluster mit sich bringt, jedoch auch zur partiellen Fragmentierung der Molekülionen führen kann, die anschließend für die MS/MS-Detektion nicht mehr zur Verfügung stehen.

Im Anhang 8.4.2 sind die optimierten Spannungen für die im positiven und negativen Modus gemessenen Analyten aufgeführt. Die Dwell-Time (Verweilzeit) betrug für alle Verbindungen sowohl im positiven als auch im negativen Modus 150 ms.

Neben der Optimierung der Spannungen spielen die in der HPLC verwendeten mobilen Phasen bei der Sensitivitätssteigerung eine wesentliche Rolle. In dieser Arbeit wurden Methanol und Acetonitril eingesetzt. Als Modifier wurde Essigsäure verwendet. Es hat sich gezeigt, dass mit Acetonitril im positiven MRM-Modus und mit Methanol im negativen MRM-Modus die Analyten am empfindlichsten detektiert werden konnten. Einige Arbeiten haben dagegen belegen können, dass Methanol die besseren Nachweisgrenzen erzielt [Steen *et al.*, 1999]. Es wurde eine kurze Säule mit einem kleinen Durchmesser gewählt, um den chromatographischen Prozess sowohl mit einem geringen Fluss zu ermöglichen als auch kürzere Trennzeiten für eine Probe zu erzielen. Im Gegensatz zur klassischen HPLC mit UV-Detektion ist durch die Massenspektrometrie die Möglichkeit gegeben, koeluierende Analyten analytisch getrennt zu erfassen, indem beim Multi-Reaktion-Monitoring parallel mehrere Massenübergänge gemessen werden können. Es wurde angenommen, dass der dadurch auftretende Sensitivitätsverlust vernachlässigbar ist. Inwieweit das Setzen von Fenstern die Nachweisgrenze verbessert, wurde nicht überprüft. Durch einen schnell ansteigenden Gradienten kann die Laufzeit deutlich verkürzt werden. Das hier eingesetzte Programm im positiven Modus dauert etwa 25 min. Die HPLC-Methode dauert dagegen mehr als doppelt so lange. In der folgenden Tabelle sind die LC-Parameter für die LC-MS/MS-Analytik aufgeführt.

Tab. 4.5: LC Parameter

Säule	125 x 2.0 mm Supersphere RP18, 4.0 µm					
Pumpe:	Perkin-Elmer Series 2000 (Toronto, Canada)					
Autosampler:	Perkin-Elmer Series 2000 (Toronto, Canada)					
Injektor:	Rheodyne-Ventil					
Injektionsvolumen:	20 µL					
Mobile Phasen	A:	bidest. H ₂ O; 0,1 % Essigsäure				
	B:	- pos. Modus: 0,1 % Essigsäure, ACN - neg. Modus: 0,1 % Essigsäure MeOH				
Gradient:	min	%	mL/min	min	%	mL/min
	0-3	80 B	0,2	0-10	80 B	0,2
	3-15	80 B	0,2	10-11	80 B	0,2
	15-19	60 A	0,4	11-15	100 A	0,2
	20-21	60 A	0,2			

4.2.3.4 Positiver MRM-Modus

Im positiven MRM-Modus wurden alle stickstoffhaltigen Pestizide am empfindlichsten gemessen. Bromacil ließ sich auch im negativen Modus messen, jedoch mit geringerer Empfindlichkeit.

Aus der nachfolgenden Tabelle sind die jeweiligen Massen der Molekül- und Fragmentionen der untersuchten Herbizide zu entnehmen. Verschiedene Autoren [Geerdink *et al.*, 1999; Di Corcia *et al.*, 2000; Di Corcia *et al.*, 1999], die ebenfalls mit einer Elektrospray-Quelle gearbeitet haben, setzen die Massen ebenfalls zur Identifizierung bzw. Quantifizierung dieser Verbindungen ein.

Tab. 4.6: Molekülmassen und deren Fragmente im positiven Modus

Analyt	Masse des Molekül-Ions + [H] ⁺	Masse des Fragment-Ions
Diuron	233	72
Atrazin	216	174
Desethylatrazin	188	147
Metolachlor	284	252
Metazachlor	278	210
Isoproturon	207	72
Monolinuron	215	127
Bromacil	263	207
3,4-Dichloranilin	162	127
3-Chlor-4-methylanilin	142	107

Die nachfolgend vorgeschlagenen Fragmentierungsschemata sind unter anderem auf der Grundlage der Arbeit von Baglio *et al.* [1999] entstanden. Nicht immer konnte ein schlüssiger Fragmentierungsweg gefunden werden. In diesen Fällen wurden die Abgangsgruppen eingetragen. Bei den Zerfallsprodukten von 3-Chlor-4-methylanilin, 3,4-Dichloranilin und Monolinuron handelt es sich der Masse nach nicht um protonierte Fragmente. Diese Fragmente wurden auch von Di Corcia *et al.* [1999] und Giraud *et al.* [1997] zur

Quantifizierung und Identifizierung der betreffenden Moleküle herangezogen. In der bisherigen Literatur sind nicht alle gemessenen Fragmente endgültig geklärt. In dieser Arbeit wurde soweit wie möglich eine plausible Erklärung für die gemessenen Produktionen angestrebt, was in einigen Fällen durch die Differenzmasse von eins nicht möglich war. Da jedoch auch andere Autoren diese Masse identifiziert haben, wurde dies als Bestätigung für die Existenz dieses Produkt-Ions herangezogen.

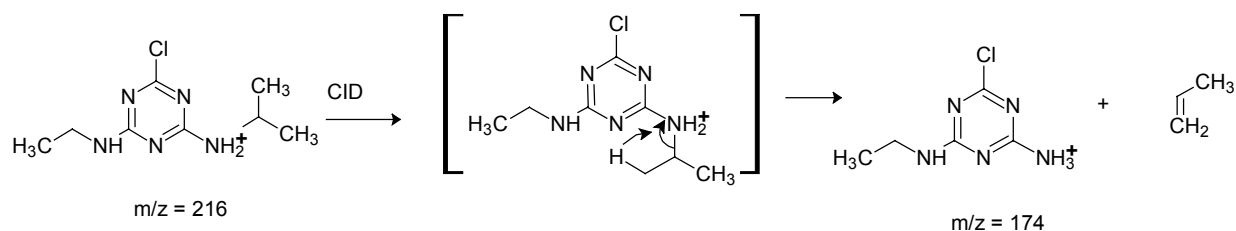


Abb. 4.12: Fragmentierungsvorschlag für Atrazin

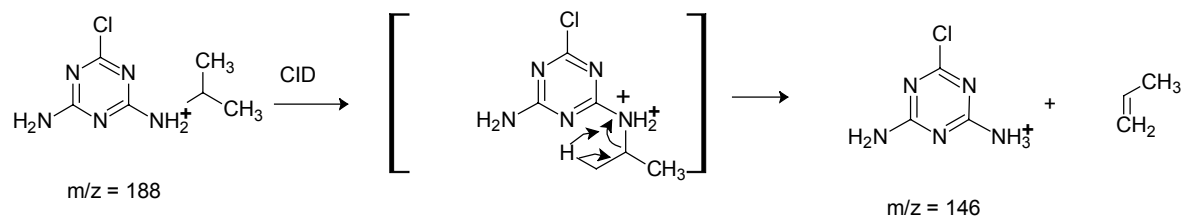


Abb. 4.13: Fragmentierungsvorschlag für Desethylatrazin

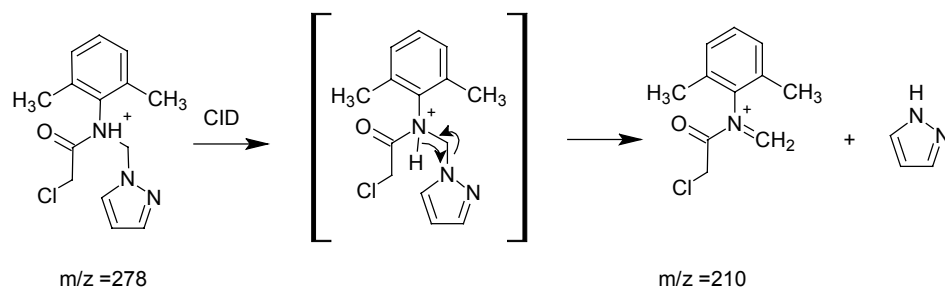


Abb. 4.14: Fragmentierungsvorschlag für Metazachlor

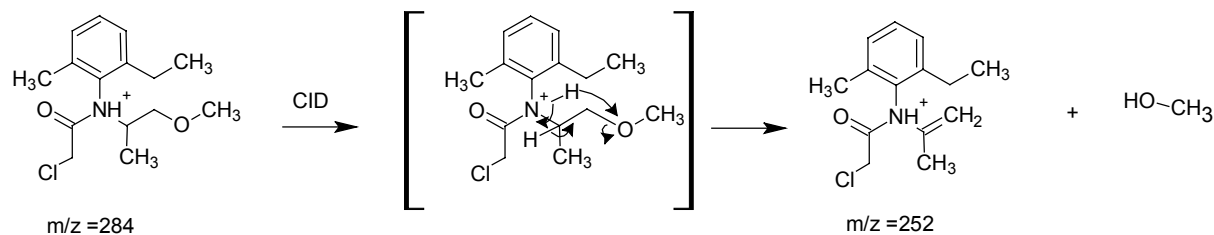
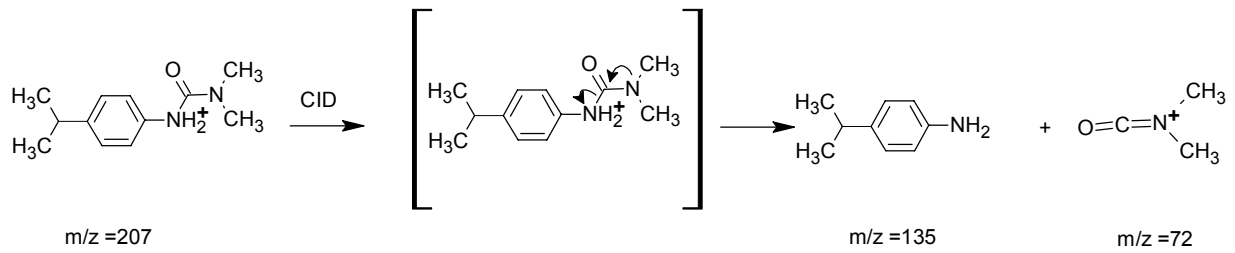
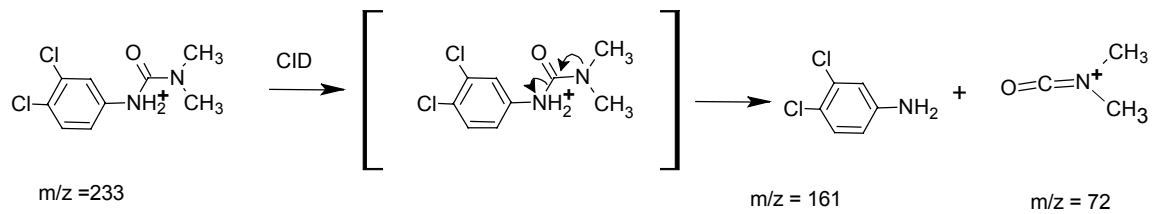
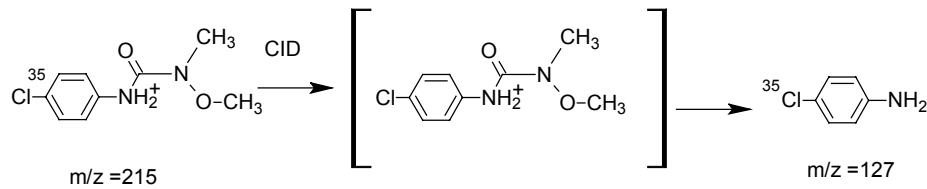
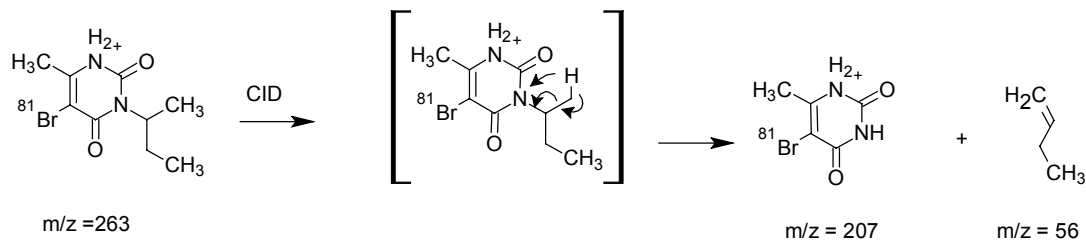
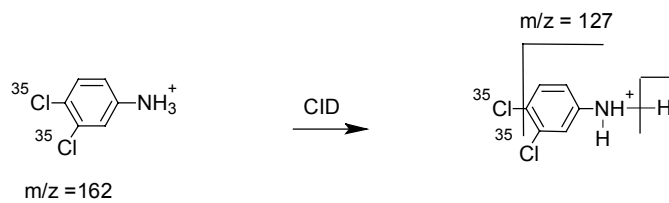
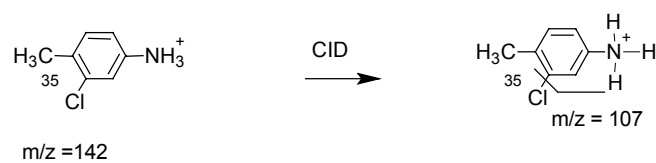


Abb. 4.15: Fragmentierungsvorschlag für Metolachlor

**Abb. 4.16:** Fragmentierungsvorschlag für Isoproturon**Abb. 4.17:** Fragmentierungsvorschlag für Diuron**Abb. 4.18:** Fragmentierungsvorschlag für Monolinuron**Abb. 4.19:** Fragmentierungsvorschlag für Bromacil**Abb. 4.20:** Fragmentierungsvorschlag für 3,4-Dichloranilin**Abb. 4.21:** Fragmentierungsvorschlag für 3-Chlor-4-methylanilin

4.2.3.5 Negativer MRM-Modus

Aus der nachfolgenden Tabelle sind die jeweiligen Massen der Molekül- und Fragmentionen der untersuchten Herbizide zu entnehmen.

Tab. 4.7: Molekülmassen und deren Fragmente im negativen Modus

Analyt	Masse des Molekül-Ions - [H] ⁺	Masse des Fragment-Ions
MCPA	199	141
2,4-D	219	161
2,4-DP	233	161
3,4,5-TCP	195	159
Bromoxynil	276	81
2,4-Dinitrophenol	138	109

Die gemessenen Massen und die nachfolgend vorgeschlagenen Fragmentierungsschemata sind auf der Grundlage anderer Arbeiten entstanden [Chiron *et al.*, 1995; Spliid & Køppen, 1998; Dijkman *et al.*, 2001]. Die Phenoxyessigsäuren zeigen ein charakteristisches Phenolatderivat, bei den methyl- und chlosubstituierten Verbindungen handelt es sich um die Masse 141, bei den dichlosubstituierten Verbindungen um die Masse 161.

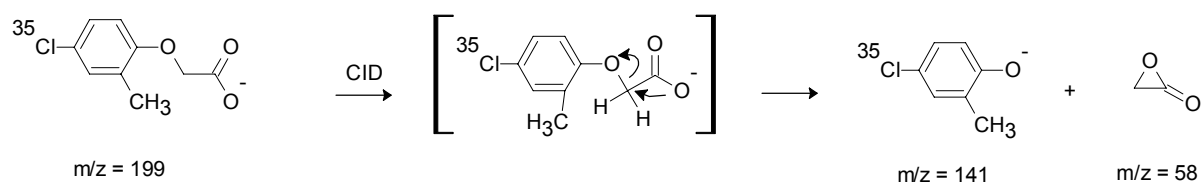


Abb. 4.22: Fragmentierungsvorschlag für MCPA

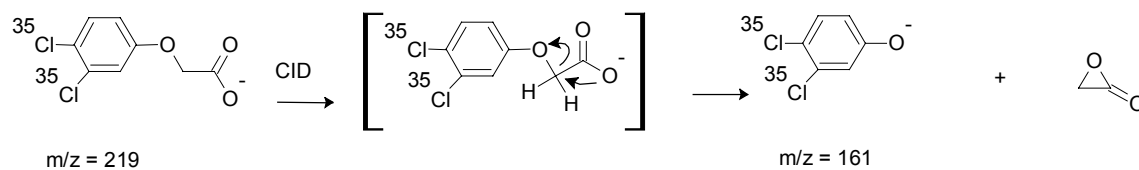
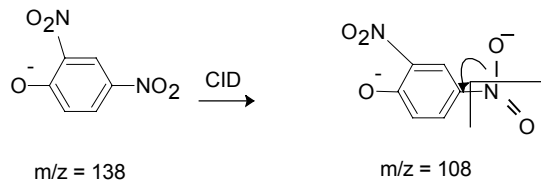
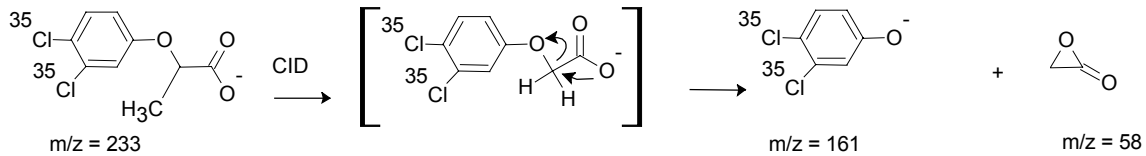
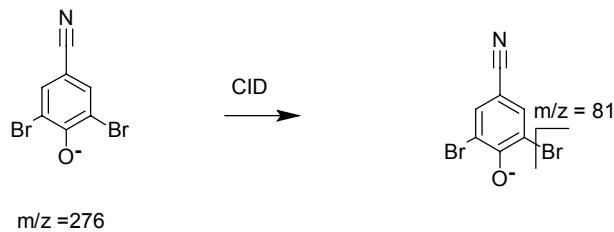
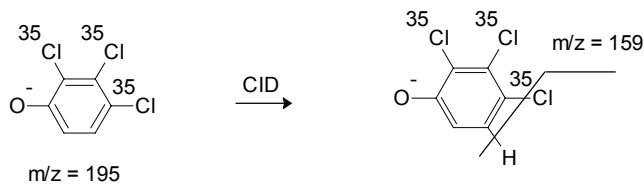


Abb. 4.23: Fragmentierungsvorschlag für 2,4-D

**Abb. 4.24:** Fragmentierungsvorschlag für 2,4-DNP**Abb. 4.25:** Fragmentierungsvorschlag für 2,4-DP**Abb. 4.26:** Fragmentierungsvorschlag für Bromoxynil**Abb. 4.27:** Fragmentierungsvorschlag für 3,4,5-Trichlorphenol

Zur Validierung der Methode werden verschiedene Qualitätssicherungsschritte durchgeführt. Diese werden im Folgenden beschrieben und diskutiert.

4.2.3.6 Nachweisgrenzen

Zur Ermittlung der instrumentellen Nachweisgrenzen werden wässrige Standardlösungen mit Konzentrationen zwischen 0,1 - 5 µg/L je Analyt eingespritzt. Aus der niedrigsten Konzentration, die noch ein dreifaches Signal-Rausch-Verhältnis ergibt, wird die Nachweisgrenze bestimmt. In Tab. 4.8 sind die Nachweisgrenzen ohne Aufarbeitung aufgeführt. Die geringe Nachweisgrenze für MCPA und 2,4-D beruht auf der im Vergleich mit den anderen Verbindungen um zwei Größenordnungen geringeren Ionisierungsausbeute.

Tab. 4.8: Nachweisgrenzen in [$\mu\text{g/L}$] für die LC-MS/MS Methode ohne Aufarbeitung

Positiver MRM			Negativer MRM		
Analyt	NWG	Korrelation ¹	Analyt	NWG	Korrelation ²
Bromacil	0,1	0,9995	MCPA	2	0,994
Desethyl- atrazin	0,1	0,9990	2,4-D	2	0,998
Atrazin	0,1	0,996	2,4-DP	0,25	0,9999
Isopro- turon	0,1	0,997	Bromoxynil	0,1	0,997
Diuron	0,5	0,996	3,4,5-TCP	0,05	0,997
Metaza- chlor	0,5	0,996	2,4-DNP	0,05	0,991
Metola- chlor	0,1	0,998			
3,4- Dichlor - anilin	0,1	0,996			
3-Chlor- 4-methyl- Anilin	0,2	0,996			

Arbeitsbereiche: ¹ 0,05 – 10 $\mu\text{g/L}$, ² 1 – 100 $\mu\text{g/L}$

Die Nachweisgrenzen im positiven Modus entsprechen absoluten Mengen von 8 bis 20 pg. Spliid & Køppen [1998a] berichten von vergleichbaren Nachweisgrenzen, es sind hierzu jedoch absolute Mengen von bis zu 500 pg erforderlich. Erreicht werden diese Nachweisgrenzen durch stärkere Anreicherung und ein größeres Injektionsvolumen [Di Corcia *et al.*, 2000]. In einer Arbeit von Asperger *et al.* [2001] wird eine on-line Methode zum Nachweis von Pestiziden vorgestellt, die bei einem Probevolumen von 10 mL ebenfalls Nachweisgrenzen in dieser Größenordnung erreicht. Die hier erforderlichen Analytmengen liegen bei 4 – 13 pg. Die Nachweisgrenzen für die sauren Herbizide liegen im Vergleich zu den Nachweisgrenzen im positiven Modus zum Teil höher, zum Teil aber auch niedriger.

Die Nachweisgrenzen für die gesamte Methode (Tab. 4.9) werden aus einer aufgearbeiteten dotierten Flusswasserprobe mit je 10 ng/L der Leitsubstanzen als dreifaches Signal-Rausch-Verhältnis berechnet. Blindwerte, die bei einigen Analyten auftreten, werden mit dreifacher Standardabweichung des gemittelten Blindwertes berücksichtigt.

Tab. 4.9: Nachweisgrenzen in [ng/L] für die gesamte Methode einschließlich Aufarbeitung

Positiver MRM		Negativer MRM	
Analyt	NWG	Analyt	NWG
Bromacil	0,5	MCPA	5
Desethyl- atrazin	0,9	2,4-D	10
Atrazin	0,7	2,4-DP	1
Isoproturon	1,0	Bromoxynil	1
Diuron	0,7	3,4,5-TCP	5
Metazachlor	0,9	2,4-DNP	10
Metolachlor	2,9		
3,4-Dichlor- anilin	0,9		
3-Chlor-4- methylanilin	0,4		

Es zeigt sich, dass die Nachweisgrenzen im positiven Modus niedriger sind als im negativen Modus. Für Metolachlor ergibt sich eine höhere Nachweisgrenze, bedingt durch einen hohen Blindwert. Grund hierfür ist möglicherweise eine Anreicherung des lipophilen Analyten in den Schläuchen, die für die Festphasenextraktion eingesetzt werden. Eine Reinigung der Teflonschläuche mit Methanol reicht nicht aus, um auch die lipophileren Verbindungen zu entfernen. Hier ist die zusätzliche Reinigung mit einem weniger polaren Lösungsmittel zu empfehlen. Ein weiterer Grund für die höheren Nachweisgrenzen sind Leerwerte, die im negativen Modus häufiger anzutreffen sind. In einer oxidativen Atmosphäre kommt es häufiger zur Bildung von Verbindungen mit sauren Gruppen wie Carbonyl- bzw. Phenolgruppen, die im negativen Modus leichter ionisiert werden können. Auffällig ist, dass die beiden Phenolderivate deutlich schlechtere Nachweisgrenzen erbringen als zu erwarten ist, da die Aufkonzentrierung nur eine Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor zehn für 3,4,5-Trichlorphenol bzw. fünf für 2,4-DNP ergibt. Dies könnte an der Tatsache liegen, dass die huminstoffreiche Matrix zum großen Teil phenolische Verbindungen enthält, die zu einer stärkeren Ionenunterdrückung führen. Die phenolischen Verbindungen sind in Abwesenheit von Matrix sehr empfindlich detektierbar.

Eine Verbesserung der Nachweisgrenzen wäre durch eine Erhöhung des Injektionsvolumens von 20 auf 50 μL oder durch eine Verlängerung der Verweilzeit (Dwell-Time) für einen Massenübergang (Setzen von Fenstern) möglich. Diese Maßnahmen werden nicht getroffen, da das Probevolumen hierfür nicht ausreicht. Arbeiten von Cappiello *et al.* [1999] konnten zeigen, dass durch die Erhöhung der Verweilzeit ein Gewinn an Sensitivität erreicht werden kann. Bezüglich der Erhöhung des Injektionsvolumens sollte man beachten, dass mit dem niedrigen Fluss der mobilen Phase von 0,2 mL/min eine Verschlechterung des chromatographischen Prozesses einhergehen kann, da üblicherweise das Volumen maximal 10 % des Flusses beträgt. In Abb. 4.28 ist das Chromatogramm einer 0,5 $\text{pg}/\mu\text{L}$ Standardlösung dargestellt.

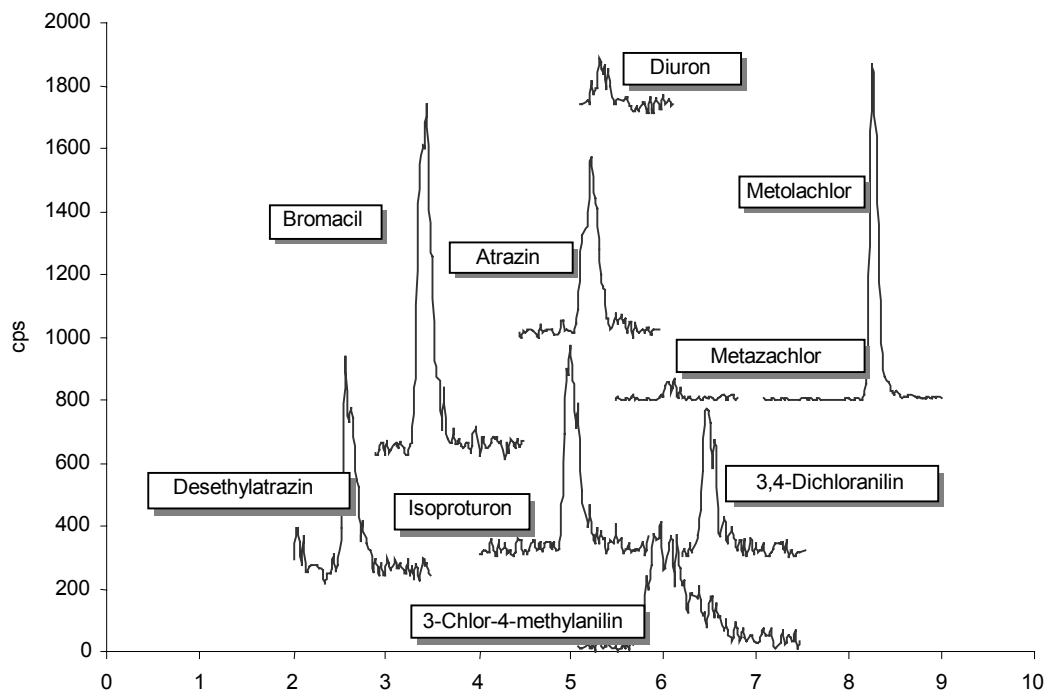


Abb. 4.28: Chromatogramm der Leitsubstanzen in wässriger Lösung (0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$), gemessen im positiven Modus, Massenübergänge s. Tab. 4.6

4.2.3.7 Wiederfindung und Reproduzierbarkeit

Es wurde sowohl die Wiederfindung für die neutrale als auch für die saure Anreicherung bestimmt. Für die neutrale Anreicherung wurde eine Flusswasserprobe mit einer Herbizidstandardlösung (je 1 $\mu\text{g}/\text{L}$) dotiert und dreifach aufgearbeitet. Daraus wurde ebenfalls die Präzision bzw. die Standardabweichung (sd) der Methode berechnet. Die Kalibrierung

erfolgte über eine externe Eichgerade. In Abb. 4.10 werden Wiederfindungsraten und Variationskoeffizienten der Analyten für die neutrale Anreicherung aufgeführt.

Tab. 4.10: Wiederfindungsraten (WR) und Variationskoeffizient (VK); neutrale Anreicherung, gemessen im positiven MRM-Modus, n=3

Analyt	Bromacil	Desethyl- atrazin	Atrazin	Isopro- turon	Diuron	Metaza- chlor	Metola- chlor	3,4- Dichlor- anilin	3-Chlor- 4-methyl- anilin
WR %	94	99	117	109	102	88	98	72	46
VK %	7	7	5	6	9	8	7	8	12

VK=sd / MW * 100, mit sd: Standardabweichung, MW: Mittelwert (n=3)

Das dotierte Flusswasser enthält bereits Desethylatrazin und Atrazin in Konzentrationen von jeweils 0,150 µg/L. Diese wurden bei der Ermittlung der Wiederfindung berücksichtigt. Die ermittelten Wiederfindungsraten lassen den Schluss zu, dass die neutrale Anreicherung des hier verwendeten Flusswassers keine bedeutenden Matrixeffekte verursacht. Hinsichtlich ihrer Präzision ist diese Methode vergleichbar mit anderen LC-MS-Methoden. Aus einer Arbeit von Di Corcia *et al.* [1999] lässt sich entnehmen, dass die Präzision von Trinkwasser über Brunnenwasser bis zu Flusswasser um eine Größenordnung abnimmt. Die Reproduzierbarkeit für Herbizide und deren Metaboliten liegt dabei im Mittel bei 15 %.

Weiterhin wurde die Wiederfindung der sauren Komponenten überprüft. Hierzu wurde eine Standardreihe in bidestilliertem Wasser aufgearbeitet. Aus Tab. 4.11 sind die Bereiche der Wiederfindungsraten, die aus mehreren Eichpunkten berechnet wurden, zu entnehmen. Es zeigt sich, dass die Anreicherung in matrixfreiem Wasser zufriedenstellend erfolgt. In Abb. 4.29 sind die gefundenen Konzentrationen den Konzentrationen der Standardlösungen gegenübergestellt. Im Idealfall würde die Korrelationsgerade der Winkelhalbierenden entsprechen, was einer 100-prozentigen Ausbeute entsprechen würde. Da die Geraden aller Analyten sich unterhalb der Winkelhalbierenden befinden, ist die Wiederfindung geringer als 100 %. Die Aufarbeitung zeigt eine hohe Korrelation zwischen 10 und 500 ng/L.

Tab. 4.11: Wiederfindungsraten und Korrelationskoeffizienten für die saure Anreicherung

Analyt	MCPA	2,4-D	2,4-DP	Bromoxynil	2,4-DNP
WR %	28-125	54-83	84-102	77-92	66-136
R ²	0,9974	0,9883	0,9981	0,9977	0,9887

Anmerkung: wässrige Standardlösungen von 10-500 ng/L

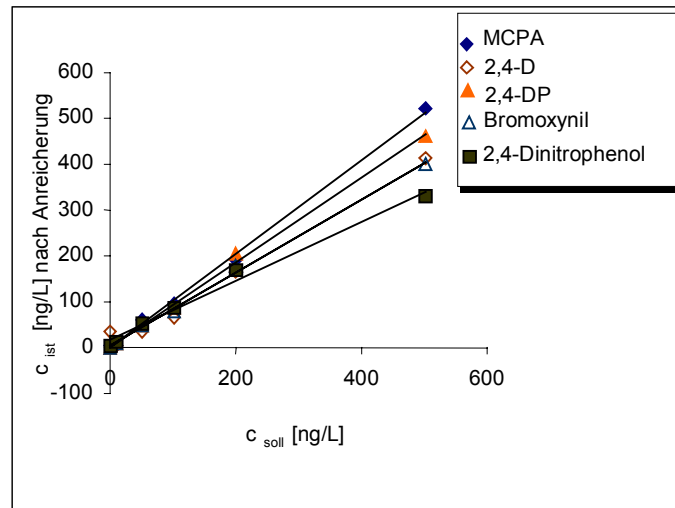


Abb. 4.29: Aufgearbeitete Eichgerade - c_{ist} aufgetragen gegen c_{soll}

Ab einer Konzentration von 1000 ng/L nimmt die Wiederfindung bereits für die meisten getesteten Analyten ab, mit Ausnahme von MCPA und 2,4-DP. Besonders im Fall von 2,4-Dinitrophenol ist mit steigender Konzentration eine Verringerung der Ausbeute zu beobachten, die bis auf 50 % abfällt. Verantwortlich hierfür dürften Verluste bei der Einengung des Methanoleluats sein, da 2,4-Dichlorphenol relativ flüchtig ist. Es wurden keine Mehrfachbestimmungen durchgeführt, jedoch gibt die hohe Linearität der Wiederfindungskurve mit einem durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten von 0,99 einen Hinweis darauf, dass eine ausreichend ausgeprägte Präzision vorliegt.

4.2.3.8 Vergleich extrahierter Proben mit direkt eingespritzten Proben

Einige Proben wurden auch direkt eingespritzt, um festzustellen, ob eine direkte Messung der Proben vergleichbare Ergebnisse mit einer Messung von angereicherten Proben liefert. Ein solcher Vergleich war nur für Atrazin und seine Metaboliten Desethylatrazin möglich, da hier Proben mit Konzentrationen von über 100 ng/L vorlagen. Die Nachweisgrenze ohne Aufarbeitung liegt für beide Verbindungen bei 100 ng/L.

In Abb. 4.30 sind die Atrazin- und Desethylkonzentrationen von sechs Proben der Fischzuchtquelle dargestellt. Beim Vergleich der Messwerte aus angereicherten und nicht angereicherten Proben zeigt sich zum Teil eine gute Übereinstimmung, zum Teil sind aber auch Differenzen zu erkennen, die jedoch nicht systematisch auftreten.

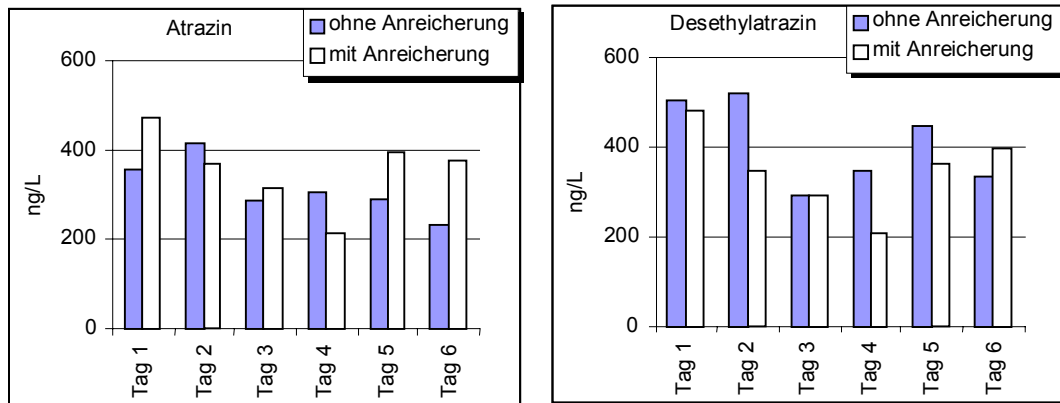


Abb. 4.30: Bestimmung der Konzentration von Atrazin und Desethylatrazin in aufgearbeiteten und nicht aufgearbeiteten Wasserproben der Fischzuchtquelle

4.2.3.9 Variation der Steigung der externen Eichgeraden

Die Messungen werden durch Matrixeffekte wie Salzgehalt und Huminstoffe und durch den Anreicherungsschritt beeinflusst. Es ist nicht abzuschätzen, inwieweit der relativ hohe Salzgehalt dieser Proben, bedingt durch den gelösten Kalk, einen Einfluss auf das Ergebnis hat. So berichten Dijkman *et al.*[2001], dass die Anwesenheit anorganischer Ionen die Ionisierung der Analyten beeinträchtigt.

Parallel zu jeder Messserie wurde eine externe wässrige Eichgerade vermessen, anhand derer die Berechnung der Analytkonzentrationen der aufgearbeiteten Proben erfolgte. Die daraus resultierenden Steigungsfaktoren wurden chronologisch in einer Kontrollkarte aufgenommen, aus der sich abzeichnende Tendenzen und Schwankungen der Steigungsfaktoren leicht zu entnehmen waren. In Abb. 4.31 ist die Kontrollkarte für den Steigungsfaktor von Isoproturon abgebildet, dessen relative Standardabweichung 40 % beträgt.

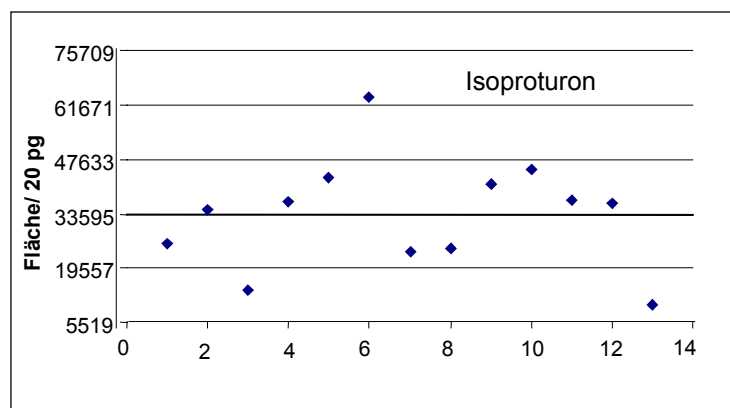


Abb. 4.31: Steigungsfaktoren von Isoproturon aus Kalibriergeraden zwischen 0,1-10 µg/L chronologisch aufgetragen (Anmerkung: fett gedruckte Linie = Mittelwert, Skalierung der y-Achse = einfache Standardabweichung)

Die Anilinderivate wiesen dabei die höchsten Schwankungen mit 60 und 85 % auf. Für die Analyten, die im positiven Modus gemessen wurden, ergaben sich im Laufe eines Jahres Schwankungen zwischen 30 und 40 %. Von Anilinen ist bekannt, dass sie mit Anionen leicht Verbindungen eingehen können, ebenso dass sie an Glaswänden adsorbieren, was sich schon bei Mengen geringer als 100 ng [Di Corcia *et al.*, 1999] bemerkbar macht. Diese Eigenschaften können unterschiedliche Ionenausbeuten verursachen. Der Zustand der Austrittskapillare beim Elektrospray hat ebenfalls einen wesentlichen Einfluss auf die Ausbeute der Ionen. Auch Verunreinigungen am Orifice oder die Stärke des Stickstoffstromes können als Ursache in Betracht gezogen werden. Es zeigt sich, dass neben Matrixeinflüssen auch mit einer nicht unbedeutenden Schwankung einer externen Eichgerade zu rechnen ist, so dass es notwendig ist, eine Eichgerade mit jeder Serie zu vermessen.

4.2.3.10 Matrixeffekte durch natürliche Wasserinhaltsstoffe

Ein sauer angereicherter Flusswasserextrakt wurde mit mehreren Herbizidkonzentrationen aufgestockt, um den Einfluss von Huminsäuren auf die Elektrospray-Ionisation abschätzen zu können. Die Höhe der einzelnen Additionen entsprach den Konzentrationen von parallel gemessenen wässrigen Eichlösungen, die zwischen 1 und 10 µg/L lagen. Ebenso wurde die undotierte Probe als weiterer Kalibrierpunkt vermessen. Durch die Aufstockung eines Festphaseneluats kann der Einfluss der Matrix auf die Ionisierung am besten simuliert werden. Die beiden Kalibriergeraden wurden in einer Serie gemessen.

Tab. 4.12: Verhältnis der Steigungsfaktoren einer wässrigen und einer dotierten Kalibriergeraden

Analyt	Verhältnis der Steigungsfaktoren
	$F_{\text{wässrig}} / F_{\text{Addition}}$
Atrazin	2,0
Bromacil	0,9
Metolachlor	2,9
Metazachlor	1,9
Desethylatrazin	1,4
Isoproturon	2,3
Diuron	1,9
3,4-Dichloranilin	1,4
3-Chlor-4-methylanilin	1,0
Monolinuron	1,6

Als Maß für die Änderung der Empfindlichkeit wurden die Verhältnisse aus den Steigungsfaktoren beider Kalibriergeraden (s. Tab. 4.12) ermittelt, wobei ein Verhältnis > 1 eine Ionensuppression bedeutet und ein Verhältnis < 1 eine Ionenverstärkung anzeigt.

Es sei darauf hingewiesen, dass diese Ergebnisse anhand einer einzigen Probematrix gewonnen wurden und somit nicht generell gelten. Weiterhin ist zu beachten, dass das sauer angereicherte Extrakt einen höheren Anteil an Huminstoffen aufweist als neutrale Extrakte. Somit ist der Einfluss auf die Ionenausbeute der ersteren auch höher.

Das Verhältnis der Steigungsfaktoren liegt zwischen 0,9 für Bromacil und 2,9 für Metolachlor. Daraus lässt sich ableiten, dass Bromacil in Gegenwart von Matrixkomponenten fast nicht, Metolachlor dagegen deutlich stärker beeinflusst wird. Der ermittelte Steigungsfaktor der aufgestockten Kalibriergerade von Metolachlor beträgt fast ein Drittel des Faktors der wässrigen Kalibriergeraden. Man kann für diese Matrix festhalten, dass die Effekte sich unterschiedlich stark auf die Analyten auswirken. Eine Abhängigkeit zwischen Retentionszeit, Basizität und Molekülgröße der Analyten konnte jedoch nicht gezeigt werden. So ist zum Beispiel das Verhältnis der Steigungsfaktoren von Metolachlor, das die höchste Retentionszeit aufweist, und Atrazin mit einer relativ kurzen Retentionszeit in beiden Fällen hoch. Metolachlor wird am stärksten durch die Matrixkomponenten beeinflusst. Das hat zur Folge, dass die Konzentration in der Probe dreimal so hoch ist wie die berechnete. Dagegen wird die Empfindlichkeit von Bromacil und die von 3-Chlor-4-methylanilin nicht durch die Matrix beeinflusst, da die Steigungsfaktoren nahezu gleich bzw. gleich hoch sind.

Dieser Effekt manifestiert sich nicht so stark in Flusswasserextrakten, die neutral angereichert werden, sofern sie DOC-Gehalte im niedrigen mg/L-Bereich aufweisen. Darauf deuten die zufriedenstellenden Wiederfindungsraten der neutral angereicherten und im positiven Modus vermessenen Analyten hin.

Eine vergleichbare Untersuchung wurde für die Analyten, die im negativen Modus gemessen wurden, nicht durchgeführt. Dijkman *et al.* [2001] kommen ebenfalls bei einer Untersuchung von Matrixeffekten durch Huminstoffe zu dem Ergebnis, dass sich diese durch eine saure Anreicherung stärker bemerkbar machen als bei einer neutralen Anreicherung.

Diese Untersuchungen führen zu dem Schluss, dass bei höheren Huminstoffgehalten zur Ermittlung einer präzisen Konzentrationsangabe mit Standardaddition oder markierten Standards gearbeitet werden muss. Die Konzentrationen der Analyten, die neutral angereichert wurden, unterliegen diesem Effekt nicht, da die Huminstoffmatrix nicht in so starkem Maße wie bei der sauren Festphasenextraktion angereichert wird. Der Einfluss der

Matrix macht sich auch in unterschiedlichen Nachweisgrenzen bemerkbar, da in der Regel die Nachweisgrenzen ansteigen, je stärker die Probe belastet ist.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Herbizidbelastung der Fließgewässer

Während eines Jahres wurde die Herbizidkonzentration der Standorte entlang der Aufseß, der Leinleiter, der Wiesent und der beiden Bäche verfolgt. Zusätzlich wurde im Zeitraum von Dezember 2000 bis April 2001 die Karstquelle des oberfränkischen Fischzuchtbeispielbetriebes in monatlichen Abständen im Rahmen einer Diplomarbeit [Nieslony, 2001] auf ihre Herbizidbelastung untersucht. Das Wasser dieses Betriebes, der sich im Ort Aufseß befindet, wird oberhalb der örtlichen Kläranlage in die Aufseß geleitet.

4.3.1.1 Herbizidkonzentrationen entlang der Aufseß

Die Aufseß-Quelle zeigt im Verlauf des Untersuchungszeitraumes eine Abnahme der Atrazin- und Desethylatrazinkonzentrationen (Abb. 4.32). Die Konzentrationen liegen zwischen 40 und 580 ng/L bzw. 46 und 180 ng/L. Im Winter und im Frühjahr wurden die niedrigsten Konzentrationen gemessen. Die hohe Konzentration, die im Juni 2000 gemessen wurde, ist möglicherweise auf eine unerlaubte Anwendung zurückzuführen, da Mai und Juni die Monate sind, in denen früher üblicherweise Atrazin angewendet wurde. Darüber hinaus wurden von den untersuchten Herbiziden Isoproturon und Metazachlor im niedrigen ng/L-Bereich detektiert. Isoproturon und Metazachlor treten in den Monaten November und Januar auf, wobei Isoproturon mit 22 ng/L im Monat November eine relativ hohe Konzentration aufweist.

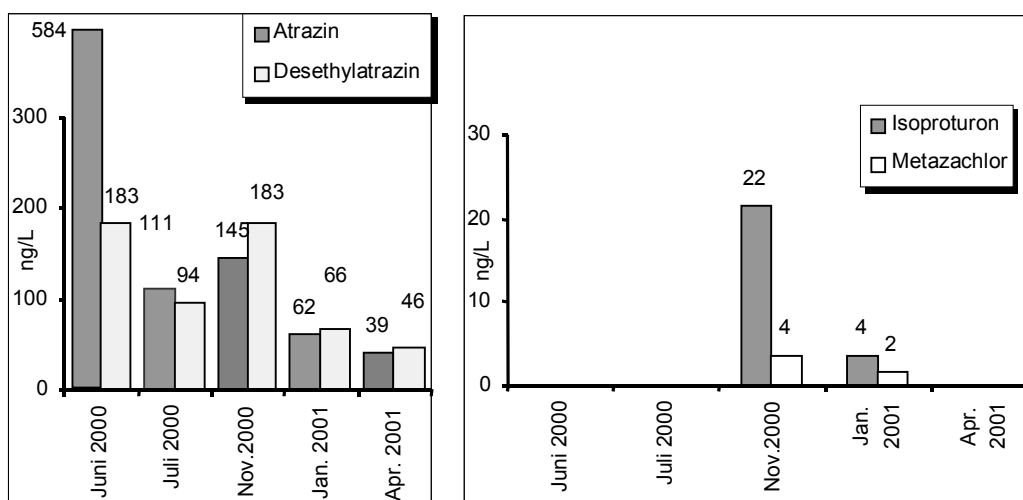


Abb. 4.32: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Aufseß-Quelle

Die Pestizidkonzentration in der Aufseß auf Höhe des Ortes Oberaufseß weist ebenfalls die höchsten Konzentrationen im Juni 2000 auf (Abb. 4.33). Alle hier gemessenen Konzentrationen an Atrazin sind jedoch im Vergleich zu den jeweils am gleichen Tag gemessenen Konzentrationen in der Quelle niedriger. In den Wintermonaten ist auch hier eine geringere Konzentration an Atrazin und seinem Metaboliten zu verzeichnen. An dieser Probenahmestelle tritt Isoproturon häufiger auf, was auf mögliche landwirtschaftliche oder auch durch Siedlungen bedingte Einflüsse zurückzuführen ist. Besonders auffällig ist der hohe Metolachlorgehalt, der im Juni 2000 festgestellt wurde.

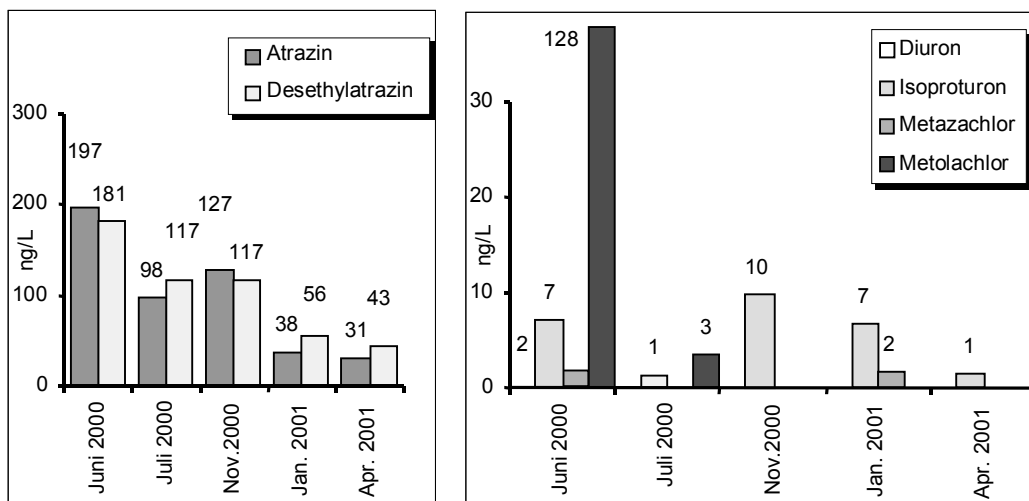


Abb. 4.33: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Aufseß bei Oberaufseß

Die Probenahmestelle, die sich hinter der Aufseßer Kläranlage befindet, wies Konzentrationen an Atrazin und Desethylatrazin in Bereichen auf, wie sie auch für die übrigen Probenahmestellen der Aufseß ermittelt wurden (Abb. 4.34). Tendenziell liegen höhere Konzentrationen im Vergleich zur Probenahmestelle bei Oberaufseß vor. Auch die übrigen Herbizide treten in gleicher Höhe und Häufigkeit auf. Für die untersuchten Zeitpunkte kann die Aussage getroffen werden, dass die Kläranlage für keine bedeutenden Herbizidbeiträge verantwortlich ist.

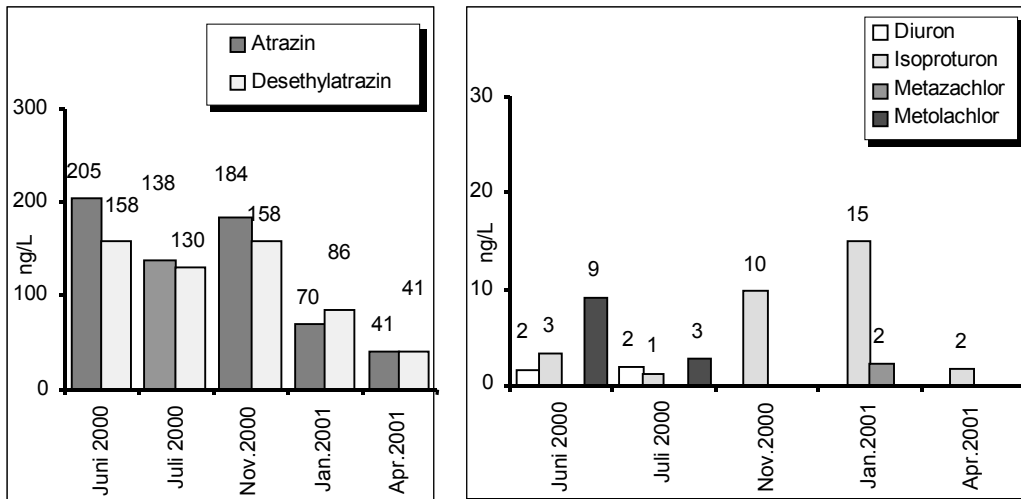


Abb. 4.34: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Aufseß hinter der Kläranlage Aufseß

4.3.1.2 Herbizidkonzentrationen in der Leinleiter

Die Leinleiter-Quelle weist im Juni die höchste Konzentration an Atrazin und Desethylatrazin auf (Abb. 4.35). Während der übrigen Beprobungszeiten liegen die Konzentrationen unterhalb von 100 ng/L, womit sich die Leinleiter-Quelle von der Aufseß-Quelle unterscheidet. Hinsichtlich der übrigen Herbizide werden nur Isoproturon und Metazachlor mit maximalen Konzentrationen im unteren ng/L-Bereich gemessen.

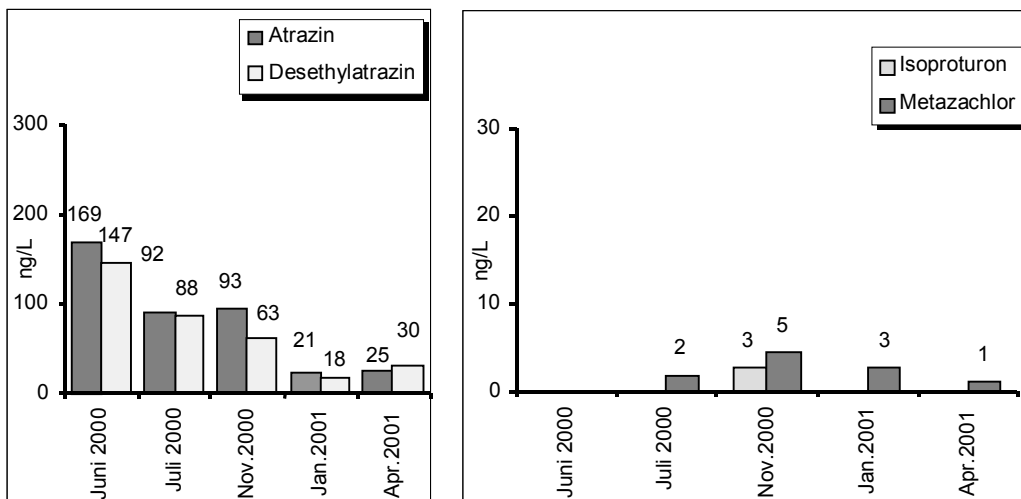


Abb. 4.35: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Leinleiter Quelle

Im Vergleich zur Leinleiter-Quelle sind die Konzentrationen an der Probenahmestelle Gasseldorf, besonders diejenigen von Atrazin, erhöht (Abb. 4.36). Ursache hierfür können weitere Einträge von Grundwasser aus höher belasteten Reservoirs sein. Eine unerlaubte Anwendung dürfte hier nicht in Frage kommen, da das Verhältnis beider Schadstoffe

annähernd dem entspricht, das auch während des Jahres an anderen Probenahmestellen gemessen wurde (s. Kap. 4.3.2). Auch das Spektrum der übrigen detektierten Herbizide hat sich erweitert. Im Juni 2000 werden nur geringe Konzentrationen an Diuron gemessen. Metolachlor ist auch im Juni, wie in der Aufseß-Quelle, deutlich erhöht. Am häufigsten wird Metazachlor gemessen, es handelt sich jedoch hierbei um Werte, die sich im Bereich der Nachweisgrenze befinden.

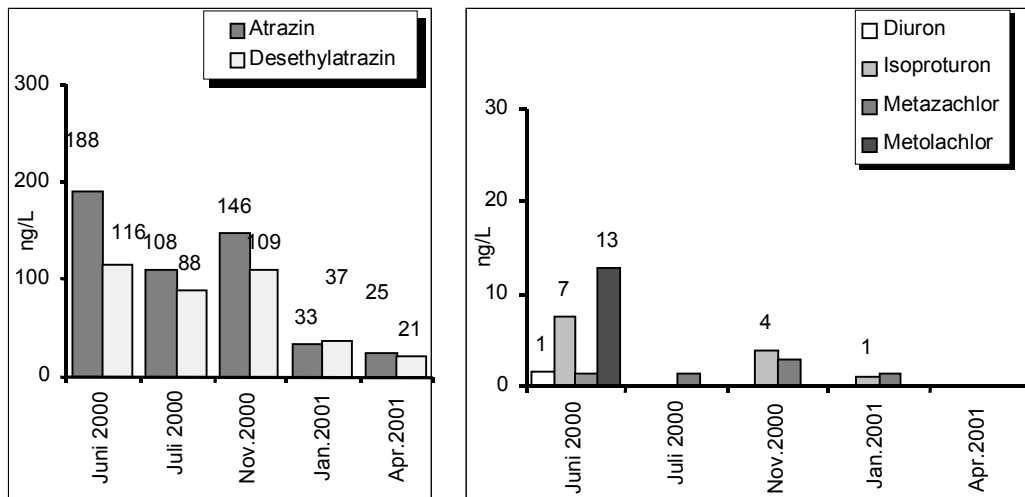


Abb. 4.36: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Leinleiter bei Gasseldorf

Die Probenahmestelle an der Wiesent bei Kirchehrenbach zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die übrigen Probenahmestellen (Abb. 4.37), d.h. sie weist im Januar 2000 und im April 2001 geringere Konzentrationen an Atrazin und Desethylatrazin auf als während der restlichen Probenahmezeitpunkte. Darüber hinaus werden nur noch Harnstoffderivate im Laufe des Jahres nachgewiesen, wobei Isoproturon bis auf eine Probe das ganze Jahr über eine gleichbleibende Hintergrundkonzentration aufweist.

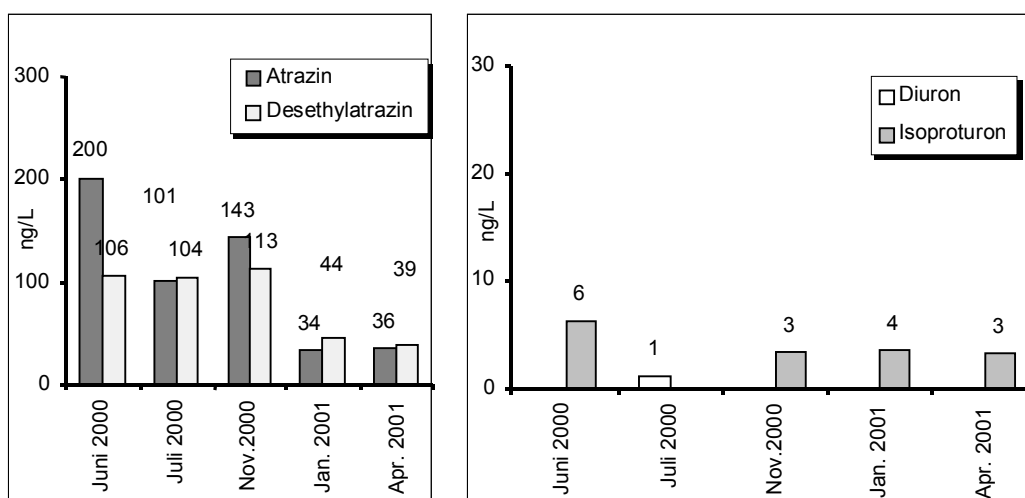


Abb. 4.37: Herbizidkonzentrationen von Juni 2000 bis April 2001 in der Wiesent bei Kirchehrenbach

4.3.1.3 Herbizidkonzentration in der Quelle des Fischzuchtbeispielbetriebes

Die Karstquelle wurde im Rahmen einer Diplomarbeit [Nieslony, 2001] in einmonatigen Abständen beprobt. Es zeigt sich, dass die Konzentrationen von Atrazin und Desethylatrazin bis zu sechs mal so hoch sind wie an den übrigen Probenahmestellen in der Fränkischen Schweiz. Obwohl alle Proben außerhalb der Applikationszeit für Herbizide genommen wurden, sind auffallend hohe Konzentrationen an Atrazin und dessen Metabolit zu verzeichnen. Auch Metazachlor tritt im Gegensatz zu den anderen Fließgewässern regelmäßig auf.

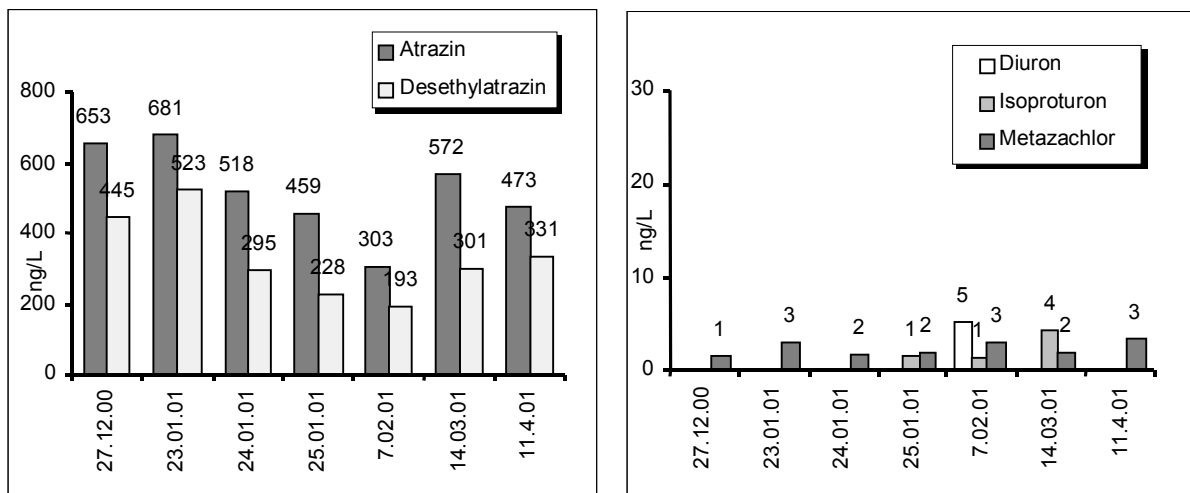


Abb. 4.38: Herbizidkonzentrationen von Dezember 2000 bis April 2001 in der Quelle der Fischzuchtanlage von Aufseß

4.3.1.4 Herbizidkonzentrationen im Mähringsbach und im Zinnbach

Im Mähringsbach und im Zinnbach wurden im Gegensatz zu den Fließgewässern der Fränkischen Schweiz nur Atrazin und Desethylatrazin nachgewiesen. Die Analyten treten in beiden Bächen während des gesamten Untersuchungszeitraumes deutlich unterhalb der Konzentrationen der Fließgewässer der Fränkischen Schweiz auf, wobei sie etwa einem Zehntel der Konzentrationen entsprechen. Darüber hinaus wurden keine weiteren Herbizide detektiert. Dies weist auf einen geringeren Einfluss durch landwirtschaftliche Aktivitäten hin.

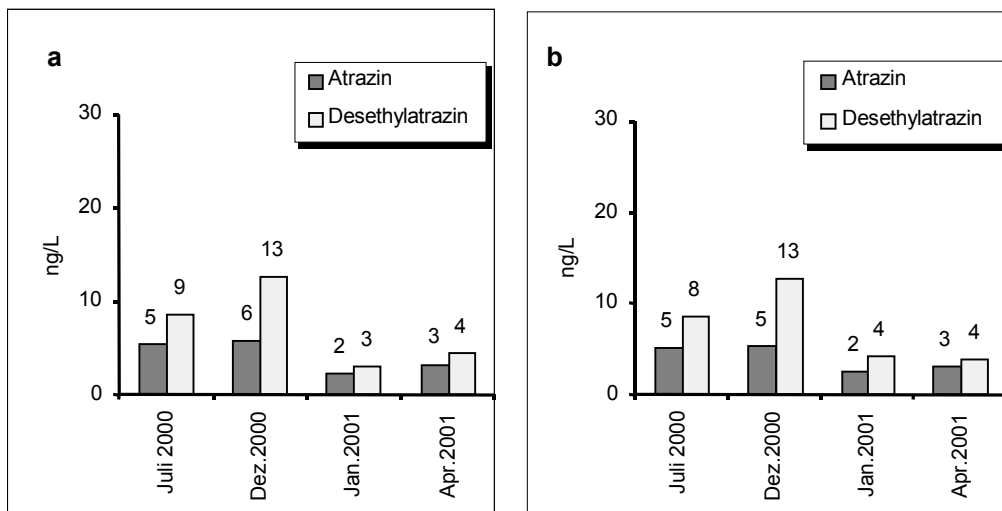


Abb. 4.39: Herbizidkonzentrationen von Juli 2000 bis April 2001 an den Probenahmestellen des Mähringbachs: **a** Probenahmestelle I, **b** Probenahmestelle II

Die beiden beprobten Stellen im Mähringbach, die etwa 500 m auseinander liegen, zeigen keine auffälligen Konzentrationsunterschiede der beiden Analyten. Der Bach fließt an dieser Stelle an einer Reihe von Fischteichen vorbei. Weitere menschliche Aktivitäten sind dort nicht vorhanden.

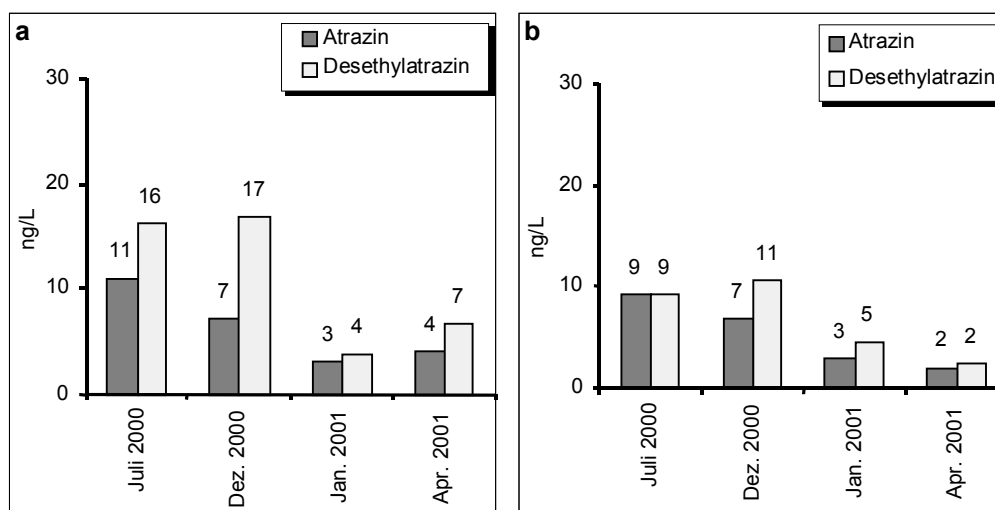


Abb. 4.40: Herbizidkonzentrationen von Juli 2000 bis April 2001 an den Probenahmestellen des Zinnbachs, **a**: Timpermühle, **b**: Huschermühle

Dagegen zeigt der Zinnbach leicht erhöhte Desethylkonzentrationen an der Probenahmestelle Timpermühle (Abb. 4.40). Da das Verhältnis von Atrazin zu Desethylatrazin kleiner als eins ist, dürften diese Mengen aus früheren gebundenen Anwendungen stammen. Möglicherweise ist der Boden im Einzugsbereich der Timpermühle stärker belastet als der der Huschermühle.

4.3.2 Verhältnis Atrazin und Desethylatrazin

Das Verhältnis von Atrazin zu Desethylatrazin lässt eine grobe Abschätzung zu, ob der Zeitpunkt der Applikation des Herbizids bereits länger zurückliegt oder erst vor kurzem stattfand. Mit der Zeit ändert sich dieses zugunsten von Desethylatrazin. In Abb. 4.41 sind die Verhältnisse von Atrazin zu Desethylatrazin für alle Probenahmestellen zwischen Juni 2000 und April 2001 dargestellt. Es zeigt sich, dass der Mähringbach und der Zinnbach im wesentlichen Verhältnisse < 1 aufweisen. Eine Ausnahme stellt die Probenahmestelle des Zinnbachs an der Huschermühle dar, die im Juli 2000 und im April 2001 etwa gleich viel Atrazin und Desethylatrazin enthält. Anders ist die Situation in den Fließgewässern der Fränkischen Schweiz. Hier weisen die meisten Probenahmestellen von Juni bis November 2000 Konzentrationsverhältnisse > 1 auf. Im Januar und April 2001 liegen die Verhältnisse niedriger. Auffällig erhöht ist das Verhältnis für einige Probenahmestellen im Juni. Da der Juni einer der Hauptanwendungsmonate für Atrazin ist, könnte dies ein Hinweis auf den unerlaubten Einsatz von Atrazin sein.

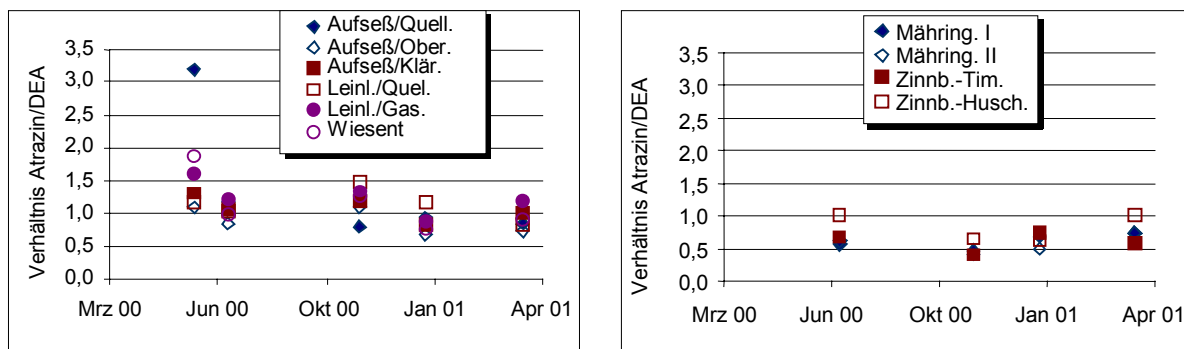


Abb. 4.41: Verhältnis von Atrazin und Desethylatrazin in den untersuchten Fließgewässern von Juni 2000 - April 2001 (Fränkische Schweiz) bzw. Juli 2000 - April 2001 (Nordostoberfranken)

In einer sich über mehrere Jahre erstreckenden Untersuchung von Brunnen in einem Karstgebiet nahe Gunzenhausen (Mittelfranken) zeigte sich, dass das Konzentrationsverhältnis von Atrazin zu Desethylatrazin im Juni die höchsten Werte annahm. Zwei dieser Brunnen wiesen mit Konzentrationen an Atrazin zwischen 0,4 und 2,5 $\mu\text{g/L}$ vergleichsweise hohe Belastungsniveaus auf. Dabei lag das Verhältnis im Bereich von eins. Dagegen zeigten die Ganglinien der weniger belasteten Quelle durchgehend höhere Desethylatrazinkonzentrationen. Hier konnte während der mehrjährigen Messzeit keine Abnahme der Konzentration beobachtet werden, wie das in den anderen beiden Quellen der Fall war [Anonymous1994]. Gleichbleibende Konzentrationen wie auch das Verhältnis von Atrazin und Desethylatrazin sind Zeichen einer Hintergrundbelastung des Quellwassers und damit des Grundwassers.

Die Konzentrationsverhältnisse von Atrazin und seinem Metaboliten sind für den gesamten Messzeitraum für die jeweiligen Probenahmestellen statistisch ausgewertet und in Abb. 4.42 dargestellt. Die meisten Messstellen der Fränkischen Schweiz weisen Mediane über eins, die der Bäche Nordostoberfrankens dagegen alle unter eins auf. Der große Vertrauensbereich für die Aufseß-Quelle wird durch einen einmalig hohen Atrazingehalt im Juni 2000 verursacht.

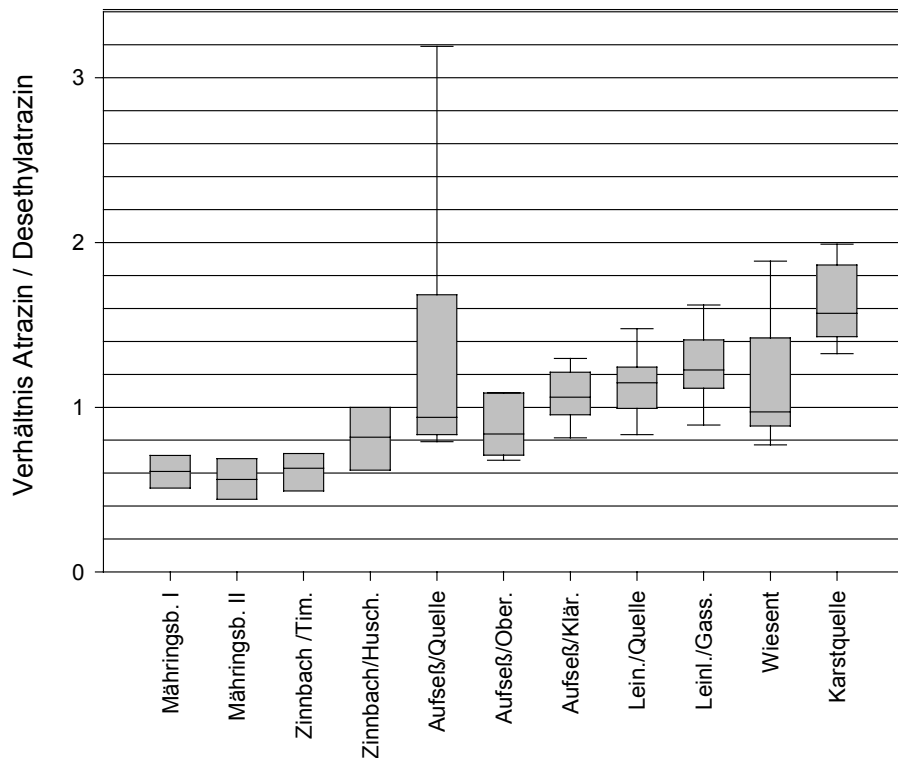


Abb. 4.42: Mediane (n=4) und Vertrauensintervalle ($p < 0.5$) sowie Maxima und Minima für das Konzentrationsverhältnis von Atrazin und Desethylatrazin aller untersuchten Proben

Auch eine österreichische Studie von 1990 [Umweltbundesamt, 2000] berichtet von Gebieten, die höhere Konzentrationen an Atrazin als an Desethylatrazin in natürlichen Gewässern aufweisen. Im Mittel ist das Verhältnis von Atrazin und Desethylatrazin kleiner als eins. In dem Zeitraum, in dem Messungen durchgeführt wurden, fiel das Anwendungsverbot von Atrazin. Eine deutliche Tendenz ist zwar nicht zu verzeichnen, jedoch scheint es, dass das Verhältnis eher zugunsten von Desethylatrazin liegt.

Die unterschiedlichen Verhältnisse können auf verschiedene Parameter zurückzuführen sein. Im Fall der Fränkischen Schweiz ist bekannt, dass sie durch das unterirdische Höhlensystem als großer Wasserspeicher dient. Je nach Mächtigkeit solcher Wasserspeicher ist auch ein schnellerer oder langsamerer Austausch des atrazinhaltigen Grundwassers möglich. Zudem ist es wahrscheinlich, dass der Abbau von Atrazin in diesen Speichern nur sehr langsam abläuft. Vink & Van der Zee [1997] haben festgestellt, dass der Abbau von Herbiziden in großen

Wasserspeichern deutlich langsamer abläuft als in kleinen hydrologischen Systemen wie Wassergräben und Kanälen. Dabei spielen die Konzentrationen an Phosphor und Stickstoff beim Abbauverhalten der Pestizide eine wichtige Rolle. Die Konzentrationsverhältnisse in den Bächen spiegeln andererseits ein Bild wider, das auf eine bereits vor längerer Zeit stattgefundenene Applikation hinweist, was sich durch die tendenziell höhere Desethylatrazinkonzentration gegenüber der Atrazinkonzentration bemerkbar macht.

Charzopoulos & Papadopoulou-Moukidou [1999] untersuchten ein Jahr lang Regenwasser in abgelegenen und landwirtschaftlich genutzten Gegenden. Dabei ermittelten sie einen Median für das Verhältnis von Atrazin zu Desethylatrazin (DEA) von 2,5. Hinzuzufügen ist, dass DEA nur in der Zeit von April bis Juni gefunden wurde. Diese Gehalte waren auf die jüngsten Anwendungen von Atrazin in der Landwirtschaft zurückzuführen, was zeigt, dass Desethylatrazin relativ schnell, in diesem Fall wahrscheinlich auf photochemischen Weg, entstand. Es handelt sich hier offensichtlich um das Hauptabbauprodukt, da die Untersuchung anderer Abbauprodukte keine nennenswerten Konzentrationen ergab. Es ist nicht auszuschließen, dass durch atmosphärischen Transport aus Ländern, in denen Atrazin noch angebaut werden darf, vor allem im Frühjahr mit Einträgen zu rechnen ist. So fanden Bester *et al.* [1995] im Frühjahr 1993 im Niederschlag von Helgoland bis zu 150 ng/L Atrazin. Sie berechneten tägliche Depositionsraten von wenigen ng/m² bis zu 200 ng/m².

4.4 Diskussion

Die Untersuchungen ergaben, dass in allen Wasserproben während des gesamten Jahres Atrazin und Desethylatrazin vorkommen. Von den übrigen untersuchten Herbiziden traten nur Isoproturon, Diuron, Metolachlor und Metazachlor in einigen Fällen im niedrigen ng/L-Bereich auf. Im Mähringsbach und im Zinnbach wurden diese Verbindungen jedoch nicht nachgewiesen. Im Juni wurde eine einmalig hohe Konzentration an Metolachlor mit 128 ng/L festgestellt. Da dieses Herbizid auch im Maisanbau als Vorlaufmittel eingesetzt wird, ist die gefundene Menge im Juni plausibel. Die genannten Herbizide wurden in abnehmender Häufigkeit detektiert: Isoproturon (44 %) > Metazachlor (37 %) > Diuron (12 %) > Metolachlor (10 %). Die beiden untersuchten Regionen unterscheiden sich deutlich in ihren Herbizidkonzentrationen. In den Fließgewässern Nordostoberfrankens betragen die Konzentrationen an Atrazin und Desethylatrazin wenige ng/L, während in den Fließgewässern der Fränkischen Schweiz die Konzentrationen mit etwa 100 ng/L deutlich höher liegen. Auch hinsichtlich des Atrazin-Desethylatrazin-Verhältnisses ergibt sich ein unterschiedliches Bild. In den Fließgewässern der Fränkischen Schweiz ist das Verhältnis überwiegend >1, wogegen

dieses im Zinnbach und Mähringsbach in der Mehrzahl der untersuchten Proben kleiner als eins ist. Dabei zeigt sich, dass die landwirtschaftliche Aktivität in der Fränkischen Schweiz einen stärkeren Einfluss auf die Wasserbelastung der dortigen Fließgewässer hat bzw. gehabt hat als in Nordostoberfranken. Eine wesentliche Rolle spielen dabei auch die geologischen Verhältnisse, die wie im Falle der Fränkischen Schweiz (s. Kap. 3) nur eine sehr geringe Abbauleistung für Nährstoffe und Schadstoffe im Wasser erbringen. Infolgedessen ist die Kontaktzeit mit dem Boden deutlich geringer, so dass nur ein Teil des Atrazins zu Desethylatrazin mikrobiell umgewandelt wird. Hier dürfte auch die Erklärung dafür liegen, dass die Konzentration an Atrazin höher ist als diejenige von Desethylatrazin. Im Grundwasser findet anschließend, aufgrund fehlender biologischer Aktivität und geringer Temperaturen wie verschiedene Autoren zeigen konnten [Mersie *et al.*, 1998], kaum ein weiterer Abbau statt. Bekannt ist darüber hinaus, dass Atrazin in kalkigen Gewässern schlechter abgebaut wird [Kristensen *et al.*, 2001]. Auch hat man festgestellt, dass in Gegenwart von Nitrat der Abbau von Herbiziden, unter anderem Atrazin, langsamer stattfindet [Larsen *et al.*, 2000]. Hier könnte sich der Einfluss der erhöhten Nitratkonzentrationen im Wasser der Fränkischen Schweiz bemerkbar machen. Das Grundwasser wird je nach Mächtigkeit des Wasservorrats nur langsam ausgetauscht, so dass die Belastung weiterhin anhalten kann.

Während des Monitorings der Fließgewässer beider Regionen zeigt sich zwar während der kälteren Jahreszeit eine Abnahme der Konzentrationen bis zu einem Faktor zwei, woraus jedoch kein allgemeiner Trend abzuleiten ist, da das vorliegende Datenmaterial hierfür zu gering ist. Zudem zeigen Messungen vom Wasserwirtschaftsamt Oberfranken über mehrere Jahre hinweg, dass die Konzentrationen im Aufseßwasser in diesem Bereich durchaus schwanken. Aus dem österreichischen Jahresbericht 2000 [Umweltbundesamt, 2000] lässt sich entnehmen, dass Jahresmittelwerte der Atrazin- und Desethylatrazinkonzentrationen von Messstellen (Zeitraum 1992 bis 1999) ab Konzentrationen $< 0,1 \mu\text{g/L}$ nur sehr langsam abnehmen, obwohl auch hier das Herbizid seit 1995 verboten ist.

Die Belastung der Fließgewässer in Nordostoberfranken kann auch von der Nähe zur ehemaligen innerdeutschen Grenze herrühren. Mit Hilfe von Herbiziden, u.a. von Atrazin, das auch noch nach dem Verbot in der Bundesrepublik angewendet wurde, wurde der Grenzstreifen jahrelang von Unkraut freigehalten. Darüber hinaus ist nicht geklärt, ob in der tschechischen Landwirtschaft weiterhin das Herbizid Atrazin eingesetzt wird. Wäre dies der Fall, so kann es durch oberflächlichen Runoff, durch Grundwasserleiter oder durch atmosphärischen Transport in die Oberflächengewässer gelangen. Ob das Grundwasser

belastet ist, ließe sich anhand der Belastung der Quelle erkennen, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

Ein unerlaubter Einsatz kann bei ungünstigen Wetterverhältnissen wie starker Regen kurz nach der Ausbringung oder Reinigung der eingesetzten Spritzmittelgeräte über die Kanalisation zu kurzfristigen Spitzenwerten führen. Auf solch einen Einsatz deutet die gemessene Konzentration von etwa 600 ng/L in der Aufseßquelle hin. Diese Vermutung wird dadurch verstärkt, dass zum einen während des ganzen Jahres deutlich niedrigere Konzentrationsverhältnisse an dieser Quelle gemessen wurden und zum anderen, dass der Monat Juni einer der bevorzugten Anwendungsmonate dieses Herbizids ist. Eine weitere Eintragsmöglichkeit besteht über die Luft. Hier betragen jedoch die gemessenen Konzentrationen im Regen nur wenige ng/L, die zur Hauptanwendungszeit in einigen Gegenden auf 1 µg/L ansteigen. Auch wenn bekannt ist, dass atmosphärischer Transport von Atrazin über einige hundert Kilometer möglich ist [Dubus *et al.*, 2000], ist davon auszugehen, dass die zu erwartenden Einträge von Atrazin nicht relevant sind. So betrug der mittlere tägliche atmosphärische Eintrag von Atrazin im Bayerischen Wald vor dem Anwendungsverbot [van Dijk & Guicherit, 1999] etwa 34 ng·m⁻². Nach dem Anwendungsverbot wurden zur Hauptapplikationszeit an der Nordsee und dem deutschen Küstengebiet Depositionsraten zwischen 45 und 135 ng·m⁻²·d⁻¹ berechnet [Bester *et al.*, 1995]. Bezogen auf ein ganzes Jahr ist davon auszugehen, dass die tägliche Depositionsraten deutlich niedriger ausfällt, da die Atrazinkonzentrationen in der Atmosphäre außerhalb der Anwendungsphase in der Regel sehr viel niedriger sind [Chevreuil *et al.*, 1996]. Dies zeigen Pestizidgehalte im Regen, die je nach Region außerhalb der Applikationszeit bis zu einer oder mehreren Größenordnungen niedriger sind [Chevreuil *et al.*, 1996]. Da Atrazin trotz Verbotes das am zweithäufigsten nachgewiesene Herbizid im Niederschlag in Europa [Dubus *et al.*, 2000] ist, ist ein kontinuierlicher Eintrag nicht ausgeschlossen.

Es ist möglich, dass Atrazin an oberflächlichen Bodenschichten adsorbiert. Auslaugungsprozesse und der Einfluss von belastetem Regen sehen Spliid & Køppen [1998b] als Ursache für das Vorkommen von Atrazin und dessen Abbauprodukten im Grundwasser. Die Gegend im Nordosten Oberfrankens hat durch die exponierte Lage des Fichtelgebirges aus früheren Zeiten erhöhte Atrazinfrachten aufgenommen, wie die von Herterich [1991] bestimmten jährlichen Depositionsraten von 130 µg·m⁻²·a⁻¹ zeigen. Zu einer weiteren Klärung des Atrazineintrags in die Bäche würden Untersuchungen von Sedimenten und Böden beitragen.

5 Ökotoxikologische Bewertung

Die Vielzahl anthropogener Stoffe, die in die Umwelt gelangen, würden sich nur unter großem analytischen Aufwand untersuchen lassen. Eine weitere Möglichkeit, Schadstoffe in Umweltproben zu erfassen, sind biologische Wirkungstests. Diese eignen sich dazu, das Wirkungspotential der gesamten Probe zu erfassen und so die Auswirkungen auf die belebte Umwelt abzuschätzen.

Durch den Einsatz von Organismen verschiedener Trophieebenen wie z.B. Destruenten und Produzenten können Effekte auf unterschiedliche physiologische Prozesse wie Atmung oder Photosynthese erfasst werden. Eine Biotest-Batterie mit mehreren Organismen lässt eine gesichrtere Aussage über das gesamte Wirkungsspektrum der Probe zu. Mittels einer solchen Biotest-Batterie bestehend aus Algen, Daphnien und Leuchtbakterien konnte Brack [1996] zeigen, dass ein bedeutender Anteil der Toxizität des untersuchten Sickerwassers auf das Vorhandensein von Schwefelwasserstoff zurückzuführen ist. Durch die Wahl der Organismen können verschiedene Wirkungen erfasst werden; dazu gehören gentoxische, cytotoxische und endokrine Wirkungen.

Ein mittlerweile verbreitetes Verfahren zur Identifizierung unbekannter Stoffe ist die wirkungsbezogene Analytik, auch "bioassy-directed-chemical-analysis" genannt. Mittels einer geeigneten Fraktionierungstechnik wird die Probe in Stoffgruppen unterschiedlicher Eigenschaften wie beispielsweise Säuren, Basen oder Neutralstoffe aufgeteilt. So kann eine stoffliche Eingrenzung der Verbindungen, die die Effekte auslösen, erfolgen. Umgesetzt ist dieses Prinzip in den EPA-Vorschriften, den sogenannten Toxicity-Identification-Evaluation-Methoden (TIE) für Abwasser, Sickerwasser und Boden. Hierbei werden Proben mittels verschiedener Techniken wie Verdampfung, Festphasenextraktion und chromatographische Trennmethode fraktioniert. Eine anschließende Kombination biologischer Tests und chemischer Analytik ermöglicht eine Identifizierung der toxischen Substanzen.

Für stark belastete Umweltproben ist diese Methode bereits mehrfach angewendet worden. Beispielsweise wurde dieses Prinzip zur Erfassung gentoxischer Verbindungen in Abgasen [Schuetzle & Lewtas, 1986] und in der Luft [Erdinger *et al.*, 1997] eingesetzt. Auch in kontaminierten Sedimenten konnten dadurch ökotoxikologisch relevante Verbindungen wie N-Alkane (C₁₃-C₁₈), Pestizide wie Parathion und organische Zinnverbindungen nachgewiesen werden [Brack *et al.*, 1999]. Benzotriazole und Tolyltriazole, die Bestandteile von Enteisungsmitteln für Flugzeuge sind, konnten als Hauptkomponenten für die gemessene Toxizität [Cancilla *et al.*, 1997] im MicrotoxTM-Test verantwortlich gemacht werden. Galassi

& Benfenati [2000] wiesen als wesentliche toxische Komponenten Bis(2-ethylhexyl)-Phthalat und 4-Nonylphenol in Sickerwasser nach.

Dagegen ist bei der Untersuchung von weniger belasteten Proben eine Anreicherung unumgänglich. So haben Hendriks *et al.* [1994] Rheinwasserproben aufkonzentriert, fraktioniert und einen Teil der gemessenen Effekte im Daphnientest (Cytotoxizität) und Amestest (Mutagenität) auf eine Reihe identifizierter Verbindungen zurückführen können, darunter verschiedene stickstoffhaltige Verbindungen, die den größten Beitrag zu der beobachteten Toxizität geleistet haben. Weiterhin stellte sich bei einer Untersuchung von Grundwasser, welches durch Sickerwasser belastet war [Baun *et al.*, 1999], heraus, dass hohe Salzkonzentrationen die eigentliche Ursache der beobachteten Toxizität war.

Dem Monitoring von aquatischen Proben mit biologischen Tests kommt eine besondere Bedeutung dort zu, wo Fließgewässer durch Industrie und Siedlungen intensiv als Vorfluter genutzt werden oder durch intensive Landwirtschaft gefährdet sind. In diesen Fällen ist mit vielfältigen Stoffeinträgen zu rechnen. Im Rahmen eines Forschungsprojekts des Umweltbundesamtes wurden on-line Verfahren als Frühwarnsysteme zur Überwachung des Rheins entwickelt, die rechtzeitig das Auftreten von Schadstoffen anzeigen [Irmer, 1995]. Es stellte sich heraus, dass der Leuchtbakterientest und der Algenfluoreszenztest innerhalb ihrer Trophieebene zu den sensitivsten Testverfahren gehörten [Irmer, 1995]. Selbst der Einsatz von isolierten Organellen, der Protoplastentest mit *Vicia faba*, zeigte eine geringere Empfindlichkeit. Weitere kontinuierliche biologische Messverfahren beruhen auf der in-vivo-Chlorophyll-Fluoreszenz [Noack & Walter, 1992] und der Sauerstoffentwicklung [Mingazzini *et al.*, 1997; Campanella *et al.*, 2000] von Algen. Einige Verfahren messen den Sauerstoffverbrauch von Nitrifikanten im Abwasser, der durch nitrifikationshemmende Stoffe beeinflusst wird [König *et al.*, 1998]. Schwedt *et al.* [1997] entwickelten ein on-line Verfahren zur Messung der Biolumineszenz von Bakterien für die Überwachung von Abwasser. Darüber hinaus gibt es Anwendungen, die Änderungen der Beweglichkeit von Flagellaten [Tahedl, 1999], Daphnien und Fischen [Blübaum-Gronau *et al.*, 1992] bei Einwirkung von Fremdstoffen feststellen können.

Hinsichtlich ihrer Toxizität sind bereits zahlreiche Verbindungen aufgrund des Pflanzenschutzmittel- und des Chemikaliengesetzes auf ihr Gefährdungspotential, insbesondere für das aquatische Kompartiment, überprüft worden. Da es sich dabei in der Regel um Einzelstoffuntersuchungen handelt, lassen diese keine endgültige Aussage über das Verhalten der Stoffe in der Umwelt und über mögliche Kombinationseffekte zu. Zwar hat man festgestellt, dass Kombinationseffekte meistens additiv sind; jedoch sind auch

synergistische und antagonistische Effekte zwischen Verbindungen bekannt. So fanden Mandal *et al.* [2002] heraus, dass Huminstoffe die Toxizität von Metallen maskieren und dadurch deren Bioverfügbarkeit beeinflussen können. Untersuchungen haben auch gezeigt, dass es in Mischungen von schwachen Säuren, darunter Phenolen, zu Dimerbildung kommt, die aufgrund besserer Membrangängigkeit als die einzelnen Verbindungen [Escher *et al.*, 1999] zu synergistischen Effekten führen. Treten mehrere Stoffe in Konzentrationen unterhalb ihrer Toxizitätsschwelle auf, kann es durch Konzentrationsadditivität zu einer Überschreitung dieser Schwelle kommen [Faust *et al.*, 2001].

Neben den Biotests mit Organismen werden inzwischen häufig auch Tests mit Fischgewebezellen durchgeführt, die den Vorteil haben, dass sie einfach zu kultivieren sind und einen höheren Probendurchsatz ermöglichen als die entsprechenden Fischtests. Eine weitere Gruppe von Tests, die an dieser Stelle zu erwähnen ist, sind enzymatische Tests, die sich durch eine hohe Spezifität und Empfindlichkeit auszeichnen [Nistor & Emnéus, 1999]. Viele davon werden u.a. zur Detektion von Phenolen [Munteanu *et al.*, 1998] oder von Organophosphaten und Carbamaten [Bilitewski *et al.*, 1992] eingesetzt. Beispielsweise reagiert das Enzym Acetylcholinesterase sehr spezifisch auf Organophosphorsäureester, -thioester und N-Methylcarbamate. Durch die Miniaturisierung dieser Tests für Mikrotiterplatten kann ebenfalls ein hoher Probendurchsatz erzielt werden. Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der enzymatischen Schadstofferkennung sind z.B. die multienzymatischen Sensoren, die, wie in der Arbeit von Starodub *et al.* [1999] beschrieben, Schwermetalle und phosphororganische Pestizide parallel detektieren können. Aufgrund der hohen Spezifität dieser Testverfahren sind sie jedoch für Screeningzwecke nicht geeignet. Zudem liefern sie nur eine eingeschränkte Aussage über die Toxizität der Probe bzw. des Stoffes, da sie die physiologische Komplexität eines Organismus nicht darstellen können.

5.1 Biologische Verfahren: Hintergrund und Methodenentwicklung

Da die in dieser Arbeit untersuchten Gewässer nicht akut belastet waren und mit einer diffusen Hintergrundbelastung zu rechnen war, mussten die eingesetzten Biotests eine hohe Sensitivität gegenüber einem breiten Spektrum von Umweltkontaminanten aufweisen. Es sollten Konzentrationen im subletalen und subchronischen Bereich erfasst werden, wodurch eine Aufkonzentrierung der Proben erforderlich war, um eine entsprechende Empfindlichkeit der Biotests zu erreichen. Der hierzu notwendige Lösungsmiteleininsatz erforderte im Hinblick auf die geringe Belastung der Proben eine besondere Aufmerksamkeit, da die Leerwerttoxizität nur minimal sein durfte. Auch sollten die Biotestverfahren einfach in der

Durchführung sein, da infolge des Monitorings und der aufarbeitungsbedingten Fraktionierung eine größere Anzahl von Proben anfiel. Weiterhin mussten die Biotests so angelegt sein, dass nur geringe Probevolumina erforderlich waren, da, bedingt durch den Aufkonzentrierungsschritt, nur geringe Mengen zur Verfügung standen.

Als Testorganismen werden Vertreter der Produzenten und Destruenten eingesetzt. Die Produzenten, zu denen die Pflanzen und mit ihnen die Algen gehören, stehen am Anfang der biologischen Nahrungskette und haben somit Einfluss auf die natürlichen Stoffflüsse. Algen reagieren dabei sehr empfindlich auf solche Herbizide, die spezifisch den Prozess der Photosynthese beeinträchtigen.

Es wurde ein chronischer 72 h Algenwachstumshemmtest in Mikrotiterplatten und ein akuter Chlorophyll-[a]-Fluoreszenztest angewendet. In mehreren Arbeiten [Gamilla & Naglaa, 1999; Kasai *et al.*, 1993; Berends *et al.*, 1999; Bringmann & Kühn, 1978] konnte beobachtet werden, dass verschiedene Algenarten deutlich unterschiedlich auf die jeweiligen Xenobiotika reagieren. Aus diesem Grund wurden zwei Algenarten zur Abschätzung der Effekte von Flusswasser herangezogen. Der chronische Algentest wurde mit zwei Algenarten, *Chlamydomonas reinhartii* und *Selenastrum capricornutum*, der akute Algentest hingegen nur mit der erstgenannten Alge durchgeführt. Als weiterer Biotest wurde der MicrotoxTM-Test mit dem Leuchtbakterium *Vibrio fischerii* als Testorganismus angewendet. Bakterien sind Destruenten und tragen entscheidend zum Abbau und zur Mineralisierung von biologischem Material bei. Der MicrotoxTM-Test eignet sich aufgrund seiner hohen Sensitivität und seiner einfachen Durchführung gut zu Screeningzwecken und ermöglicht zudem durch seine hohe Standardisierung den Vergleich mit einer großen Datenbasis.

5.1.1 Algenarten und ihre Kultivierung

5.1.1.1 Algenarten

Chlamydomonas reinhartii (SAG 11.32a (+)) ist eine Süßwasseralge und gehört zur Abteilung der Grünalgen (Klasse: Chlorophyceae, Ordnung: Volvocales). Der Flagellat hat eine runde bis ovale Form, seine Größe beträgt nur etwa 15 µm und durch das Vorhandensein zweier Geißeln ist er beweglich. Der Chloroplast (s. Kap. 5.1.4.1) dieser Alge besteht nur aus einer Schicht und weist keine weitere Einstülpung des Endoplasmatischen Reticulums auf [van den Hoek *et al.*, 1993]. Ungewöhnlich ist auch die Zellwand dieser Gattung, wie sie nur bei wenigen verwandten Gattungen vorkommt, da diese aus einem Glycoprotein und nicht aus Polysacchariden, wie es normalerweise der Fall ist, besteht. Diese Alge wurde bereits häufig

wegen ihrer großen Empfindlichkeit als Testorganismus herangezogen [Nyström *et al.*, 1999; Girling *et al.*, 2000b; Hersh & Crumpton, 1987; Pirson & Ruppel, 1962].

Bei der Algenart *Selenastrum capricornutum* (jetzt: *Pseudokirchneriella subcapitata* (SAG 61.81)) handelt es sich ebenfalls um eine Süßwasseralge, die zur Abteilung der Grünalgen (Klasse: Chlorophyceae, Ordnung: Chlorococcales) gehört. Sie ist sichelförmig und etwa 12 µm lang. Im Vergleich zu *C. reinhardtii* ist sie heller, was auf eine andere Zusammensetzung der photosynthetischen Pigmente hinweist. Sie ist deshalb in der photometrischen Messung weniger empfindlich, so dass eine doppelt so hohe Zelldichte wie bei *C. reinhardtii* erforderlich ist, um die gleiche Extinktion zu erreichen. *S. capricornutum* ist bereits in vielen Untersuchungen eingesetzt worden, da sie auch in OECD-Vorschriften als Testorganismus aufgeführt ist. Sie ist einzellig, nicht-agglomerierend und einfach zu kultivieren. Dabei gilt sie als Repräsentant für oligotrophe und eutrophe Gewässer. Auch in saurem Milieu, wie es bei Molkereiabwässern vorliegt (pH 5.8) [Habeck-Tropfke, 1980], kann sie sich vermehren.

Je nach Algenart sind unterschiedliche Lichtstärken erforderlich, damit die Prozesse der Photosynthese optimal funktionieren und ein entsprechendes Wachstum erreicht wird. Chlorophyceae gehören zu denjenigen Algen, die mit sehr geringer Lichtintensität auskommen [Nalewajko & Olaveson, 1998].

5.1.1.2 Kultivierung

Die Kultivierung der auf Agar bezogenen Algenarten (Algenkultursammlung der Universität Göttingen) erfolgte auf zwei verschiedene Arten. Im Turbidostat wurden sie in einem kontinuierlichen Verfahren in Flüssigkultur gezüchtet [Brack, 1996]. Bei dem zweiten Verfahren wurden sie in speziell konstruierten Doppelstockkolben [Brack, 1996] ebenfalls in Flüssigkultur gezüchtet. Hier erfolgte das Wachstum unter statischen Bedingungen. Alle für die Kultivierung der Algen verwendeten Lösungen und Glasgeräte wurden vorher autoklaviert. Das für beide Algenarten verwendete Nährmedium entsprach einer Vorschrift nach Kuhl [1962] (s. Anhang 8.2) und wurde bereits in anderen Arbeiten zur Kultivierung von *C. reinhardtii* eingesetzt [Irmer *et al.*, 1997; Irmer, 1995]. Auch für die Alge *S. capricornutum* erwies sich das Nährmedium als geeignet, da die geforderte Vermehrung (OECD) um den Faktor 16 innerhalb von drei Tagen erreicht wurde. Die Nährlösung wurde doppelt konzentriert hergestellt und beim Einsatz 1:1 verdünnt.

Durch Anzucht der Algen in einem Turbidostat war es möglich, eine Algenkultur zu bevorraten, die sich in einem gleichmäßigen physiologischen Zustand befand. Sie wurde für die Testdurchführungen stets bei etwa 4×10^6 Zellen pro Milliliter gehalten, was dem Zustand

der exponentiellen Phase entsprach. Hierzu wird ein auf 20°C temperierter (Kryostat Coolstar SC-500, Resona Technics) Glaszylinder, der über eine Glasfritte mit über Aktivkohle geleiteter und wassergesättigter Luft (CO₂-Versorgung) belüftet wird und von vier Leuchtstoffröhren (je 10 W, Weißlicht) umgeben ist, mit einer Algenlösung (~ 400 mL) beschickt. Die Lampen beleuchten den Turbidostat mit einer Stärke von ca. 60 μm Photonen·m⁻²·s⁻¹. Das Nährmedium wird über eine Schlauchpumpe zugeführt (IKA Schlauchpumpe PA-SF, Janke 6 Kunkel bzw. Peristaltic Pump P-3, Pharmacia Fine Chemicals). Diese Pumpe wird eingeschaltet, sobald die damit gekoppelte Photodiode (Universität Bayreuth), die die Algendichte in halbstündlichen Rhythmus über die Extinktion (Wellenlänge: 660 nm) kontrolliert, einen Wert misst, der den eingestellten Grenzwert überschreitet. Ein Überlauf, in den auch die Küvette für die Dichtemessung integriert ist, sorgt dafür, dass die überschüssige Algenlösung abgeführt wird. Für die Ermittlung des Grenzwertes wurde eine Korrelation zwischen einer Algenlösung, die mit einem Hämo-cytometer ausgezählt wurde, und den Diodeneinstellungen aufgestellt (s. Abb. 5.1).

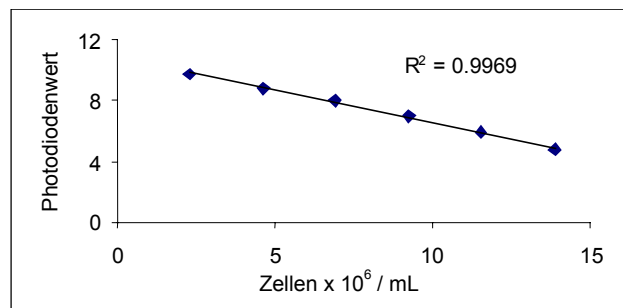


Abb. 5.1: Eichung der Photodiode

Bei den Doppelstockkolben handelt es sich um gasdicht verschlossene Glasgefäße mit zwei Ebenen, die im Gasaustausch miteinander stehen. Im unteren Gefäß befindet sich ein 2 mol/L Carbonat-/Hydrogencarbonat-Puffergemisch (35 vol.% : 65 vol.%), das für eine ausreichende Konzentration an Kohlendioxid in der Atmosphäre sorgt. Dies ist notwendig, da die Algen in diesen Gefäßen jeweils für eine Woche herangezogen werden, ohne dass die verbrauchte Kohlendioxidmenge durch frische Luft nachgeliefert werden kann. Im oberen Gefäß befindet sich die Algensuspension. Die Kolben werden mit 3800 Lux (Abstand 20 cm) beleuchtet.

5.1.1.3 Bestimmung der Algendichte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die Extinktion bei 680 nm an einem UVIKON Spektrophotometer (Firma Kontron Instruments) gemessen. Diese korreliert mit der mittels eines Hämo-cytometers ausgezählten Zellzahl. Hierfür wurden täglich von einer exponentiell

wachsenden Zellkultur Proben genommen und vermessen. Die sich daraus ergebende Korrelation zeigt Abb. 5.2. Verschiedene Arbeiten haben ebenfalls die Extinktion als Maß für die Zelldichte [Kirby *et al.*, 1998; Haas & Oeste, 2001; Haas, 1999] herangezogen.

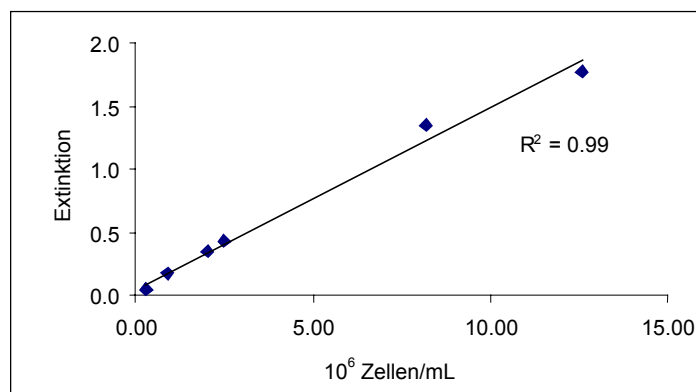


Abb. 5.2: Korrelation zwischen Zellzahl und Extinktion

5.1.2 Algenwachstumshemmtest

5.1.2.1 Durchführung des Algenwachstumshemmtests

Der Algenwachstumshemmtest wurde mittels eines miniaturisierten Tests in Titerplatten durchgeführt. Von einer analytischen Überprüfung der Konzentration der Leitanalyten bei der Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurde abgesehen, da aufgrund der physikalischen Eigenschaften von keiner nennenswerten Verringerung der Konzentration durch Adsorption, Hydrolyse oder Photolyse innerhalb der Testzeit ausgegangen wurde.

In Abwandlung der Methode nach Bopp [2000] wurde mit einer Hydrogencarbonatkonzentration von 50 mg/L statt 100 mg/L in der Testlösung gearbeitet, da bei keiner der beiden Algenarten bei geringerer Carbonatkonzentration eine signifikante Wachstumschwächung auftrat. Die Zelldichte des Inokolums betrug etwa 6×10^6 Zellen pro Milliliter. Die Zelldichte wurde im Medium vorverdünnt, so dass in den Kavitäten eine Zelldichte von 10^5 Zellen pro Milliliter vorlag. Die Algen befanden sich während der Testdauer in der exponentiellen Wachstumsphase, wie in Abb. 5.3 zu sehen ist. Gemäß den Vorschriften der OECD fand während der Testdauer eine Vermehrung der Algenzahl um mehr als das 16fache statt.

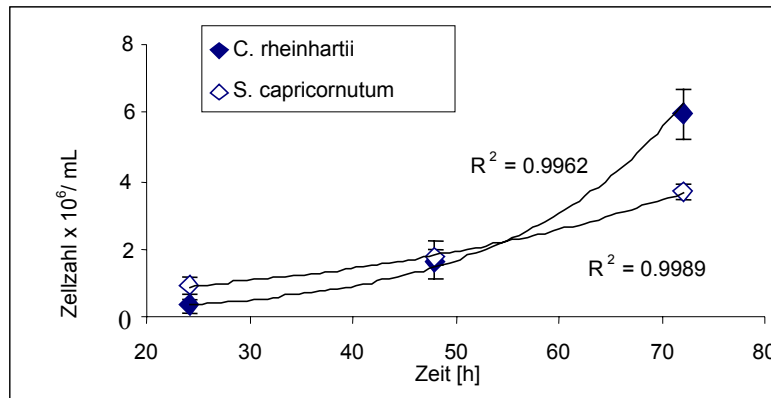


Abb. 5.3: Wachstumskurve in Titerplatten von *C. reinhardtii* und *S. capricornutum*

Als Testalgen wurden die in Abschnitt 5.1.1 beschriebenen Arten *C. reinhardtii* und *S. capricornutum* eingesetzt. Ihre Kultivierung erfolgte in Doppelstockkolben, aus denen eine in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Stammkultur für den Test entnommen wurde.

Der Test wurde in Quarztiterplatten (Fa. Hellma) mit 96 Kavitäten und einem Volumen von jeweils 200 µL durchgeführt. Diese Platten wurden nach jeder Messung mit einem chlorhaltigen Reinigungsmittel gesäubert, um verbleibende Algenreste vollständig zu entfernen. Anschließend wurden sie durch Autoklavieren sterilisiert.

Alle verwendeten Lösungen wurden mittels Membransterilisation (Sartolab[®] V115 0,2 µm, Sartorius, Göttingen) oder durch Autoklavieren entkeimt. Gefäße und Pipettenspitzen wurden ebenfalls autoklaviert. Für die Befüllung der Kavitäten wurde eine 12-Kanal-Pipette verwendet.

Da die Platten nicht in einer geschlossenen Kammer inkubiert wurden, wurde jede einzelne mit einem Deckel und Parafilm verschlossen. Dies führte zu kontrollierten Bedingungen und zur Vermeidung von Verdunstungserscheinungen. Da dennoch ein gewisser Verdunstungseffekt festgestellt wurde, wurde, wie auch in Bopp [2000] beschrieben, die äußere Reihe nicht für die Tests herangezogen, sondern mit Nährlösung und Carbonatpuffer (gleiches Verhältnis wie in den Testlösungen) befüllt. Damit konnten die Verdunstungseffekte kompensiert und gleichzeitig der Leerwert ermittelt und bei der Berechnung der Zelldichte berücksichtigt werden.

Die Inkubation erfolgte während 72 Stunden bei einer Lichtstärke von ca. 3000 Lux (Quantum Sensor LI 185 B, LiCor), was einer Photonendichte von etwa 60 µm Photonen m⁻²·s⁻¹ entspricht. Diese Beleuchtung wurde mit vier Leuchtstoffröhren (Osram Fluora L58/77, Natura de Luxe L58/76) erzielt. Die Inkubation fand in einem klimatisierten Raum bei einer Temperatur von 21±1°C statt. Die Algen wurden während der Inkubation auf einem

Schüttler (Fa. Gerhardt) bei einer Schüttlergeschwindigkeit von 90 rpm in Suspension gehalten.

Das folgende Diagramm beschreibt die Durchführung des Biotests mit Mikrotiterplatten.

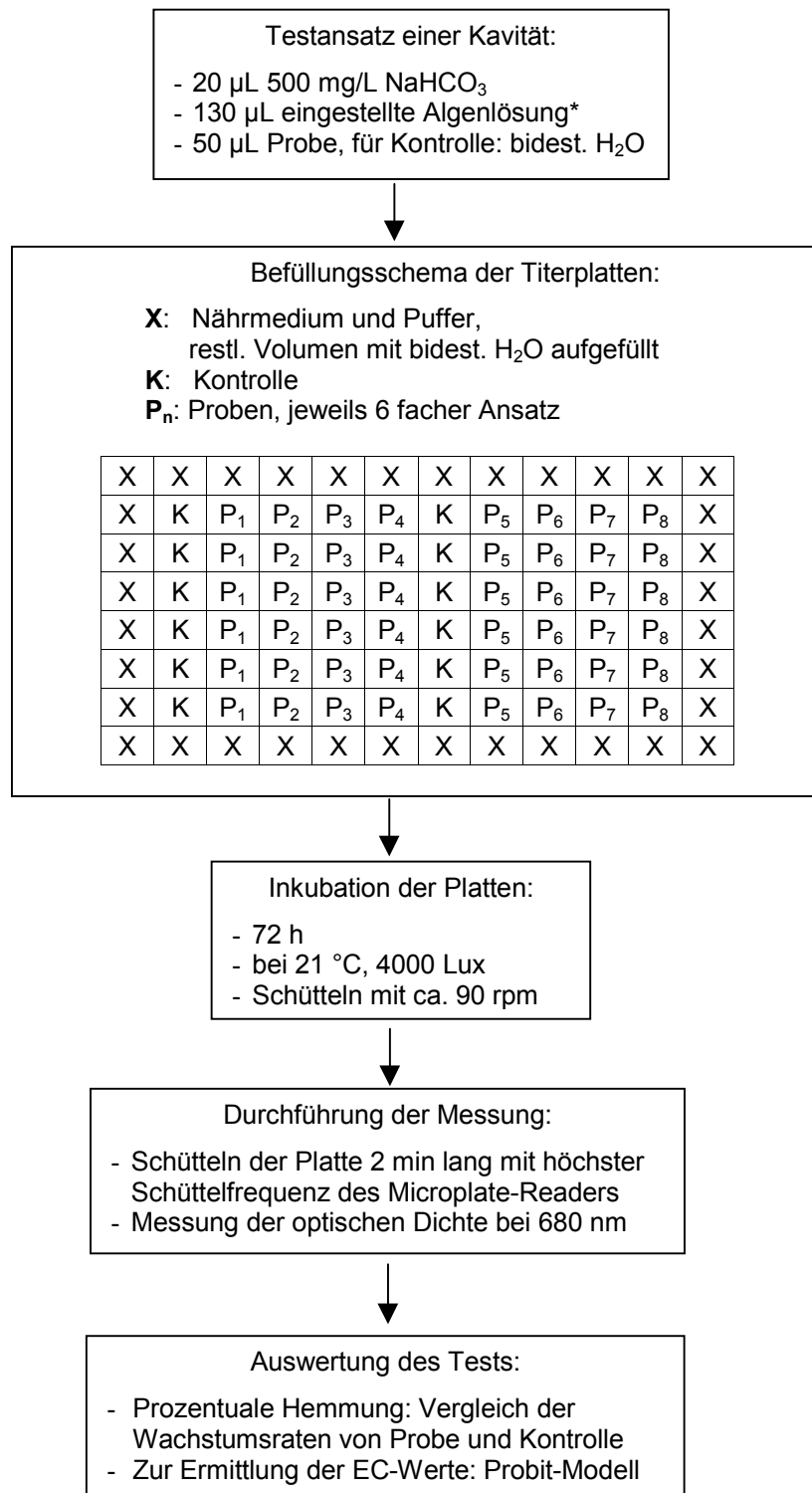


Abb. 5.4: Fließschema für den Mikrotiterplattentest

* Algensuspension mit 1:1 verdünntem Nährmedium

Die Algendichte wurde mit der Extinktion bei 680 nm, die mit dem Microplate-Reader (Reader 340 ATTC, SLT, Salzburg, Österreich) gemessen wurde (s. Abschnitt 5.1.1.3), korreliert.

5.1.2.2 Berechnung der EC-Werte der Leitsubstanzen und Effekte von Proben

Die Berechnung der Hemmung erfolgte über die Wachstumsraten. Dorgerloh [1997] konnte bei einem Vergleich der EC_{50} -Werte einer Reihe von Stoffen zeigen, dass die Berechnung über die Wachstumsraten zu einer objektiveren Bewertung der Hemmeffekte führt als über die Biomasse. Die Wachstumsraten wurden nach folgender Formel aus den Zelldichten berechnet:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t - t_0}$$

μ = Wachstumsrate

N = Zelldichte am Testende, N_0 = Zelldichte zu Beginn

t_0 = Zeit zum Testbeginn, t = Zeit zum Testende

Bei den Effekten handelt es sich um die relative Hemmung der Probe in Bezug zur Kontrolle, ausgedrückt in Prozent. Sie werden wie folgt berechnet:

$$\text{Effekt [\%]} = \frac{\mu_k - \mu_p}{\mu_k} \cdot 100$$

μ_k = Wachstumsrate der Kontrolle

μ_p = Wachstumsrate der Probe

Für die Ermittlung der EC-Werte wurden Dosis-Wirkungskurven (s. Abb. 5.5) erstellt, die mittels Probit-Verfahren ausgewertet wurden. Die Mittelwerte der Hemmwerte wurden aus sechs Parallelmessungen bestimmt.

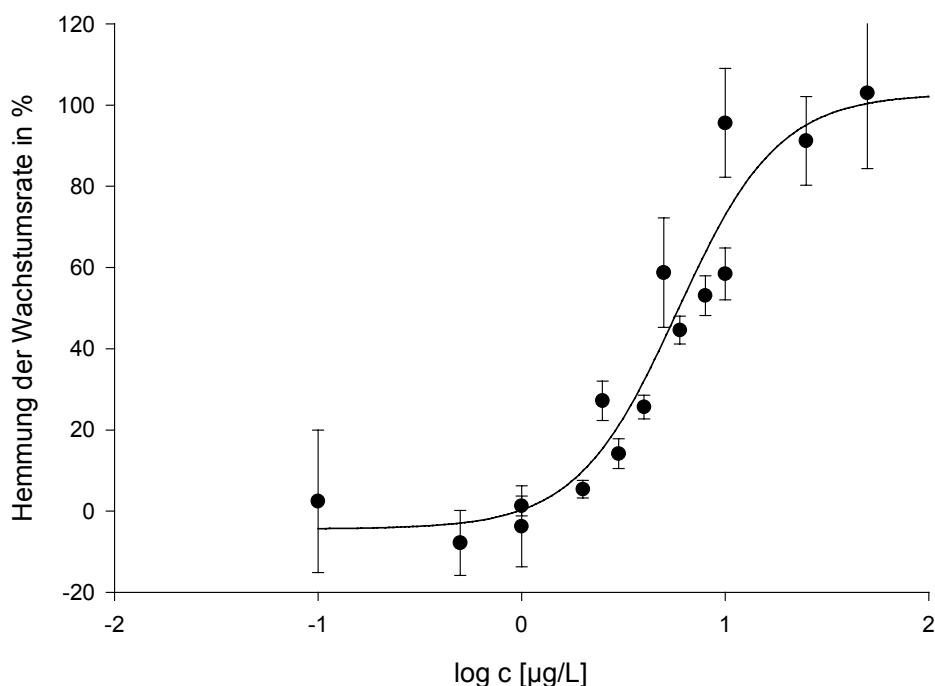


Abb. 5.5: Dosis-Wirkungsbeziehung von Bromacil im Algenwachstumstest mit *C. reinhardtii*

Im Anhang 8.5.3 sind weitere Dosis-Wirkungsbeziehungen von Desethylatrazin, Atrazin und 3,4-Dichloranilin im Algenwachstumstest mit *C. reinhardtii* dargestellt; die daraus berechneten EC-Werte werden in Kap. 5.1.7.2 aufgeführt.

5.1.3 Microtox™-Test

5.1.3.1 Einsatz und Erscheinungsform der Biolumineszenz

Bei diesem Test handelt es sich um ein akutes Testverfahren, das vielfach zur Abschätzung der Toxizität von belasteten Umweltproben wie Abwasser, Sedimente oder Bodenproben herangezogen wird. Der Leuchtbakterientest liegt zudem als DIN-Vorschrift vor. Da die Leuchtstärke auf die Probe schnell anspricht und das Standardverfahren leicht zu handhaben ist, wird es auch zur toxizitätsgeleiteten Fraktionierung von Abwasserproben herangezogen [Fiehn, 1997; Reemtsma *et al.*, 1999]. Auch für ein Oberflächengewässer-Monitoring, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wird, eignet sich dieser Test.

Der Testorganismus ist das marine, fakultativ anaerobe, polar begeißelte Bakterium *Vibrio fischeri* (früher: *Photobacterium phosphoreum*), das die Eigenschaft besitzt, Biolumineszenz auszusenden. Diese Erscheinung ist auf einen biochemischen Prozess zurückzuführen, der einen Seitenstrang der Atmungskette darstellt. Hier wird mittels des Enzyms Luciferase ein angeregtes Flavinmononukleotidmolekül gebildet, welches bei seinem Zerfall Licht

aussendet. Dieser Test gilt als "biologischer Summenparameter", da eine Störung dieses Prozesses aufgrund seiner Kopplung mit verschiedenen Stoffwechselprozessen mehrere Ursachen haben kann. Infolge der kurzen Inkubationszeit werden bei dieser Messung keine biosynthetischen Prozesse erfasst, sondern nur Beeinträchtigungen des physiologischen Zustandes der Bakterienzelle durch die Probe.

5.1.3.2 Ermittlung der Effekte

Die Durchführung des Microtox-Tests erfolgte gemäß den Standardvorschriften. Eine Kultivierung war nicht erforderlich, da die Bakterien gefriergetrocknet bezogen werden konnten (Fa. Azur Environmental, Carlsbad, CA). Für die Messung wurden die Proben auf eine 2,1 %ige Salzkonzentration eingestellt. Die Biolumineszenz wurde mit einem Microtox-500-Gerät, in dem die Proben bei 15°C inkubiert wurden, gemessen. Bedingt durch das gewählte Verfahren betrug der Verdünnungsfaktor mindestens zwei. Die Hemmungen wurden nach 5 und 15 min aufgenommen.

EC₁₀- und EC₅₀-Werte wurden mit der Γ -Funktion berechnet. Sie beschreibt die Leuchtabnahme im Verhältnis zur verbleibenden Leuchtstärke. Durch doppelte Logarithmierung erhält man eine lineare Dosis-Wirkungskurve.

$$\Gamma = [\text{BR}_{t(\text{MW})} \cdot I_0 - I_t] / I_t$$

$$\text{BR}_t = I_{b,t} / I_{b0}$$

Γ = Lumineszenz

I_0, I_t = Leuchtintensität der Testansätze zur Zeit 0, t

$I_{b0}, I_{b,t}$ = Leuchtintensität der Kontrolle zur Zeit 0, t

BR_t = Korrekturfaktor für die nichttoxische Leuchtabnahme

Für die Berechnung wird ein Korrekturfaktor eingesetzt, der die natürliche Leuchtminderung während der Messung berücksichtigt. Diesen erhält man aus der Leuchtstärke der Kontrolle zu Beginn und am Ende der Messung. Es wird ein Faktor für die Messungen nach 5 und nach 15 min ermittelt.

Die für die Festphasenextrakte ermittelten prozentualen Hemmungen der Biolumineszenz werden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Effekt [\%]} = \frac{[\text{BR}_{t(\text{MW})} \cdot I_0 - I_t] / [\text{BR}_{t(\text{MW})} \cdot I_0] \cdot 100$$

Zeichenerklärung siehe oben

5.1.4 Fluoreszenztest und Sauerstoffmessung

5.1.4.1 Mechanismen der Photosynthese

Bei der Photosynthese wird Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt, indem eingefangene Photonen eine Elektronenreaktionskette anstoßen, die zur Wasserspaltung führt, den Aufbau eines Protonengradienten und damit die Gewinnung des Energieträgers ATP ermöglicht. Die Photosynthese läuft in Zellorganellen, den sogenannten Chloroplasten ab. Sie werden von einer Hülle umgeben, die aus zwei Biomembranen besteht. Die äußere von beiden ist für viele Stoffe permeabel, die innere enthält die Transportsysteme für den Stoffaustausch mit der umgebenden Phase. In der äußeren Membran sind Porine enthalten; diese ermöglichen einen Durchgang von Molekülmassen bis zu 10 000 Da. Die Chloroplasten enthalten das Stroma, in dem sich auch die Thylakoidmembranen befinden, welche bei den meisten Algen lamelliert vorliegen. Die Partikel des Photosyntheseapparates bestehen im wesentlichen aus dem Photosystem I und II, dem "Light-harvesting-complex", dem Cytochrom b, dem f-Komplex und der ATP-Synthase. Sogenannte Antennenpigmente absorbieren die Lichtenergie, die anschließend in mehreren hintereinander geschalteten Elektronentransportreaktionen in chemische Energie umgewandelt wird. Von den vorhandenen Chlorophyll-a-Molekülen sind nur diejenigen photosynthetisch aktiv, die mit den Reaktionszentren verbunden sind [Nultsch, 2001].

5.1.4.2 Prinzipien der Algenfluoreszenz und deren Einsatz als biologischer Indikator

Bestrahlung, Temperatur, Luftverschmutzung [Arndt, 1974], Nährstoffe und auch Pestizide und Metalle [van der Heever & Grobbelaar, 1998] können die Chlorophyll-[a]-Fluoreszenz-Ausbeute, eine Begleiterscheinung der Photosynthese, beeinflussen. Sie tritt beim Übergang des angeregten Chlorophyll-a-Moleküls in den Grundzustand auf, wobei außerdem photosynthetische Energie und Wärmeenergie entsteht. Diese drei Energieformen hängen direkt voneinander ab, da sie in der Summe eins ergeben. Dieser Vorgang ist bereits seit den 40er Jahren bekannt und wurde von Kautsky & Franck [1943] zum ersten Mal beschrieben. Da dieser Parameter relativ empfindlich auf verschiedene Schadstoffe reagiert, wurde die Chlorophyll-[a]-Fluoreszenz bereits zur Überwachung von Flüssen [Lebkuecher & Houtman, 1999; Irmer, 1995; Merschhemke, 1993] eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass Herbizide, die auf das Photosystem II einwirken, anhand der Fluoreszenzausbeute detektiert werden können [Yoneyama *et al.*, 1993]. Conrad *et al.* [1993] fanden heraus, dass die

Sensitivitätsgrenze der Chlorophyll-a-Fluoreszenz für einige Pestizide bei 0.5 $\mu\text{mol/L}$ liegt; das entspricht etwa 50 $\mu\text{g/L}$ (\emptyset MG: 100 g/mol).

Das Auftreten der Chlorophyll-[a]-Fluoreszenz liegt darin begründet, dass ein Teil der durch Chlorophyllmoleküle aufgenommenen Lichtenergie als rotes Fluoreszenzlicht abgegeben wird [Krause & Weis, 1991]. Man unterscheidet hierbei zwischen der schnellen (Millisekundenbereich) und der langsamen Fluoreszenz (mehrere Minuten). Die beobachtete Fluoreszenzlöschung (Quenching) kommt durch photochemische (q_p) und nicht-photochemische (q_{NP}) Vorgänge zustande [Buechel & Wilhelm, 1993; Krause *et al.*, 1982]. Zum photochemischen Quenching gehören die Reduktion der Akzeptormoleküle, die die Energie zur Ladungstrennung und zum Elektronentransport verwenden. Als nicht-photochemisches Quenching bezeichnet man die Vorgänge, die zum Aufbau des Protonengradienten an der Thylakoidmembran führen. Man bezeichnet dieses Quenching auch als energieabhängig, da es mit der Photophosphorylierung, der Gewinnung des Energieträgers ATP, gekoppelt ist. Ein weiterer Effekt, der sogenannte Kautsky-Effekt [Lichtenthaler, 1992], tritt nach einer Dunkeladaptation gefolgt von der Bestrahlung mit aktinischem Licht auf. Anhand des Anstiegs dieser Kurve lässt sich eine Aussage über den Zustand des Photosyntheseapparates machen. Ferner erlaubt ein bestimmter Beleuchtungsablauf (Wechsel zwischen aktinischem Licht und Sättigungsblitzen), verschiedene Zustände im Photosyntheseapparat zu unterscheiden.

Eine geeignete Interpretation der Fluoreszenzparameter ermöglicht es, verschiedene Wirkmechanismen der Stoffe abzuleiten [Brack & Frank, 1998; Schmidt, 1985]. Im Falle unbekannter photosynthetisch aktiver Verbindungen lässt sich anhand des Musters der Fluoreszenzinduktionskurve auf Strukturen der aktiven Komponenten schließen.

Die meisten Photosyntheseinhibitoren blockieren die Weiterleitung des Elektronentransports (Redoxprozess), was zu einem Anstieg der Fluoreszenzausbeute führt. Viele der eingesetzten Herbizide (Triazine, Harnstoffderivate) binden bevorzugt am D1-Protein und verdrängen damit das Plastochinon, ein Molekül, das an der Weiterleitung der Elektronen beteiligt ist.

5.1.4.3 Messung der Chlorophyllfluoreszenz

Zur Aufnahme der Chlorophyllfluoreszenz-Induktionskurven wurde ein Puls-Amplituden-Modulationsfluorometer (PAM-Fluorometer) der Firma Walz (Effeltrich) eingesetzt, das von Jensen (Universität Essen) in einigen Teilen modifiziert wurde. Ein Programm zur Erfassung der Daten und zur Steuerung der verschiedenen Lichtquellen wurde ebenfalls von Jensen entwickelt. Diese Apparatur fand bereits in mehreren Arbeiten, u.a. zur Untersuchung von

Effekten auf die Photosynthese von Algen durch Sickerwässer [Brack, 1996], Nebel [Bopp, 2000] und Schadstoffmischungen [Haas, 1999], ihre Anwendung. Die Algen befinden sich in einer auf 20°C (Wasserkühlung) temperierten Messküvette.

Das Puls-Amplituden-Modulationsprinzip (Entwicklung von Dr. Schreiber, Universität Würzburg) beruht auf dem Einsatz eines schwachen modulierten Messlichts, das von einer lichtemittierenden Elektrode geliefert wird und mittels derer die Grundfluoreszenz von dunkeladaptierten Proben erfasst werden kann. Eine entsprechende Messtechnik (u.a. Einsatz von Kurzpass- und Langpassfiltern) sorgt dafür, dass resultierende Fluoreszenz, getrennt von anderen überlagernden Lichtsignalen, gemessen werden kann. Die Intensität des Messlichts betrug $0.22 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, die des aktinischen Lichts $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und die des Lichtblitzes $2900 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Zur Messung der schnellen Fluoreszenzinduktion werden dunkeladaptierte Algen etwa 1 s lang mit aktinischem Licht bestrahlt, und anschließend wird die Fluoreszenz mit einer Auflösung von 1000 Messpunkten pro Sekunde gemessen. Der Fluoreszenzparameter F_v/F_m stellt dabei einen guten Indikator für die allgemeine Photosynthesehemmung [Hong & Xu, 1999] dar. Die Parameter der schnellen Fluoreszenz, sprechen in der Regel am empfindlichsten auf Fremdstoffeinwirkung an.

Da die Chlorophyll-[a]-Fluoreszenz stark vom Chlorophyllgehalt der Probe abhängt, war der Einsatz einer stabilen Algenkultur, wie sie vom Turbidostaten geliefert wurde, entscheidend, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

5.1.4.4 Messung der Sauerstoffproduktion mit der Clark-Elektrode

Die Sauerstoffproduktion ist ein weiterer Parameter, der unmittelbar mit der Photosyntheseleistung gekoppelt ist und als Messpunkt bei der Erfassung photosynthetisch wirksamer Komponenten herangezogen werden kann. Mingazzini *et al.* [1997] haben in einem automatisierten Verfahren die Sauerstoffrate in Gegenwart von Diuron gemessen und festgestellt, dass die EC_{50} -Werte von 30 Minuten vergleichbar mit denjenigen eines 96h-Wachstumstests sind. Garrido *et al.* [1999] zeigten, dass die Sauerstoffproduktion einer marinen Mikroalge nach 24 h die gleiche Empfindlichkeit aufweist wie der Algenwachstumstest nach 72 h.

Durch die verwendete Kammer war es möglich, gleichzeitig Fluoreszenz und den photosynthetisch gebildeten Sauerstoff zu messen. Eine semipermeable Teflonmembran ließ nur den Sauerstoff passieren, der anschließend an der Kathode reduziert werden konnte. Die beiden Elektroden, Kathode (Platin) und Anode (Silber), stehen über eine KCl-Elektrolyt-Brücke (5 mol/L) miteinander in Verbindung. Die Elektroden werden durch eine

Gleichspannung von 790 mV polarisiert. Die Clark-Elektrode ist am Boden der Küvette für die Fluoreszenzmessung angebracht.

5.1.5 Qualitätssicherung der Biotests

Die Qualitätssicherung musste sicherstellen, dass die eingesetzten Organismen sich in einem gleichmäßigen Zustand befanden. Hierzu war zum einen die Überprüfung eines physiologischen Parameters (neutrale Kontrolle) notwendig, und zum anderen musste die Sensitivität der Population mittels einer positiven Kontrolle überwacht werden. Als neutrale Kontrolle wurde im Falle des Algenwachstumstests die Wachstumsrate, für den MicrotoxTM-Test der Korrekturfaktor, der die natürliche Abnahme des Leuchtens beschreibt, herangezogen. Der Korrekturfaktor ist auch in den Gültigkeitskriterien der DIN 38 412 [DIN, 2002] festgelegt und sollte zwischen 0,6 und 1,8 liegen. Bei der Algenfluoreszenz wird der physiologische Zustand der Algen durch den Parameter F_v/F_M beschrieben. Für die positive Kontrolle wurden verschiedene Kontrollproben herangezogen. Es handelte sich dabei sowohl um Standardlösungen als auch um mit Leitsubstanzen dotierte Festphasenextrakte.

Ein weiterer wichtiger Punkt der Qualitätssicherung betraf die Leerwerte, die sorgfältig Schritt für Schritt überprüft werden mussten, da die untersuchten Proben in der Mehrzahl nur sehr gering belastet waren. In den Kapiteln 5.1.6 (Festphasenmaterial) und 5.1.7 (Lösungsmittel) wird auf dieses Thema näher eingegangen.

5.1.5.1 Streuung der Kontrollen im Algenwachstumstest

Die Wachstumsraten [μ] von *C. reinhardtii* und *S. capricornutum* sind in Abb. 5.6 dargestellt. Es sind hier die Mittelwerte aus sechs Wiederholungen, die in einer Mikrotiterplatte durchgeführt wurden, eingetragen. Die Schwankungen innerhalb einer Platte liegen in der Regel zwischen 1 und 5 %. Die Schwankungen von Tag zu Tag über den gesamten Messzeitraum liegen für *C. reinhardtii* bei 12 % (n=139) und für *S. capricornutum* bei 14 % (n=65). Die Wachstumsrate ist über diesen Zeitraum als stabil zu betrachten; sie beträgt im Mittel $0,051 \text{ h}^{-1}$ (*C. reinhardtii*) und $0,044 \text{ h}^{-1}$ (*S. capricornutum*). Im Vergleich zu *C. reinhardtii* weist *S. capricornutum* eine etwas niedrigere Wachstumsrate auf. Mandal *et al.* [2002] ermitteln in einem Mikrotiterplattentest unter Verwendung der gleichen Alge ebenfalls Wachstumsraten zwischen $0,04$ und $0,05 \text{ h}^{-1}$. Dies zeigt, dass sich die Wachstumsraten von *S. capricornutum* in einem normalen Bereich befinden.

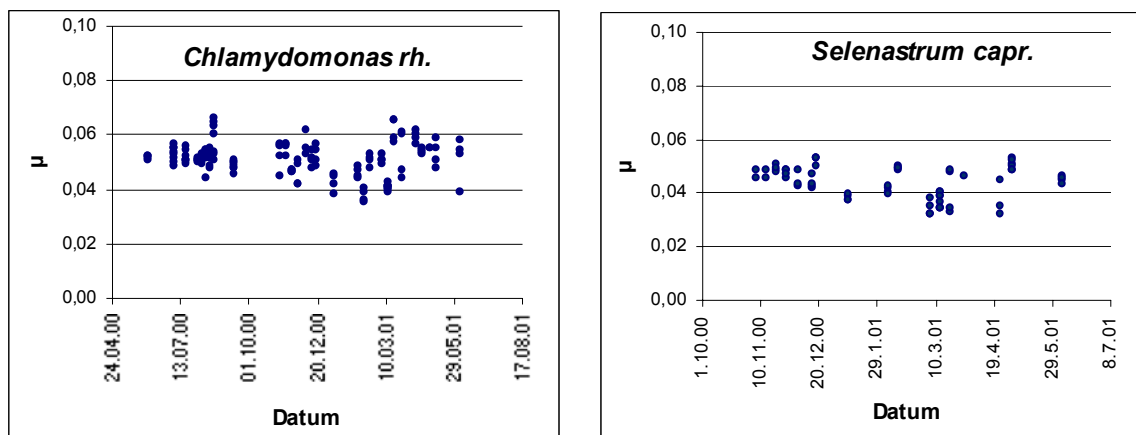


Abb. 5.6: Kontrollkarten für Wachstumsraten [μ] von *C. reinhardtii* und *S. capricornutum*

Als Referenzproben werden in jeder Serie wässrige (Abb. 5.7 a) bzw. aus Flusswasser (Abb. 5.7 b) gewonnene Extrakte mitgeführt. Im SPE-Extrakt sind die Leitsubstanzen (s. Kap. 4.1) in einer Konzentration von je 10 $\mu\text{g/L}$ enthalten. Es wurden folgende Kontrollen abwechselnd mitgeführt:

- Neutrale Anreicherung einer Standardlösung
- Saure Anreicherung einer Standardlösung
- Neutrale Anreicherung einer Quellwasserprobe
- Neutrale Anreicherung einer Flusswasserprobe

Die gemessenen Hemmungen sind in Kontrollkarten (Abb. 5.7 und Abb. 5.8) für die jeweilige Alge dargestellt. Die sauer angereicherten Proben enthalten zusätzlich die Phenoxyessigsäuren. Es zeigt sich jedoch, dass die Extrakte der neutralen Anreicherung und der sauren Anreicherung in ihrer Hemmwirkung keine signifikanten Unterschiede (t-Test) aufweisen. Daraus lässt sich ableiten, dass die Phenoxyessigsäuren in diesen Konzentrationen keinen Beitrag zu einem Effekt im Algenwachstumstest leisten. Ebenfalls kommt es zu keiner Änderung des Effekts durch die Flusswassermatrix, wie aus den Kontrollkarten ersichtlich ist (s. auch Kap. 5.1.9).

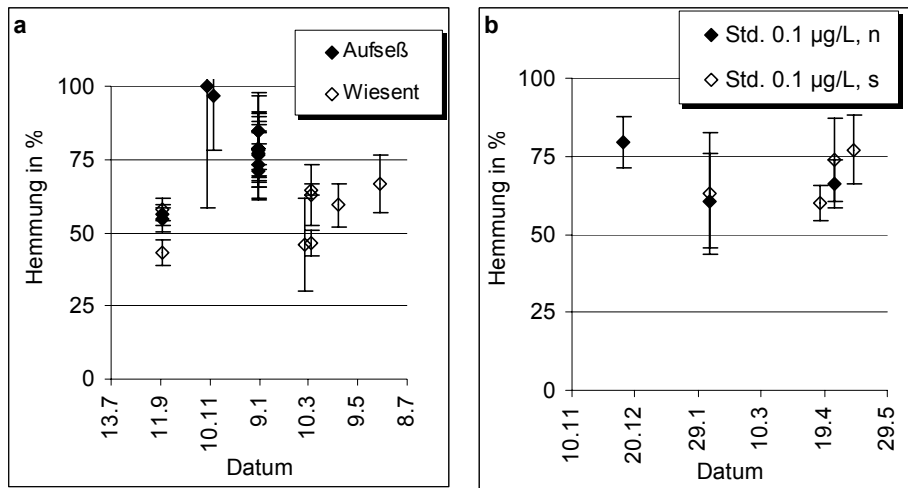


Abb. 5.7: Positive Kontrollen von *C. reinhardtii* **a:** SPE-Eluat (100-fach) von dotiertem Flusswasser (je 0,1 µg/L Std.), **b:** SPE-Eluat eines wässrigen Standards, n: neutral; s: sauer

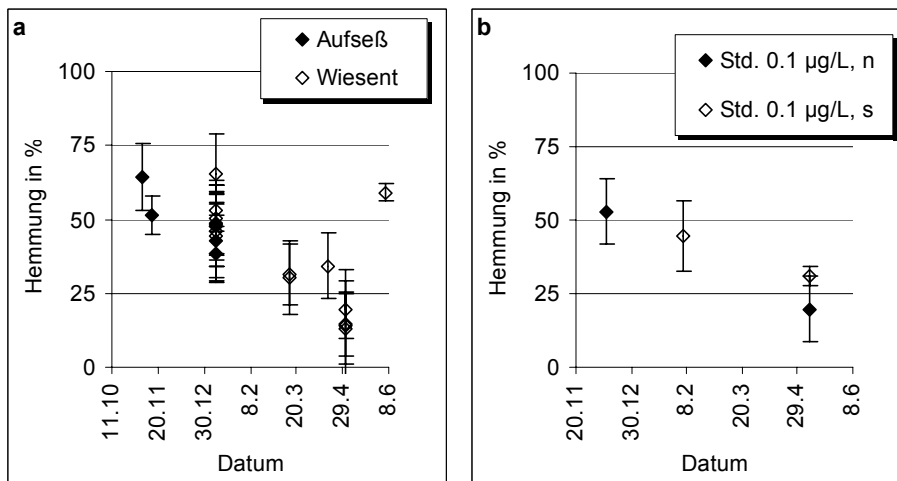


Abb. 5.8: Positive Kontrollen von *S. capricornutum* **a:** SPE-Eluat (100-fach) von dotiertem Flusswasser (je 0,1 µg/L Std.), **b:** SPE-Eluat von wässrigem Standard, n: neutral; s: sauer

Der Verlauf der Kontrollkarte für die Alge *C. reinhardtii* ist von keiner Tendenz nach oben oder unten geprägt. Hingegen nimmt die Empfindlichkeit der Alge *S. capricornutum* gegenüber der Referenz im letzten Drittel des dargestellten Zeitraumes um etwa die Hälfte ab. Da sowohl die gleichen Proben als auch gleiche Bedingungen für beide Algenarten vorliegen und auch das Wachstum nicht etwa abgenommen hat, ist diese Beobachtung nicht eindeutig zu klären. Ein möglicher Erklärungsansatz ist eine genetische Veränderung der Alge. Auch ist eine verstärkte Sedimentation der Algen nicht auszuschließen, die einhergeht mit der Abscheidung von schleimbildenden Stoffen, die den Titerplattenboden belegen können und somit ein besseres Wachstum durch eine höhere Extinktion vortäuschen (s. Kap. 5.1.7.2). Diese Abnahme ist erst ab März 2001 zu beobachten. Die in dieser Zeit ermittelten Effekte gegenüber der Alge *S. capricornutum* für die Serie April 2001 werden aus diesem Grund vornehmlich untereinander verglichen.

Die relativen Varianzen von aufgearbeiteten Flusswasserproben, die in den Kontrollkarten aufgeführt sind, betragen für *C. reinhardtii* 15 % und für *S. capricornutum* 30 %. Diese Werte sind für Algenwachstumstests durchaus vertretbar. [Chao & Chen, 2001] ermittelten für verschiedene Metalle im Algenwachstumstest EC₅₀-Werte zwischen 14 und 28 %.

5.1.5.2 Reproduzierbarkeit des MicrotoxTM-Test

Beim MicrotoxTM-Test handelt es sich um einen standardisierten Test. Infolgedessen wurde eine Schwankung von etwa 10 % für die Untersuchung angenommen, die auch mehrfach in anderen Arbeiten zugrundegelegt wird. Boluda *et al.* [2002] geben für den EC₅₀-Wert einer Wasserprobe sogar Schwankungen bis zu 18 % an. Das Verhältnis der Leuchtabnahme, das gemäß DIN 38 412 [DIN, 2002] zwischen 0,6-1,8 liegen soll, betrug im Mittel 0,80 (VK: 7%) für 5 min und 0,83 (VK: 10%) für 15 min.

Die während dieser Arbeit gemessenen Chromatlösungen ergeben einen mittleren EC₅₀-Wert für Chromat von 14 mg/L. Dieser stimmt sehr gut mit dem in der DIN 38 412 [DIN, 2002] genannten Wert von 14,1 mg/L überein. Als organische Referenzsubstanz wurde 2,6-Dichlorphenol herangezogen, dessen EC₅₀-Wert 13,2 mg/L [Kaiser, 1998; Kaiser & Ribo, 1988] ist. In dieser Arbeit wurde der EC₅₀-Wert mit 14 mg/L bestimmt.

Für die Leerwerttoxizität betrug die relative Standardabweichung 10 % für die neutralen Fraktionen und 15 % für die sauren Fraktionen. Diese Standardabweichungen gelten auch als signifikante Schwelle und somit als Hinweis auf die Anwesenheit von Fremdstoffen im Eluat.

5.1.5.3 Streuung der Algenfluoreszenzparameter und Sauerstoffproduktionsrate

In Tab. 5.1 und Tab. 5.2 sind die Variationskoeffizienten der gemessenen und ausgewerteten Fluoreszenzparameter der Referenz (unbelastete Kontrolle) und der Qualitätskontrolle Atrazin gegenübergestellt.

Es zeigt sich, dass die Parameter, die aus der langsamen Fluoreszenz resultieren, mit geringeren Schwankungen behaftet sind als die Parameter der schnellen Fluoreszenz und des Parameters Sauerstoff. Dies gilt auch für die Qualitätssicherung mit Atrazin. Die Parameter der schnellen Fluoreszenz stellen Integrale über eine Zeit bis zu 400 Millisekunden dar. Die Erfassung der Fluoreszenzinduktionskurve während einer so kurzen Zeitspanne ist offensichtlich mit einer höheren Schwankung verbunden als die Messung der anderen Parameter, die über einen Zeitraum von 10 Minuten gemittelt werden.

Tab. 5.1: Variationskoeffizienten [%] der ausgewerteten Fluoreszenzparameter (n=36) für die unbelastete Kontrolle

F_v/F_m	F_o'/F_o	MW-qP	$\Delta F/F_m$	I_{50}	I_{ges}	I_{50}/I_{ges}	Sauerstoff
6.0	3.5	3.3	7.8	16.7	18.6	10.5	39.6

Tab. 5.2: Variationskoeffizienten [%] der ausgewerteten Fluoreszenzparameter (n=21) für die Atrazin-Kontrolle (100 µg/L)

F_v/F_m	F_o'/F_o	MW-qP	$\Delta F/F_m$	I_{50}	I_{ges}	I_{50}/I_{ges}	Sauerstoff
9.1	3.6	12.5	13.4	13.5	14.1	9.2	39.7

5.1.6 Leerwertproblematik durch Verwendung von Festphasen

Bei der Entwicklung einer toxizitätsgeleiteten Methode für gering belastete Oberflächengewässer wurde der Leerwertproblematik besondere Aufmerksamkeit gewidmet, da durch die Verwendung von Polymeren und organischen Lösungsmitteln während der Aufarbeitung ein möglicher Eintrag von toxischen Verbindungen nicht ausgeschlossen war. Anlass dazu gaben die Herstellungsprozesse von Festphasen und Lösungsmitteln (s. Kap. 5.1.7). Die Vorläufer der eingesetzten Festphasen waren XAD-Harze, die ebenfalls zur Detektion von toxischen Stoffen in Umweltproben eingesetzt wurden [Hendriks *et al.*, 1994]. Hier traten jedoch häufig Artefakte auf, die bei biotestgeleiteter Analytik zu Problemen führten [Daignault *et al.*, 1988]. Die Reinheit der Festphase Isolute-ENV+ ließ sich anhand von Herstellerangaben nicht abschätzen, da die Überprüfung von Verunreinigungen nicht alle Verbindungen erfasst, die möglicherweise ökotoxikologische Relevanz besitzen, so dass hier verschiedene Versuche erforderlich waren, um diese Unsicherheit auszuschließen. Die daraus hervorgegangene Vorschrift für die Festphasenextraktion ergab entsprechend geringe Leerwerteffekte (s. Abschnitt 5.1.6.2).

5.1.6.1 Optimierung der Festphasenextraktion hinsichtlich intrinsischer Leerwerttoxizität

Infolge des Einsatzes von Polymerphasen wurde geprüft, ob sich durch den Elutionsprozess organische Verbindungen aus dem Material lösen, die in den Biotestverfahren einen Effekt hervorrufen. Es wurden verschiedene Festphasen getestet, darunter auch zwei Phasen auf Kieselgelbasis mit Butyl- (C₄, 500 mg) und Phenolresten (PH, 500 mg), graphitierte Kohle (Carbopack, 250 mg) und eine Polystyrol-Divinylphase (Isolute ENV+, 100 mg). Die Festphasenextrakte wurden im MicotoxTM-Test überprüft, da die Leuchtbakterien im allgemeinen empfindlicher auf organische Stoffe reagieren als die Algen.

SPE-Extraktion:

- Konditionierung mit 6 mL MeOH
- Extraktion von 500 mL bidest. Wasser
- Waschen mit 50 mL Wasser
- Trocknen unter Vakuum
- Elution mit 3 x 3 mL MeOH

Die an zwei verschiedenen Tagen gemäß dem oben angegebenen Aufarbeitungsschema durchgeführten Versuche sind in Abb. 5.10 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Aufarbeitung tatsächlich einen höheren Effekt als die normale Schwankung des Leerwertes von 10 % mit sich bringt.

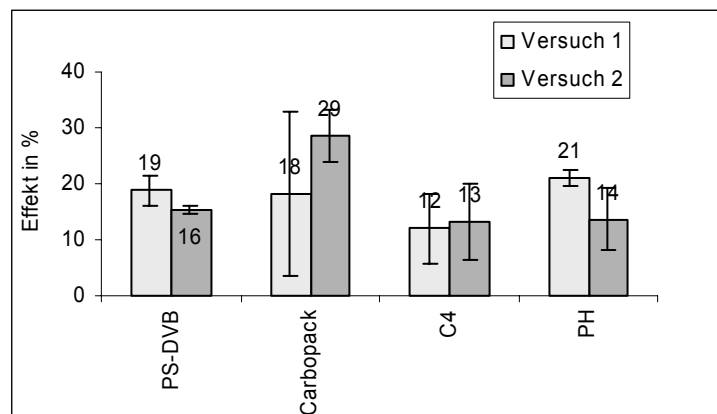


Abb. 5.10: 1. SPE-Eluat vier verschiedener Festphasen im MicrotoxTM-Test

Bei den in Abb. 5.10 dargestellten Extrakten handelt es sich um die ersten 3 mL der Methanol-Elution. Es wurde jeweils erneut zweimal mit 3 mL eluiert, und diese Eluate wurden ebenfalls im MicrotoxTM-Test getestet. Eine Vergleich der Effekte von Eluat 1 - 3 ist in Abb. 5.11 dargestellt.

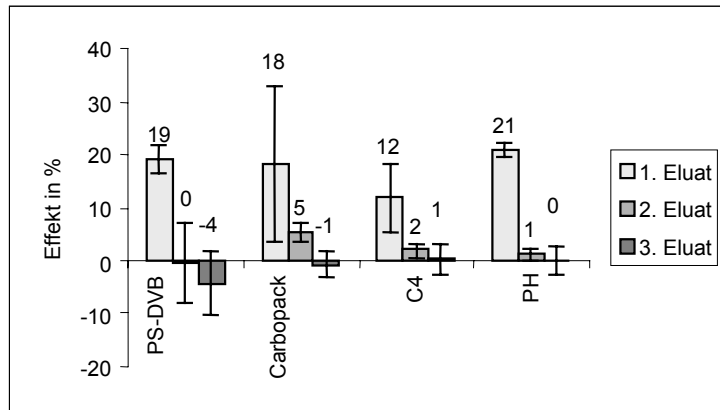


Abb. 5.11: SPE-Eluate (1-3) vier verschiedener Festphasen im Microtox™-Test

Der Verlauf der Effekte zeigt, dass für alle vier Festphasenmaterialien bereits das Eluat der zweiten Elution kleiner als 10 % ist, der signifikanten Schwelle im Microtox™-Test. Da für das Monitoring 200 mg Sorbens eingesetzt wurden, wurde die Methanolmenge zum Konditionieren auf 18 mL erhöht, um alle möglichen Störsubstanzen zu entfernen.

5.1.6.2 Effekte der SPE-Leerwerte

Es wurde bei jeder Probenserie ein Leerwert sowohl unter neutralen als auch unter sauren Bedingungen aufgearbeitet und anschließend im Biotest untersucht, um Artefakttoxizität, die durch Lösungsmittel- oder auch Säureinsatz auftreten könnte, ausschließen zu können. Bedingt durch die Aufarbeitung enthielten die Proben 1 % (Algentest) bzw. 0,45 % (Microtox) Methanol. Diese Konzentrationen liegen unterhalb des EC_{10} -Wertes für den jeweiligen Organismus (s. Kap. 5.1.2.2). Die nachfolgenden Diagramme zeigen die Schwankungen der Leerwerteffekte im Algenwachstum (Abb. 5.12). Der obere Effektbereich der Konfidenzintervalle aller Leerwerte aus Algenwachstumstests liegt bei 2,3 %.

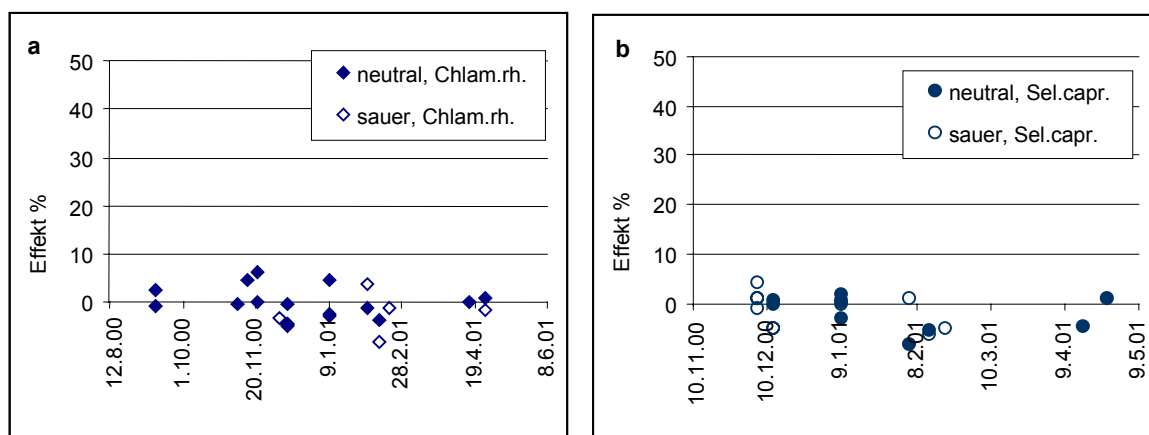


Abb. 5.12: SPE-Blindwerte im Algenwachstumstest: **a:** *C. reinhardtii*, **b:** *S. capricornutum*

Im MicrotoxTM-Test liegt die toxische Grenzkonzentration für neutral angereicherte Proben bei 10 %, für sauer angereicherte Proben bei 20 %. Diese Werte ergeben sich aus den Konfidenzintervallen der gemessenen Leerwerte. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass entgegen einiger Vorschriften die Festphase der sauren Extraktion nach der Probenaufgabe nicht mit angesäuertem Wasser sondern mit neutralem Wasser gespült wurde. Dies war von besonderer Wichtigkeit, da andernfalls der pH-Wert des Eluates nach der Einengung einen für die Leuchtbakterien toxischen Bereich erreicht hätte. Ein möglicher Verlust an sauren Verbindungen infolge eines dadurch verursachten Anstieg des pH-Werts konnte mit den Wiederfindungsversuchen ausgeschlossen werden.

5.1.7 Sensitivitätsgrenzen der Biotests: Lösungsmittel und Leitsubstanzen

Da die in dieser Arbeit untersuchten Proben sehr gering belastet sind, war es erforderlich, die Sensitivitätsgrenzen der eingesetzten Biotests zu überprüfen.

Dies erfolgte zum einen durch Erstellung von Dosis-Wirkungskurven der Leitsubstanzen und außerdem durch Dotierung von nativen Proben mit den Leitsubstanzen, die in der gleichen Weise aufgearbeitet wurden wie die untersuchten Wasserproben.

Zudem wurde geprüft, welche der Lösungsmittel, die sich für die HPLC eignen, die geringsten Effekte auf die eingesetzten Testorganismen ausüben. Die Behandlung der Proben sah zunächst eine Vorfraktionierung über die Festphase wie auch eine Feinfraktionierung der gewonnenen Probenextrakte mittels reversed-phase-HPLC vor. Für beide Schritte war die Verwendung von Lösungsmitteln erforderlich. Ein wegen seiner geringen Toxizität häufig in Biotests eingesetztes Lösungsmittel ist Dimethylsulfoxid (DMSO). Diese Verbindung ist jedoch für die HPLC nur bedingt geeignet, da sie im UV-Bereich absorbiert und somit bei der UV-Detektion stört. Andere Lösungsmittel kommen dagegen häufiger in der Flüssigkeitschromatographie zum Einsatz, wie z.B. Methanol und Acetonitril. Darüber hinaus wurden auch Tetrahydrofuran, Isopropanol und Dioxan getestet, da sie infolge ihres Polaritätsbereiches (s. Tab. 5.7) ebenfalls für den Einsatz in der RP-HPLC in Frage kommen.

Aus den Dosis-Wirkungskurven, die mit mindestens einem der drei Biotests gewonnen wurden, wurden EC₁₀-Werte berechnet.

In der Literatur findet man zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich Herbizidtoxizität gegenüber Algen, jedoch variieren diese je nach Testorganismus und Testbedingungen bis zu einigen Zehnerpotenzen. So variiert der EC₅₀-Wert von Alachlor gegenüber verschiedenen Grünalgenarten bereits um den Faktor 50, wie Fairchild *et al.* [1998] dies bei einem Vergleich von sechs Algenarten gezeigt haben. Auch ist *S. capricornutum* gegenüber

Natriumtrifluoracetat um mehr als das hundertfache empfindlicher als *C. reinhardtii* [Berends *et al.*, 1999]. Ebenso können die gewählten Endpunkte, wie z.B. die optische Dichte oder der Chlorophyll[a]-Gehalt, bei Algenwachstumshemmtests zu unterschiedlichen Effektdosen führen, die sich bis zu einem Faktor vier unterscheiden können [Tang *et al.*, 1997].

Die Wahl des Nährmediums kann ebenfalls zu unterschiedlichen Toxizitäten führen; darüber berichten [Millington *et al.*, 1988]. Nicht so stark ausgeprägte Effekte können durch niedrigere Wachstumsraten verursacht werden, wie es in verschiedenen Arbeiten [Eberius, 2000; Cleuvers & Ratte, 1999] diskutiert wird.

In der Literatur findet man häufig EC_{50} -Werte. Angaben zu geringen Effektdosen wie EC_{10} , NOEC und LOEC liegen dagegen nur vereinzelt vor. Gerade im Bereich geringer Effekte weichen die Konzentrationen ab, da diese stark von der gewählten Konzentrationsabstufung im Test und von der statistischen Auswertung abhängen. Für diese Arbeit sollte eine einheitliche Datenbasis vorliegen.

Bei den in Titerplatten durchgeführten Algenwachstumstests kann es aufgrund des großen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses in den Kavitäten vor allem bei lipophilen Substanzen zu Unterschieden in der Toxizität kommen, je nachdem ob die Platten aus Kunststoff oder Glas sind. Gellert & Stommel [1999] zeigten signifikante Unterschiede zwischen EC -Werten, die mit Kunststoffplatten bzw. Glasplatten bestimmt wurden. Dies stellte sich besonders bei Stoffen, die schlecht wasserlöslich sind, wie z.B. 3,4-Dichlorphenol, heraus.

Diese Untersuchungen sollten zeigen, ob die biologischen Testverfahren ausreichend empfindlich sind, um auf die umweltrelevanten Konzentrationen der Leitsubstanzen zu reagieren.

5.1.7.1 EC_{10} -Wert als Sensitivitätsgrenze

Man findet in der Literatur verschiedene Bezeichnungen für die Konzentrationen im Bereich zwischen "kein messbarer" und "messbarer" Effekt. Verbreitet ist die "No observed effect concentration" (NOEC) bzw. die EC_0 als die höchste Konzentration, bei der kein statistisch signifikanter Effekt beobachtet werden kann [Heger *et al.*, 1998]. Der NOEC-Wert wird bei längerfristigen Tests, der EC_0 -Wert dagegen bei akuten Testverfahren berechnet. Je nach Konzentrationsabstufung bei den Testdurchführungen können hier jedoch verschiedene NOEC-Werte resultieren. In Zukunft werden deshalb regressionsbasierte Modelle vermehrt Anwendung finden. Je nach Variabilität des Testverfahrens können die Konzentrationen des NOEC's höher sein als die des EC_{10} -Wertes. So stellten Maux & Caux [1997] bei der

Auswertung von ca. 200 toxikologischen Datenreihen fest, dass etwa 77 % der daraus abgeleiteten NOEC-Werte und 100 % der daraus abgeleiteten LOEC-Werte höher als die entsprechenden EC_{10} -Werte liegen, die sich aus den am besten angepassten Modellen berechnen lassen.

Für die Bewertung der Empfindlichkeit wurden in dieser Arbeit die Konzentrationen herangezogen, die eine 10%ige Hemmung hervorrufen. Eine Berechnung der NOEC-Werte bzw. LOEC-Werte erschien an dieser Stelle nicht sinnvoll, da hierfür nicht genügend Daten im unteren Konzentrationsbereich vorlagen. Der EC_{10} -Wert wird im Rahmen dieser Arbeit als sinnvoller Parameter angesehen, um die Empfindlichkeitsschwelle der Proben im Biotest zu beschreiben. Die Ermittlung der EC_{10} -Werte für die Lösungsmittel und ebenso für die Leitsubstanzen erfolgte mittels linearer Regression, die auf probit-transformierten Prozentwerten basiert (s. Kap. 5.1.2.2). Bei der Probittransformation werden Hemmwerte unter 0,7 % und über 99,4 % nicht berücksichtigt [Weber, 1972]. Die Korrelation gilt mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % in Abhängigkeit von den zugrunde liegenden Daten nach einer Tabelle von Doerffel [1990] als gesichert.

5.1.7.2 Sensitivitätsgrenzen im Algenwachstumstest

Es wurden Dosis-Wirkungskurven für einige Leitanalyten für *C. reinhardtii* ermittelt. Die daraus berechneten EC_{10} -Werte sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt. Die Werte liegen im Bereich von EC-Werten anderer Arbeiten [Fairchild *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1997], die für die Alge *C. reinhardtii* bestimmt wurden. So sind die Pestizide aus der Gruppe der Triazine, Harnstoffderivate und das Bromacil erwartungsgemäß bereits im niedrigen $\mu\text{g/L}$ -Bereich toxisch. Die Anilide und auch der Atrazinmetabolit Desethylatrazin sind weniger toxisch gegenüber *C. reinhardtii*, ihre Sensitivitätsgrenzen liegen im höheren $\mu\text{g/L}$ - bzw. niedrigen mg/L -Bereich. Girling *et al.* [2000b] haben in einer größeren Studie mit mehreren Teilnehmern die Toxizität von 3,4-Dichloranilin gegenüber der Alge *C. reinhardtii* untersucht und einen EC_{50} -Wert von 9 mg/L bestimmt. Der in dieser Arbeit im Mikrotiterplattentest bestimmte Wert von 4.5 mg/L stimmt somit gut mit dem in der genannten Studie ermittelten Wert überein. Bei dieser Verbindung kommt erschwerend hinzu, dass es sich um eine leichtflüchtige Substanz handelt, bei der die Testbedingungen, d.h. ob offene oder geschlossene Behältnisse eingesetzt wurden, eine entscheidende Rolle spielen.

Tab. 5.3: EC₁₀-Werte [72 h] einiger Leitsubstanzen im Algenwachstumstest mit *C. reinhardtii*

Analyt	EC ₁₀
3,4-Dichloranilin	1,5 mg/L
Atrazin	12 µg/L
Bromacil	0,9 µg/L
Desethylatrazin	0,26 mg/L
Diuron	6 µg/L
Metolachlor	1,8 mg/L
Metazachlor	0,1 mg/L

Die im Anhang 8.5.3 dargestellten Dosis-Wirkungsbeziehungen von Bromacil, Atrazin und 3,4-Dichlorphenol zeigen, dass diese Verbindungen in einem Bereich von zwei Zehnerpotenzen einen Effekt zwischen 0 und 100 % verursachen, wogegen sich dieser Bereich bei Desethylatrazin über drei Zehnerpotenzen erstreckt. Es zeigt sich, dass der Atrazinmetabolit eine etwa 20 mal geringere Toxizität zeigt als Atrazin. Die breitere Dosis-Wirkungskurve dieser Verbindung ist möglicherweise ein Hinweis auf Detoxifizierungsprozesse in der Pflanze.

Für *S. capricornutum* ließen sich keine Dosis-Wirkungsbeziehungen aufstellen, was sich möglicherweise auf die niedrigen Wachstumsraten zurückführen lässt. Es zeigte sich bei der Untersuchung der Empfindlichkeit der Alge *S. capricornutum* gegenüber den Leitsubstanzen, dass viele der Verbindungen eine sehr flache Dosis-Wirkungskurve nach 92h aufwiesen. So kommt es, dass Diuron ebenso wie Atrazin erst bei 4 mg/L eine 50-prozentige Wachstumshemmung hervorrufen. Diese Tatsache mag damit zusammenhängen, dass das Wachstum für *S. capricornutum* zwar die erforderliche 16fache Vermehrung erreicht, die Wachstumsrate jedoch vergleichsweise gering ist. Verschiedene Autoren [Dodard *et al.*, 1999; Schrader *et al.*, 1997; Caux *et al.*, 1996] arbeiten unter vergleichbaren Bedingungen was Lichtverhältnisse, Temperatur, Hydrogencarbonatversorgung und Rotationsumdrehungen betrifft und erhalten unterschiedliche EC₅₀-Werte für Atrazin. Caux *et al.* [1996] z.B. ermittelt einen EC₅₀(96h)-Wert für Atrazin von 26 µg/L, dagegen liegt bei Schrader *et al.* [1997] der Wert über 200 µg/L gegenüber der Alge *S. capricornutum*. Beide Bestimmungen wurden in Titerplatten durchgeführt. Der EC₅₀-Wert von Atrazin in Flaschen beträgt 276 µg/L, wie Christensen *et al.* [2001] berichten, die NEC-Konzentration 50 µg/L.

Ein weiterer Grund für die Erniedrigung der Toxizität wird von Cleuvers & Ratte [1999] diskutiert. Sie zeigen, dass die Toxizität von Kaliumdichromat gegenüber der genannten Alge mit abnehmender Photonenflussdichte schwächer wird, woraus ein geringeres Wachstum resultiert. So liegt der EC_{50} -Wert bei einer Lichtintensität von $60 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bei 1 mg/L und bei $140 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bei etwa $0,7 \text{ mg/L}$. Der Unterschied wird bei dieser Arbeit zwar nicht so deutlich, jedoch kann dieser Effekt bei Verbindungen mit verschiedenen Aufnahme- und Wirkmechanismen unterschiedlich ausgeprägt sein. Chromat gehört z.B. zu den membrantoxischen Substanzen. So erreicht es seinen Wirkort schneller als Fremdstoffe, die zunächst die Membran passieren müssen. Das verlangsamte Wachstum kann auch Auswirkungen auf die Aufnahmegeschwindigkeit haben. Bei einer Untersuchung zur Toxizität von Phenanthren gegenüber *S. capricornutum* bei unterschiedlichen Wachstumsraten, bedingt durch Variation der CO_2 -Versorgung, zeigte diese Verbindung eine bis zu 10fach höhere Toxizität bei hohen Wachstumsraten [Halling-Sørensen *et al.*, 1996]. Lipophile Verbindungen können neben ihrer bekannten narkotischen Toxizität auch im Inneren der Zelle ihre Wirkung entfalten, wie eine Untersuchung von Hexachlorbenzol zeigt, dessen Lipophilie mit der von Phenanthren vergleichbar ist. In Versuchen mit *S. capricornutum* führten die getesteten Konzentrationen zu einer deutlichen Abnahme der Glucose-6-Phosphat-Aktivität in den Algenzellen [Kong *et al.*, 1998]. Auf eine Besonderheit der Zellwand von *S. capricornutum* weist [El Jay, 1996] in einer Arbeit hin. Die Extraktion der Pigmente dieser Alge ist schwieriger durchführbar als bei *Chlorella vulgaris*, was der Autor auf eine besonders gegenüber Lösungsmittel resistente Zellwand zurückführt. Diese Eigenschaft beeinflusst möglicherweise auch die hier festgestellten Beobachtungen.

Der Lösungsmiteleinfluss im Algenwachstumshemmtest wurde durch mitgeführte Leerwerte der Methode überprüft (s. Kap. 5.1.6.2). Die untersuchten Leerwerte zeigten keinen Effekt im Algenwachstumstest. St.-Laurent *et al.* [1992] haben eine "no-observed-effect" Konzentration (NOEC) für Methanol im Titerplattentest mit *S. capricornutum* mit $0,95 \%$ ermittelt. Dieser NOEC-Wert lässt sich mit den in dieser Arbeit festgestellten nicht vorhandenen Effekten der Leerwerte in Einklang bringen. Die Leerwerte enthalten eine Methanolkonzentration von 1% .

5.1.7.3 Sensitivitätsgrenzen im MicrotoxTM-Test

Ein Vergleich der Sensitivitätsgrenzen wurde auch hier anhand der EC_{10} -Werte durchgeführt. Die EC_{10} -Werte wurden mittels der sogenannten Γ -Funktion berechnet (s. Kap. 5.1.3.2).

Lösungsmittel

In Tab. 5.4 sind die EC₁₀- und EC₅₀-Werte von sieben Lösungsmitteln aufgeführt. Für die meisten der getesteten Lösungsmittel nimmt die Toxizität mit der Zeit eher ab oder bleibt gleich, ausgenommen Dimethylsulfoxid. Die deutliche Toxizitätsabnahme von Dimethylsulfoxid (DMSO) nach 10 min könnte damit zusammenhängen, dass hier eine metabolische Entgiftung stattfindet. Für die übrigen Lösungsmittel zeigt sich dagegen keine solche zeitabhängige Toxizität, was darauf hinweist, dass eine Schädigung vorliegt, die sich mit der Zeit weder verstärkt noch von den Stoffwechselprozessen wieder aufgehoben werden kann. Die in den Festphasenextrakten vorliegende Konzentration an Methanol beträgt 1 % und liegt somit unterhalb des EC₁₀-Wertes für Methanol nach 15 min.

Tab. 5.4: EC₁₀-Werte [Vol. %] organischer Lösungsmittel im Microtox™-Test

Substanz	EC ₁₀		EC ₅₀		Polarität* (gegenüber Al ₂ O ₃)
	5 min	15 min	5 min	15 min	
Methanol	1,4	1,2	4,0	3,8	0,95
Isopropanol	1,9	1,7	3,3	3,0	0,82
Acetonitril	1,4	1,4	2,5	2,5	0,65
Dimethylsulfoxid	0,6	0,7	3,8	5,4	0,62
Dioxan	0,07	0,08	0,36	0,32	0,56
Tetrahydrofuran	0,1	0,1	0,5	0,4	0,45

Quelle: Meyer, 1987

Bei einer Auftragung der EC₁₀ und EC₅₀-Werte der Lösungsmittel gegen die jeweilige Polarität (E°: Elutionskraft bei Al₂O₃) zeigt sich, dass hier ein gewisser Zusammenhang besteht (Abb. 5.13). Je unpolarer das Lösungsmittel (E° niedrig) ist, desto toxischer ist die Substanz. Lösungsmittel haben vor allem narkotische Wirkung, d.h. sie verändern die Membranstruktur. Dies drückt sich auch in der Korrelation zwischen Polarität und EC-Werten aus. Hingegen ist Dioxan toxischer als seine Polarität es erwarten lässt. Hier sind neben der narkotischen Wirkung noch andere Mechanismen denkbar. Auch Dimethylsulfoxid nimmt eine Sonderstellung ein, da es wider Erwarten weniger toxisch ist als seine Polarität es vermuten lässt. Diese Tatsache lässt sich, wie bereits oben erwähnt, auf mögliche Detoxifizierungsprozesse zurückführen, wie z.B. die Hydroxylierung der Phase I-Reaktionen oder die Glucuronidierung der Phase II-Reaktionen der Biotransformationsreaktionen. Sie führen beide zu einer Erhöhung der Polarität des Moleküls.

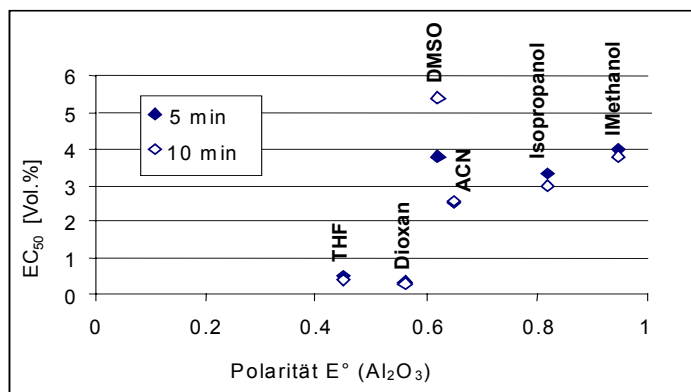


Abb. 5.13: Microtox EC₅₀-Werte der Lösungsmittel aufgetragen gegen die Polarität (E°)

Leitsubstanzen

Bei der Ermittlung der EC-Werte von Pestiziden im MicrotoxTM-Test hat sich gezeigt, dass die ausgewählten Substanzen, vor allem Herbizide, infolge ihrer sehr speziellen Wirkmechanismen, die in Photosyntheseprozesse eingreifen, deutlich weniger toxisch auf bakterielle Stoffwechselprozesse wirken. So ist z.B. Atrazin gegenüber Leuchtbakterien erst im mg/L-Bereich, im Algentest dagegen bereits im µg/L-Bereich wirksam. Hier wird erneut deutlich, welche Wichtigkeit der Einsatz mehrerer Biotests aus verschiedenen trophischen Ebenen hat, um alle möglichen Effekte zu erfassen. In Tab. 5.5 sind die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Effektkonzentrationen verschiedener Leitsubstanzen aufgeführt.

Tab. 5.5: EC-Werte [mg/L] von Herbiziden im MicrotoxTM-Test

Substanz	EC ₁₀		EC ₅₀	
	5 min	15 min	5 min	15 min
Metolachlor	46	40	100	94
3,4-Dichloranilin	0.09	0.3	1.1	1.8
3-Chlor-4-methylanilin	0.02	0.04	0.5	0.66
MCPA	4.7	3.9	24	26
2,4-D	6.5	6.7	24	24
Monochloressigsäure	2.1	3.3	7.3	30
Trifluoressigsäure	4.5	5.5	9.8	13

Von den getesteten Leitsubstanzen zeigen die Anilinderivate die höchste Toxizität gegenüber den Leuchtbakterien. In Tab. 5.6 sind EC-Werte von Leitsubstanzen aus der Literatur aufgeführt, die nicht im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden. Dabei fällt auf, dass das Phenolderivat die höchste Toxizität aufweist, vergleichbar mit derjenigen des 3,4-Dichloranilins.

Tab. 5.6: Literatur EC₅₀-Werte [mg/L] von Pestiziden im MicrotoxTM-Test

Substanz	5 min	15 min	30 min
Atrazin ¹	-	-	36 (13*)
Desethylatrazin ¹	-	-	300 (16*)
3,4,5-Trichlorphenol ²	0,44	0,38	0,36
Diuron ²	16,5	-	-
Bromacil ²	6,7	-	-
3,4-Dichloranilin ²	0,45	0,56	0,64
2,4-Dinitrophenol ²	6,1 / 15,7	-	-

Quelle: ¹Kaune, 1997, ²Kaiser & Ribo; * EC₁₀-Wert

5.1.7.4 Sensitivitätsgrenzen im Chlorophyllfluoreszenztest

Zur Auswertung der Chlorophyll-[a]-Fluoreszenz wurden die in Tab. 5.2 aufgeführten Parameter herangezogen, da ihre Reproduzierbarkeit am höchsten ist (kleiner Variationskoeffizient) und sie somit die verlässlichsten Sensitivitätsgrenzen zulassen. Die Sauerstoffrate, die sich als sehr empfindlicher Parameter für einige der getesteten Stoffe erweist, zeigte allerdings größere Schwankungen auf als die ausgewerteten Parameter der Fluoreszenzmessung. Diese Schwankungen wurden auch in anderen Arbeiten festgestellt [Brack, 1996; Haas, 1999]. Für die Messparameter, MWSVn und q_{NP}, die den Protonengradienten an der Thylakoidmembran beschreiben, konnten keine Korrelationen mittels Probit-Transformation aufgestellt werden. In den Tabellen sind jeweils die Werte der empfindlichsten Messparameter hervorgehoben.

Lösungsmittel

In Tab. 5.7 sind vier Fluoreszenzparameter und die entsprechenden EC₁₀-Werte gegenübergestellt. Es zeigt sich, dass die Messparameter der schnellen Fluoreszenz am empfindlichsten eine Veränderung im Photosynthesystem anzeigen. Dies stellte sich auch bei den EC₁₀-Werten einiger Herbizide und deren Metaboliten heraus (s. Tab. 5.8). Der gemessene EC₁₀-Wert für Methanol entspricht in etwa der toxischen Schwellenkonzentration von 2,9 %, die von Schmidt [1985] für den Algenfluoreszenztest zur kontinuierlichen Überwachung von Oberflächengewässern bestimmt wurde.

Tab. 5.7: EC₁₀-Werte der Lösungsmittel im Algenfluoreszenztest [Vol. %]

Substanz	F _v /F _m	I ₅₀	I _{ges}	Delta F/F _m	Sauerstoff	Polarität ¹ E° (Al ₂ O ₃)
Acetonitril	1,7 (1,5-2,1)	0,7 (0,5-1,0)	1,2 (0,7-1,4)	1,5 (1,4-1,5)	0.6 (0,5-0,7)	0,65
Methanol	6,8 (5,8-7,9)	1,7 (1-2,8)	1,4 (0,8-2,6)	4,3 (3,5-5,5)	n.b.	0,95
iso-Propanol	1,7 (1,2-2,4)	0,9 (0,8-1,2)	1,1 (0,9-1,4)	2,0 (1,5-2,5)	n.b.	0,82
Dioxan	2,7 (2,2-3,3)	1,1 (0,9-1,2)	1,5 (1,0-3,9)	1,7 (1,3-1,9)	n.b.	0,45
Dimethylsulfoxid	2,9 (2,2-3,4)	1,6 (0,73-2,3)	1,3 (0,7-1,8)	3,0 (2,5-3,4)	n.b.	0,62
Tetrahydrofuran	0,43 (0,34-0,52)	0,02 (10 ⁻⁴ -0,09)	0,03 (0,003-0,1)	0,46 (0,39-0,53)	0,54 (0,39-0,69)	0,45

¹Quelle: Meyer, 1987

Die Werte der langsamen Fluoreszenz liegen bis zu 20fach höher als die der schnellen Fluoreszenz wie im Falle des Tetrahydrofurans. Bei der schnellen Fluoreszenz ist der Anstieg der Fluoreszenz auf eine Blockierung der Akzeptormoleküle zu Beginn des photosynthetischen Prozesses zurückzuführen. Die Toxizität der Lösungsmittel beruht im wesentlichen auf ihrer narkotischen Wirkung, welche zunimmt je lipophiler bzw. je unpolarer ein Stoff ist. Diese führt zu einer reversiblen Veränderung der Membranstruktur, die somit auch den Ablauf des photosynthetischen Elektronentransports, bei dem die Lage der Moleküle eine wichtige Rolle spielt [Nultsch, 2001], beeinträchtigen kann.

In Abb. 5.14 wurde die Polarität eines Lösungsmittel mit dem EC₁₀-Wert des Parameters F_v/F_m korreliert. Für das jeweils unpolarste Lösungsmittel dieser Reihe Tetrahydrofuran bzw. das polarste Lösungsmittel Methanol scheint folgende Abhängigkeit gegeben zu sein: Tetrahydrofuran ist das Lösungsmittel mit der höchsten toxischen Wirkung, Methanol das Lösungsmittel mit der geringsten Toxizität. Auch für die anderen getesteten Lösungsmittel scheint dies zu gelten, mit Ausnahme von Acetonitril und iso-Propanol, die toxischer sind als ihre Polarität es erwarten lässt. Bei diesen Verbindungen sind weitere Wirkungen wahrscheinlich, die die narkotische Wirkung noch verstärken. Es können z.B. toxischere Begleitstoffe gebildet werden, wie im Falle von Acetonitril, dessen Hauptwirkung auf die Freisetzung von Blausäure im Organismus zurückgeführt wird [Kühn – Birett, 2002]. Cyanid hemmt den Elektronentransport der oxidativen Phosphorylierung [Fent, 1998].

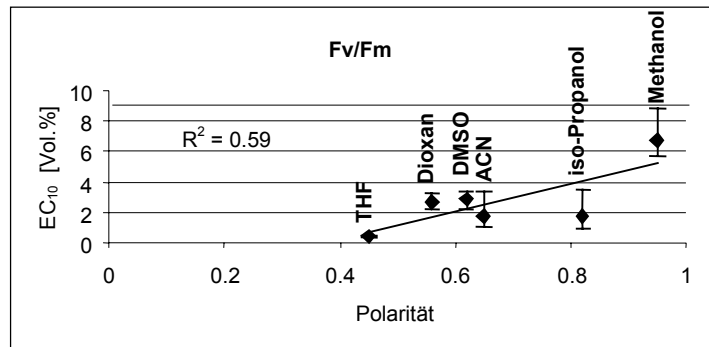


Abb. 5.14: Korrelation zwischen Polarität und dem EC₁₀-Wert des Fluoreszenzparameters F_v/F_m der Lösungsmittel

Leitsubstanzen

Auch hier zeigt sich wie bereits bei den Lösungsmitteln, dass die empfindlichsten Parameter aus der schnellen Fluoreszenz resultieren (Tab. 5.8). Erwartungsgemäß sind Triazine und Harnstoffderivate diejenigen Verbindungen, die die höchste Toxizität und somit den niedrigsten EC₁₀-Wert aufweisen. Das ist eine unmittelbare Folge ihrer Fähigkeit, das D1-Protein im Akzeptorkomplex Q_A zu verdrängen und damit den Elektronentransport bereits am Anfang zu blockieren.

Tab. 5.8: EC₁₀-Werte [µg/L] der Leitsubstanzen im Algenfluoreszenztest

Substanz	Fv/Fm	I ₅₀	I _{ges}	Delta F/F _m	Sauerstoff
Atrazin	2,2 (0,6-6,8)	0,3	0,02	4,5 (2,4-7,4)	0,6 (0,5-0,7)
Diuron	5,0 (4,6-6,0)	3,3 (2,3-4,6)	1,0 (0,4-2,1)	6,3 (5,5-7,0)	-
Bromacil	< 128	< 128	< 128	< 128	< 128
Isoproturon ¹	8,2 (6,2-12,4)	-	-	6,2 (4,1-10,3)	41 (2,1-623)
Metolachlor	59 400 (48 700- 69 780)	-	-	41 400 (32 780- 52 300)	39 400 (25 000 54 300)
2,4-Dinitrophenol	> 10 000	> 10 000	> 10 000	> 10 000	> 10 000
3,4-Dichloranilin	32 300 (27 600- 36 890)	13 100 (6 310-19 560)	10 900 (5 370-17 230)	31 400 (28 600-33 700)	29 700 (14 300- 43 400)
3-Chlor-4-methylanilin	42 800 (33 400- 57 800)	22 600 (16 400- 31 600)	20 000 (16 380 - 24 040)	21 600 (13 890- 31 620)	-
MCPA	> 30 000	> 30 000	> 30 000	> 30 000	> 30 000
2,4-D	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000	> 100 000
Trifluoressigsäure	141 000	-	-	-	-

In Klammern das 95%-Konfidenzintervall, *Quelle:* ¹ Haas, 1999

Schmidt [1985] hat für die Alge *Scenedesmus suspicatus* eine toxische Grenzwertkonzentration für Atrazin mit 33 µg/L bestimmt; für das Herbizid 2,4-D liegt diese bei 12 mg/L. Ein Vergleich mit den Messungen dieser Arbeit zeigt, dass *C. reinhardtii* im Fall von Atrazin bis zu 100fach empfindlicher und im Falle von 2,4-D sehr viel unempfindlicher reagiert.

Im akuten Test zeigt 3,4-Dichloranilin dagegen einen hohen EC₁₀-Wert von 10 mg/L. Im chronischen Algenwachstumstest ist 3,4-Dichloranilin deutlich toxischer mit einem EC₁₀-Wert von etwa 1 mg/L. Auch Crossland [1990] stellt im Vergleich zu den akuten Tests eine bis zu 100fach höhere Toxizität bei einigen Spezies fest. Eine hohe Empfindlichkeit gegenüber 3,4-Dichloranilin weist *Daphnia magna* im Reproduktions-Test auf; der NOEC beträgt hier 6,5 µg/L.

5.1.7.5 Effekte von Leitsubstanzmischungen im Algenwachstumstest

Es wurde eine Dosis-Wirkungskurve von Leitsubstanzmischungen aufgestellt, die mittels SPE-Festphasenextraktion aufgearbeitet wurden. Die Konzentrationen der einzelnen Analyten in den Testlösungen liegen zwischen 1 - 100 µg/L je Leitsubstanz. In den Lösungen sind Atrazin, Desethylatrazin, Diuron, Isoproturon, Bromacil, Metolachlor und Metazachlor enthalten. Abb. 5.15 zeigt die Dosis-Wirkungskurve für *C. reinhardtii* nach 72 Stunden. Daraus wurde ein EC₅₀-Wert von 7 µg/L bzw. ein EC₁₀ von 1 µg/L berechnet. Diese EC-Werte beziehen sich auf eine Substanz, vorausgesetzt alle diese Verbindungen sind in der Lösung enthalten, und jede dieser Verbindung würde die gleiche Toxizität aufweisen. Da die Eluate 100fach aufkonzentrierte Proben darstellen, entspricht der EC₁₀-Wert Konzentrationen von jeweils 10 ng/L in der natürlichen Probe. Der EC₁₀-Wert würde sich entsprechend erhöhen, wenn nicht alle der genannten Leitsubstanzen vorliegen würden. Grimme *et al.* [1998] haben gezeigt, dass bei Mischungen von Substanzen, deren jeweilige Konzentration deutlich unter dem Effektlevelevel liegt, Effekte im Algenwachstumstest und MicrotoxTM nachweisbar sind. Somit ist die Ermittlung des gesamten Effektes der Probe von großer Bedeutung, da nur dadurch die Gesamtbelastung der gesamten Probe erfassbar ist.

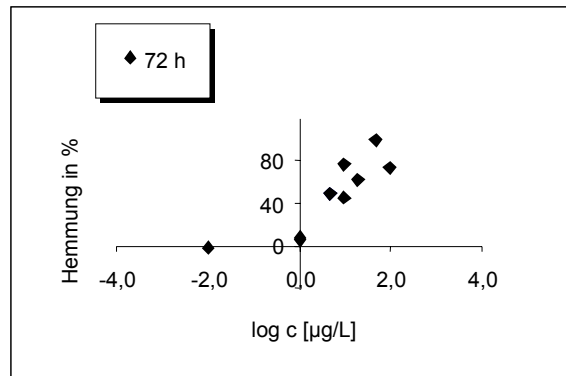


Abb. 5.15: Effekte von Standardmischungen im Algenwachstumstest mit *C. reinhardtii* nach 72h

Diese Dosis-Wirkungskurve macht deutlich, dass beim Vorhandensein mehrerer Herbizide im umweltrelevanten ng/L-Bereich bereits bei einer 100fach höheren Konzentration mit Effekten gegenüber Algen zu rechnen ist. Als Vergleich ist hier anzuführen, dass bei der Risikoabschätzung von Verbindungen zur Ermittlung eines PNEC-Wertes ein Faktor von 1000 einbezogen wird, wenn außer einem EC_{50} -Wert eines akuten Biotests kein weiterer Biotestwert vorliegt.

5.1.8 Vergleich von Wasserextrakten verschiedener Sorbentien

Anhand einer Abwasserprobe und einer Flusswasserprobe sollte festgestellt werden, ob Eluate verschiedener Sorbentien für mittelpolare bis polare Verbindungen zu signifikant unterschiedlichen Effekten im Biotest führen. Dies würde auf unterschiedliche Extraktion verschieden wirksamer Verbindungen im mittelpolaren und polaren Bereich hindeuten. Zum einen wurde eine Polymerphase getestet, die in der Regel zur Anreicherung von Stoffen aus dem genannten Bereich verwendet wird. Als weiteres Material, das ebenfalls zur Anreicherung polarer Substanzklassen und anderer saurer, neutraler und basischer Pestizide eingesetzt [Slobodnik *et al.*, 1996] wird, wurde graphitierte Kohle gewählt. Darüber hinaus wurden zwei auf Kieselgel basierende Sorbentien mit Butyl- (C4) oder Phenylliganden (PH) ausgewählt, die zwar üblicherweise zur Extraktion von unpolaren Verbindungen verwendet werden, jedoch auch für mittelpolare Substanzen geeignet sind. Die Extrakte wurden im Algenwachstumstest, im Microtox-Test und im Algenfluoreszenztest untersucht. Eine Darstellung der ermittelten Effekte findet sich in Abb. 5.16 bis Abb. 5.18. Als Vergleich sind zudem die Effekte der Leerwerte aufgeführt.

Im MicrotoxTM-Test zeigt sich, dass die Abwasserextrakte aller Festphasen gleich hohe Effekte hervorrufen. Ohne eine weitere Fraktionierung der Extrakte lässt sich daraus nur ableiten, dass sich die extrahierten Stoffgruppen in ihrer biologischen Wirksamkeit nicht

signifikant unterscheiden. Es kann allerdings auch ein Hinweis darauf sein, dass ähnliche Verbindungen extrahiert werden, die im Microtox™-Test eine Wirkung erzielen.

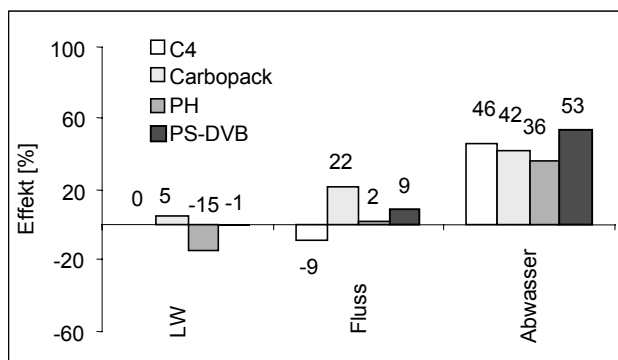


Abb. 5.16: Vergleich der Effekte von Extrakten im Microtox™-Test (45 fach) verschiedener Sorbentien

Die Flusswasserextrakte zeigen erwartungsgemäß deutlich geringere Effekte, wobei bei drei Sorbentien keine signifikanten Effekte festzustellen sind. Allein die graphitierte Kohle weist einen signifikanten Effekt von 22 % auf. Hier sind offensichtlich wirksame mittelpolare bis polare Verbindungen extrahiert worden, da der Leerwert keine Hemmung aufweist.

Im Algenwachstumstest mit *C. reinhardtii* (Abb. 5.17) treten bei keinem der vier Flusswasserextrakte signifikante Effekte auf, jedoch ergeben sich Unterschiede bei den Abwasserextrakten. Die Polystyrol-Phase und die C4-Phase führen zu signifikanten Effekten, wogegen es bei der graphitierten Kohle und der Phenylphase zu keiner Anreicherung von algentoxischen Verbindungen gekommen ist. Da es sich um zwei Phasen handelt, die Verbindungen mit unterschiedlichen Eigenschaften extrahieren, lässt sich hier keine Eingrenzung der Stoffgruppe, die den Effekt verursacht, vornehmen. Insgesamt ist der Algenwachstumstest gegenüber den extrahierten Verbindungen somit unempfindlicher.

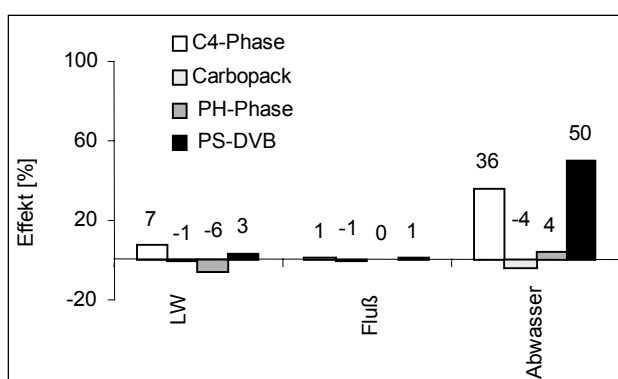


Abb. 5.17: Vergleich der Effekte von Flusswasser- und Abwasser-Extrakten (50 fach) verschiedener Sorbentien im Algentest mit *C. reinhardtii*

Mit der Untersuchung der akuten Wirkung der Schadstoffe auf die Chlorophyll[a]fluoreszenz der Algen sollte überprüft werden, ob sich ein vergleichbares Bild wie im chronischen Test

ergibt (s. Abb. 5.18). In den Flusswasserextrakten der Butylphase und des Polymers werden die höchsten Effekte gegenüber der langsamen (F_v/F_m) und schnellen (I_{50}/I_{ges})-Fluoreszenz festgestellt. Der Endpunkt der Sauerstoffproduktion reagiert dagegen wesentlich weniger empfindlich auf die angereicherten Verbindungen.

Die Flusswasserextrakte zeigen gegenüber den Parametern der Fluoreszenz im Falle der Butyl- und der PS-DVB-Phase die deutlichsten Effekte. Auch hier sind die Inhaltsstoffe des Abwassers wesentlich toxischer als diejenigen des Flusswassers. Wie bereits im chronischen Algentest festgestellt, sind die Extrakte der Butylphase und der PS-DVB-Phase toxischer als die anderen beiden Phasen, jedoch ist dies nicht so ausgeprägt. Auch die Sauerstoffproduktion wird durch die Extrakte deutlich gehemmt, mit Ausnahme des Extrakts der Carbopack-Phase. Beide Algentests zeigen, dass durch die Carbopack-Phase der geringste Anteil an effektauslösenden Substanzen extrahiert wird.

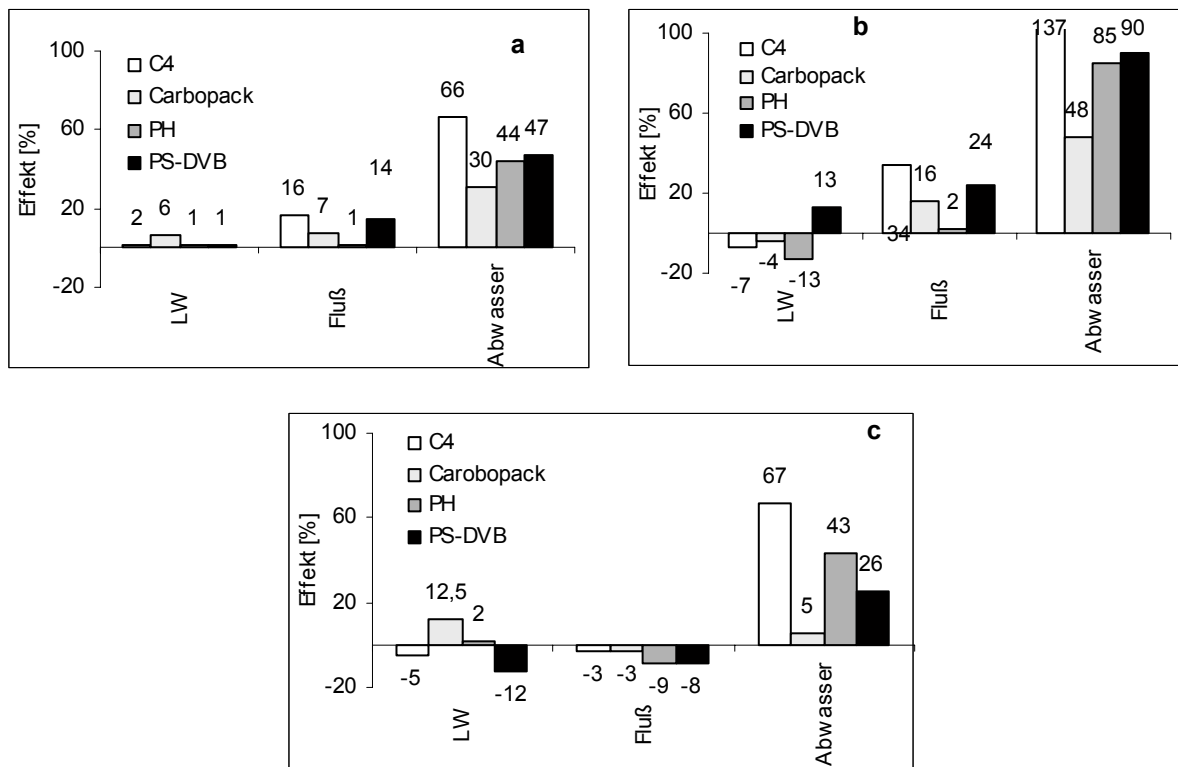


Abb. 5.18: Vergleich der Effekte von Flusswasser- und Abwasser-Extrakten (100fach) verschiedener Sorbentien im Algenfluoreszenztest mit *C. reinhardtii*; **a** - F_v/F_m , **b** - I_{50}/I_{ges} , **c** - Sauerstoff

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die Organismen mit ihren verschiedenen Endpunkten unterschiedlich empfindlich auf die extrahierten Stoffe reagieren. Dabei zeigt das mit dem Polymer-Material gewonnene Extrakt im Schnitt gegenüber allen drei Testarten die höchsten Effekte.

Für die weitere Untersuchung wurde das Polymermaterial als Anreicherungssorbens gewählt. Zum einen besitzt es im Vergleich zu den Kieselgelmaterialien eine hohe Extraktionskapazität, zum anderen extrahiert es effektiv wirksame Verbindungen, wie aus den Ergebnissen ersichtlich ist.

5.1.9 Effekt von natürlichen Inhaltsstoffen wie Huminstoffe im Biotest

Es ist bekannt, dass Huminsäuren aufgrund ihrer chemischen Struktur verschiedene Einflüsse auf Organismen haben können [Beimborn *et al.*, 1998]. So fand Wells [1993] heraus, dass die Kupfertoxizität gegenüber *Pimephales promelas* mit zunehmenden DOC-Anteil - bereits ab einer Konzentration von 1 mg/L - abnimmt. Auch kann es zu einer Wechselwirkung zwischen organischen Fremdstoffen wie Pestiziden und zwischen Huminstoffen kommen [Franco *et al.*, 2001; Senesi & Testini, 1984]. Dies kann zu einer Veränderung der Bioverfügbarkeit der Pestizide führen, womit eine Verstärkung aber auch eine Abschwächung der Fremdstoffwirkung [Steinberg *et al.*, 1997] verbunden sein kann. Eine Verstärkung des Effekts hat Stewart [1987] bei der Wachstumshemmung von *S. capricornutum* durch Anilinderivate in Gegenwart von Fulvosäuren festgestellt. Dagegen stellten Lee *et al.* [1993] zum Teil eine Abnahme der Hemmung durch organische Schadstoffe in Gegenwart von organischem Material fest.

5.1.9.1 Effekte durch Huminstoffe

Zunächst sollte untersucht werden, welchen Einfluss allein Huminstoffe auf die Testorganismen haben. Dazu wurde eine künstliche Matrix mit pulverisierten Huminstoffen hergestellt. Die angesetzte Lösung enthielt 10 mg/L Huminstoffe und wurde sowohl neutral als auch sauer extrahiert. Hierbei ist zu erwähnen, dass das saure Eluat infolge des Vorhandenseins von Fulvosäuren eine starke Gelbfärbung aufwies. Gegenüber dem Algenwachstum zeigte der neutrale Extrakt weder auf *C. reinhardtii* noch auf *S. capricornutum* eine inhibierende Wirkung. Die saure Extraktion führte jedoch zu einem deutlichen Effekt von 15 % bzw. 17 % bei beiden Algenarten. Im MicrotoxTM-Test kam es zwar beim neutralen Extrakt zu keiner Leuchthemmung, jedoch verursachte das saure Eluat eine 100%ige Hemmung des Leuchtens. Da die gelb gefärbten Fulvosäuren selbst sichtbares Licht absorbieren, kommt es dadurch zu einer Lumineszenzunterdrückung (s. auch Kap. 5.2.2.3).

Zudem wurde eine Lösung mit Huminstoffen ohne SPE-Extraktion in Konzentrationen zwischen 4 und 450 mg/L getestet. Die höchste Konzentration ergab Hemmungen von etwa

70 %. Diese Konzentration an Huminstoffen entspricht in etwa derjenigen im getesteten Eluat.

5.1.9.2 Einfluss von Huminsäuren auf die Wirkung von Schadstoffen in den Biotests

Wie bereits erwähnt, können Huminstoffe einen verstärkenden bzw. schwächenden Einfluss auf den Effekt von Fremdstoffen haben, verursacht z.B. auch durch Adsorption. Inwieweit diese Eigenschaften der extrahierten Huminsäurefraktion durch den Aufkonzentrierungsschritt gegenüber den Leitsubstanzen (s. Kap. 4.1) an Einfluss gewinnen, sollte durch verschiedene nachgestellte Proben überprüft werden. Hierzu wurden eine künstliche Huminstofflösung und bidestilliertes Wasser mit je 0,1 µg/L der Pestizidstandardmischung dotiert. Diese Proben wurden mittels Festphasenextraktion sowohl neutral als auch sauer angereichert und anschließend auf Effekte in beiden Biotests untersucht.

Ein Vergleich der Effekte von dotierten Huminsäurelösungen und bidestilliertem Wasser ergab gegenüber beiden Algenarten keinen Unterschied. EC_{50} -Werte, die aus zwei aufgearbeiteten Kalibriergeraden von Leitsubstanzen mit Matrix und ohne Matrix ermittelt wurden, zeigten für den Algentest ebenfalls keine Unterschiede (s. Kap. 5.1.7.5). Diese Beobachtung wurde auch durch die vermessenen Qualitätskontrollen, die aus dotierten Flusswasserextrakten bestanden, bestätigt. Die hier getesteten Huminsäurefraktionen haben keinen Einfluss auf die Wirkung der Leitsubstanzen beim Algenwachstum.

5.1.9.3 Einfluss der Abwassermatrix auf die Algenfluoreszenz in Gegenwart von Herbiziden

Um den Einfluss einer aufkonzentrierten Abwasserprobe auf die Wirkung der Leitsubstanzen im Algenfluoreszenztest abzuschätzen, wurde ein Festphasenextrakt einer mit Leitanalyten dotierten Abwasserprobe und einem wässrigen Standard gleicher Analytkonzentration verglichen. Bei der Abwasserprobe handelt es sich um den Zulauf einer Kläranlage. Die EC_{50} -Werte für verschiedene Parameter der Algenfluoreszenz (s. Kap. 5.1.4) sind Abb. 5.19 zu entnehmen. Angegeben sind die jeweiligen Volumenprozent der Standardlösung in der Testlösung. Ein Volumenprozent entspricht einer Konzentration von 10 µg/L je Leitsubstanz bzw. einer 5fach aufkonzentrierten Abwasserprobe.

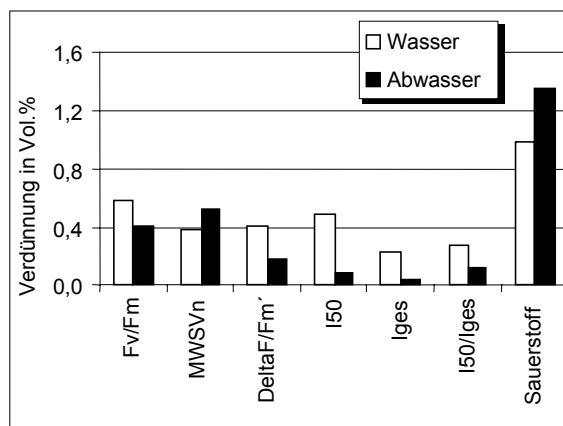


Abb. 5.19: EC₅₀-Werte [Vol. %] eines Gemisches von Leitsubstanzen (ca. 1 mg/L) in Wasser und aufkonzentrierter Abwassermatrix (500fach)

Aus der Darstellung wird ersichtlich, dass die Abwassermatrix auf die schnelle Fluoreszenz (I_{50} , I_{ges} , I_{50}/I_{ges}) einen starken Effekt ausübt, der bereits bei einer 0,5fachen Aufkonzentrierung des Abwassers zu einer 50%igen Hemmung führt. Ebenso zeigt der Parameter für das photochemische Quenching ($\Delta F/F_m$), dass es durch das dotierte Abwassereluat zu einer stärkeren Hemmung kommt als durch das Leitsubstanzengemisch. Dies dürfte das Resultat von Abwassersinhaltsstoffen sein, die den Elektronentransport inhibieren. Hingegen werden die beiden Parameter F_v/F_m (allgemeiner physiologischer Zustand) und $MWSV_N$ (nicht-photochemisches Quenching) im wesentlichen durch die Einwirkung der Leitsubstanzen beeinflusst. Das nicht-photochemische Quenching wird besonders durch phenolische Verbindungen, die als Entkoppler wirken und dadurch den Protonengradienten abbauen, beeinflusst [Brack, 1996]. Die höheren EC₅₀-Wertes lassen den Schluss zu, dass es durch die Abwasserkomponenten zu einer teilweisen Maskierung der Leitsubstanzen kommt, und dies zu einer Schwächung der entkoppelnden Wirkung führt. Schmidt [1985] konnte ebenfalls zeigen, dass die Toxizität verschiedener Phenole und Anilin in Gegenwart von gelöstem organischen Material abnimmt. Diese Tatsachen lassen keinen Schluss auf das Vorhandensein von phenolischen Verbindungen im Abwasser zu. Die Unterschiede der EC₅₀-Werte für Sauerstoff sind auf die Schwankung dieses Parameters zurückzuführen.

Der Vergleich von dotiertem Abwasser und wässriger Leitsubstanzlösung zeigt, dass die Abwassermatrix sowohl eine verstärkende als auch eine abschwächende Wirkung auf die jeweiligen Fluoreszenzparameter hat. Auch Brack *et al.* [1998] hat anhand von Sickerwässern demonstriert, dass je nach ihrer Zusammensetzung die Parameter der Algenfluoreszenz unterschiedlich beeinflusst werden.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Ökotoxikologisches Flusswassermonitoring in der Fränkischen Schweiz

Während eines Jahres wurden drei Fließgewässer der Fränkischen Schweiz mehrmals an sechs Stellen beprobt. Aus den Wasserproben wurde eine neutrale und eine saure Fraktion extrahiert. Durch Aufkonzentrierung der Flusswasserproben sollte gezeigt werden, ob Schadstoffe in subletalen Konzentrationen vorliegen. Die Fraktionen wurden als 45faches bzw. 100faches Konzentrat auf ihre Toxizität gegenüber Algen und Bakterien getestet. Im Monat Juni wurde jedoch nur die neutrale Fraktion der Proben extrahiert. Die nachfolgend aufgeführten Effekte im Algenwachstumstest stellen Mittelwerte aus sechs Bestimmungen dar. In den Diagrammen vom MicrotoxTM-Test sind die Maximal- und Minimalwerte aus zwei Bestimmungen angegeben. Die Schwankungen sind kleiner als 10 %. Die genauen Probenahmezeiten sind im Anhang 8.2 aufgeführt. In den Abbildungen werden stellvertretend für die Jahreszeiten die Monate Juli (Sommer 2000), November (Herbst 2000), Januar (Winter 2001) und April (Frühling 2001) eingetragen.

5.2.1.1 Effekte von Flusswasser ohne Anreicherung im Biotest

Es wurden stichprobenartig einige Wasserproben direkt auf ihre Effekte im Algenwachstumstest und im MicrotoxTM-Test überprüft. In beiden Tests kam es zu keinen signifikanten Effekten. Damit bestätigte sich, dass in diesen Fließgewässern in der Regel keine Verbindungen in toxischen Konzentrationen vorliegen. Dies war auch aufgrund der Einstufung der Gewässer von gering bis mäßig belastet zu erwarten. In den nachfolgenden Abbildungen sind die Proben von Juli 2000 bis April 2001 sukzessive dargestellt.

5.2.1.2 Die Aufseß

Die Aufseßquelle

Die Quelle der Aufseß befindet sich am westlichen Rande des Dorfes Königfeld. In den letzten Jahren wurden dort zum Teil Atrazingehalte bis zu 0.4 µg/L gefunden. Der Median der Messungen im Zeitraum von 1994-1999 beträgt 0.19 µg/L [Pongratz, 2000]. Das bedeutet, dass in den getesteten Extrakten die Atrazinkonzentration bereits toxische Schwellenwerte in den Algenwachstumstests erreichen können. Während des Beobachtungszeitraumes von Juli 2000 bis April 2001 wurden jedoch überwiegend keine Effekte festgestellt (s. Abb. 5.20).

Sowohl die saure als auch die neutrale Fraktion, die durch die Festphasenextraktion gewonnen wurden, zeigen dabei bei keiner der beiden Algenarten auffällige Effekte.

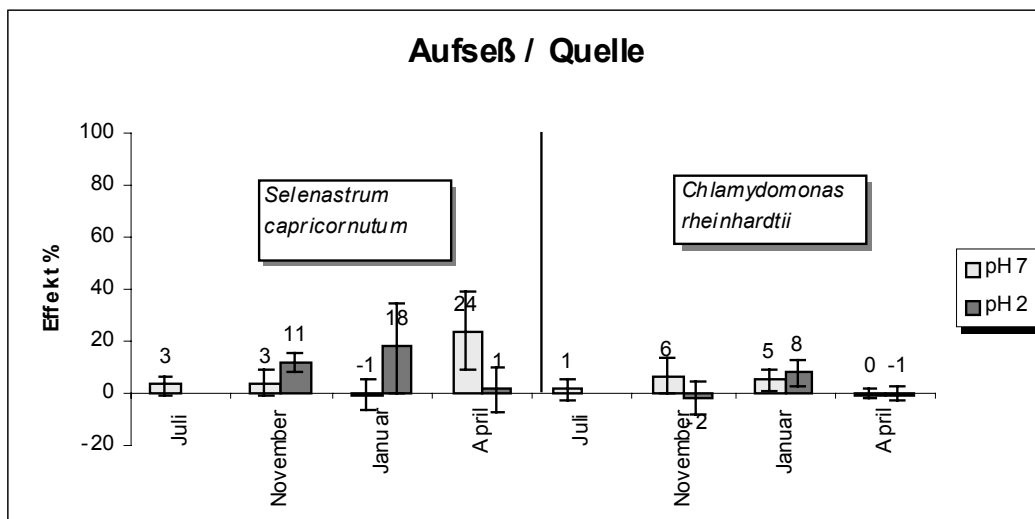


Abb. 5.20: Extrakte der Aufseßquelle im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001

Die Toxizität der sauren Extrakte gegenüber *S. capricornutum* ist im Monat November und Monat Januar am höchsten. Den höchsten Effekt zeigt der neutrale Extrakt vom April mit 24%. Beide Algen zeigen in den Monaten mit der größten Wahrscheinlichkeit eines Pestizideintrages keine erhöhten Werte.

Dagegen zeigen die sauren Extrakte von November bis April einen deutlichen Effekt gegenüber den Leuchtbakterien. Die neutralen Fraktionen sind allerdings nicht toxisch im MicrotoxTM-Test.

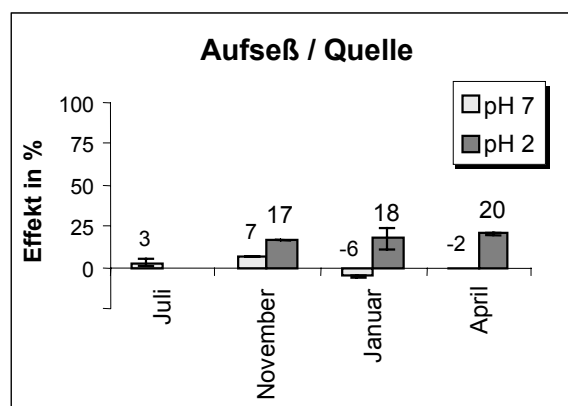


Abb. 5.22: Extrakte der Aufseßquelle im MicrotoxTM-Test von Juli 2000 bis April 2001

Die Aufseß bei Oberaufseß

Auf der Höhe des Ortes Oberaufseß fließt die Aufseß durch ein schmales Tal. Bei der Betrachtung der Effekte fällt hier im Vergleich zur Aufseß-Quelle auf, dass es deutliche

Unterschiede zwischen den Jahreszeiten gibt. Die saure Fraktion der Januarprobe hemmt das Wachstum von *S. capricornutum* bis zu 70%. Ebenfalls hat die neutrale Fraktion der Probe, die im April genommen wurde, eine signifikante Wirkung von 40%. Hingegen liegen die Effekte beider Fraktionen gegenüber *C. reinhardtii* ausnahmslos unterhalb von 10%.

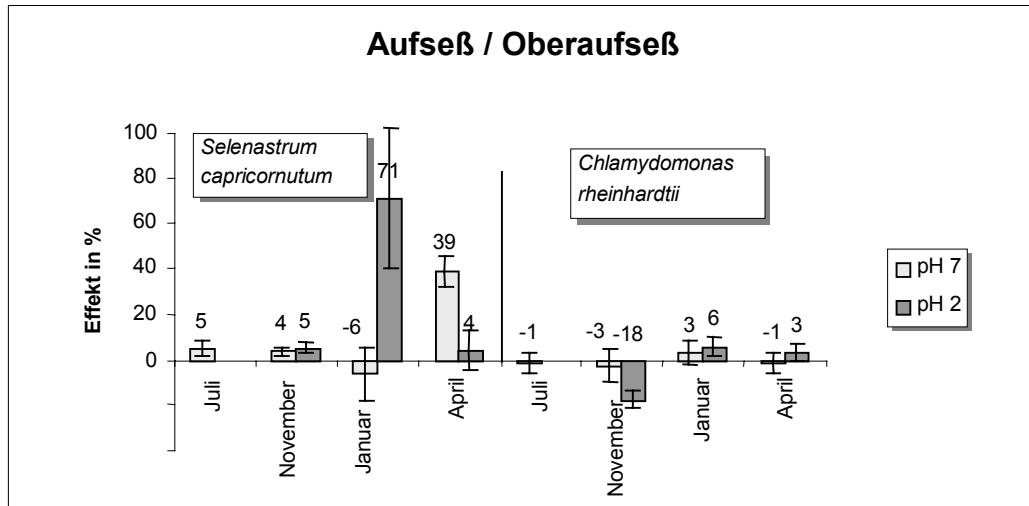


Abb. 5.23: Extrakte der Aufseß/Oberaufseß im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001

Auch im MicrotoxTM-Test sind die Effekte (Abb. 5.24) während des Jahres unterschiedlich stark ausgeprägt.

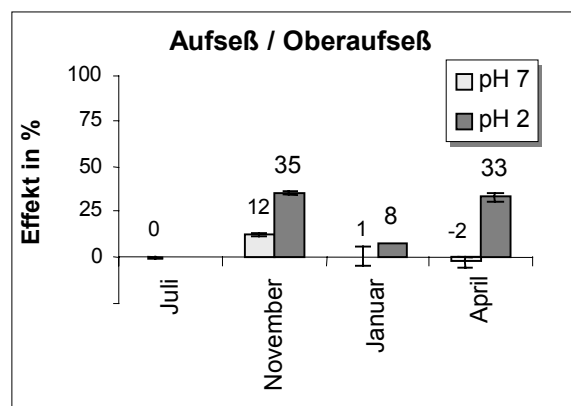


Abb. 5.24: Extrakte der Aufseß/Oberaufseß im MicrotoxTM-Test von Juli 2000 bis April 2001

Wie auch im Algenwachstumstest zeigen die sauren Extrakte vom November einen Effekt auf die Bakterien. Hingegen ist die saure Fraktion der Probe, die im April entnommen wurde, toxischer als im Algentest, gegenüber dem sie keine Wirkung zeigt. Die neutrale Fraktion dieser Probe ist dagegen nicht toxisch im MicrotoxTM-Test. Dies könnte ein Hinweis auf algentoxische Verbindungen sein.

Die Aufseß hinter der Aufseßer Kläranlage

Das Jahresmonitoring der Wasserqualität der Aufseß etwa 1 km hinter der Kläranlage des Ortes Aufseß zeigt bereits, dass hier ein höherer Fremdstoffeintrag vorliegt als an den anderen Probenahmestellen der Aufseß. An dieser Stelle werden im Algentest die höchsten Effekte gemessen. Auffallend sind die Effekte der sauren Fraktionen in den kälteren Monaten des Jahres, vor allem gegenüber der Alge *S. capricornutum*, die zum Teil eine vollständige Wachstumshemmung auslösen, wie sich anhand der Novemberprobe erkennen lässt (Abb. 5.25). Im Falle von *C. rheinhardtii* sind die Effekte nicht so stark ausgeprägt. Zwar wird die Alge durch den sauren Extrakt der Novemberprobe und den neutralen Extrakt der Aprilprobe beeinträchtigt, dagegen hat die Januarprobe überhaupt keinen Einfluss auf das Wachstum. Auffällig ist, dass die neutrale Fraktion der Probe des Monats April gegenüber *C. rheinhardtii* einen deutlichen Effekt zeigt, was auf Inhaltsstoffe hinweist, die in anderen Proben dieses Monats nicht vorliegen.

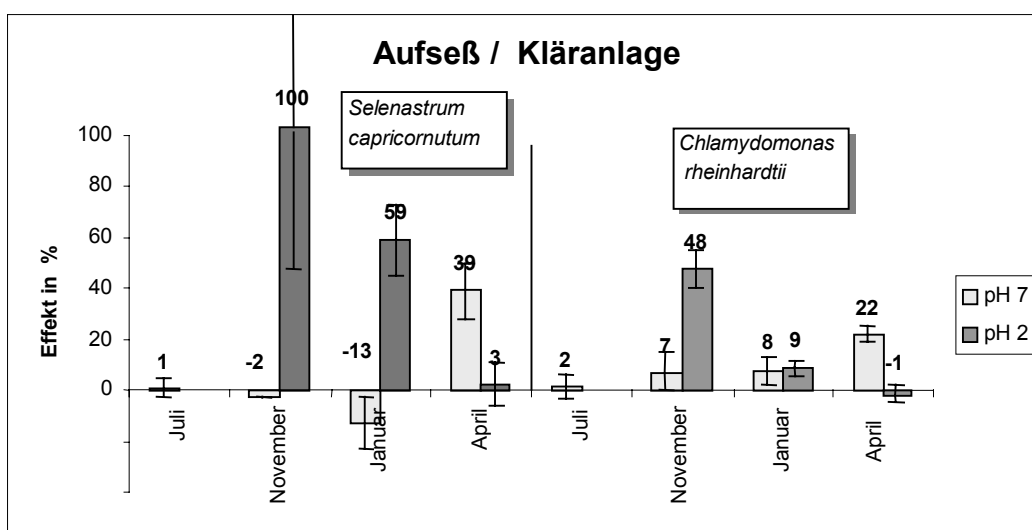


Abb. 5.25: Extrakte der Aufseß/Kläranlage im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001

Im MicrotoxTM-Test (Abb. 5.26) zeigen die sauren Extrakte vom November 2000 und vom April 2001 die auffälligsten Effekte. Der Extrakt vom November enthält somit sowohl algentoxische als auch bakterientoxische Verbindungen. Anzumerken ist, dass die neutralen Extrakte erhöhte Effekte zeigen. Dies konnte nicht im Falle der beiden anderen Probenahmestellen der Aufseß wie auch der übrigen Probenahmestellen beobachtet werden.

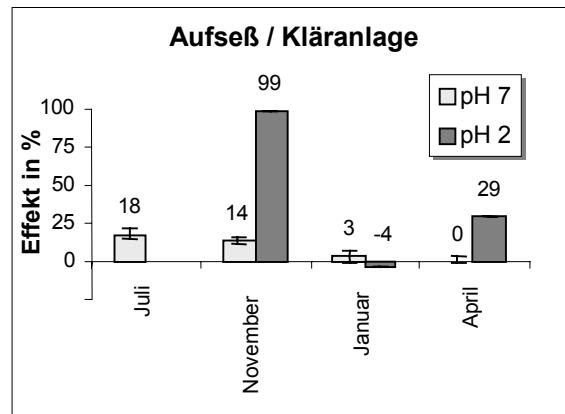


Abb. 5.26: Extrakte der Aufseß/Kläranlage im MicrotoxTM-Test von Juli 2000 bis April 2001

Eine Besonderheit des Ortes Aufseß ist dadurch gegeben, dass hier zwei Lebensmittelbetriebe ansässig sind, eine Brauerei und ein Aromenhersteller. Hierdurch kann es eher zu einem erhöhten Eintrag an Fremdstoffen kommen, die im Biotest Effekte auslösen können.

Es zeigt sich, dass die Effekte flussabwärts zum Teil drastisch zunehmen, sowohl im Algentest (s. Monate November und Januar) als auch im MicrotoxTM-Test (s. Monat November). Im Monat Januar zeigt das Flusswasser bereits ab der Probenahmestelle Aufseß/Oberaufseß eine Verschlechterung. Dies spiegelt sich nicht nur im Algenwachstumstest gegenüber *S. capricornutum* sondern auch im Leuchtbakterientest wider. Das gilt vor allem für die Verbindungen, die in der sauren Fraktion vorkommen. Tendenziell nimmt das Auftreten von Verbindungen zu, die auf die Biolumineszenz einen Einfluss haben. In der Quelle werden in der sauren Fraktion maximal Effekte bis zu 15 % gemessen, während bei Oberaufseß bereits Effekte bis zu 30 % messbar sind. Die deutlichsten Effekte zeigt die Aufseß einmalig in der Nähe der Kläranlage, wo der Microtox-Test eine Hemmung von 100 % zeigt. Die Aufseßquelle weist eine Hintergrundbelastung von Stoffen auf, die vor allem durch die saure Extraktion erfasst werden; dies zeigen die gleichbleibend hohen Effekte im MicrotoxTM-Test während der drei Probenahmen. An den beiden anderen Probenahmestellen der Aufseß ist dies nicht mehr zu beobachten.

5.2.1.3 Die Leinleiter

Die Leinleiter wurde an ihrer Quelle und vor ihrer Mündung in die Wiesent im Ort Gasseldorf beprobt.

Die Leinleiterquelle

Die Leinleiterquelle zeigt im Laufe eines Jahres keine auffällige Zunahme der Beeinträchtigung des Algenwachstums (Abb. 5.27). Allein die neutralen Fraktionen im Januar

(*C. reinhardtii*) und im April (*S. capricornutum*) wirken leicht hemmend auf das Algenwachstum.

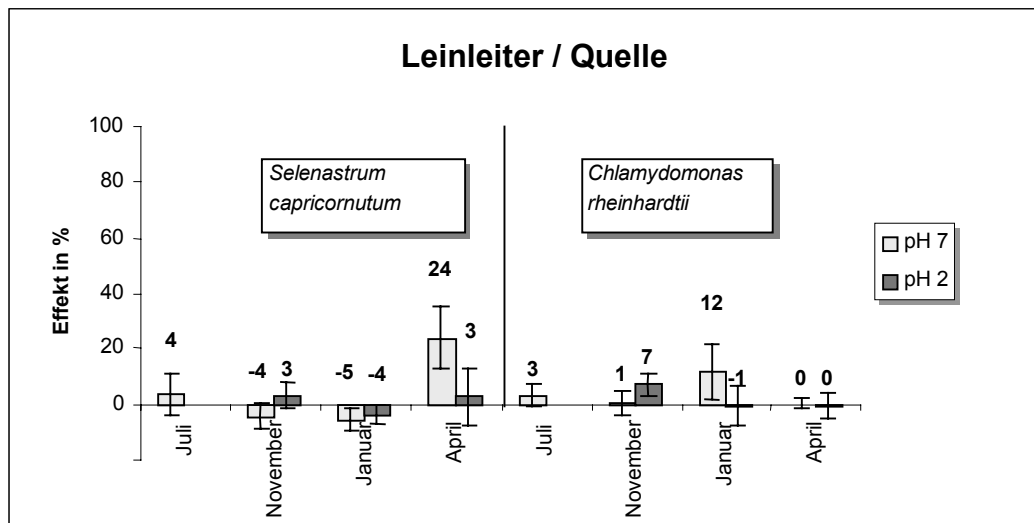


Abb. 5.27: Extrakte der Leinleiterquelle im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001

Im Microtox™-Test ist das saure Extrakt der Januarprobe deutlich toxischer (Abb. 5.28) als die übrigen Extrakte. Der saure Extrakt im April zeigt ebenfalls einen geringfügig erhöhten Effekt.

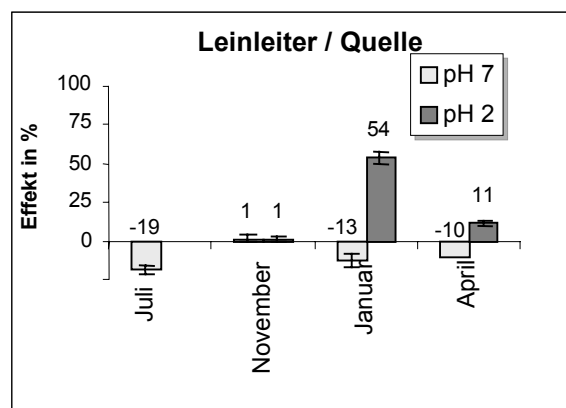


Abb. 5.28: Extrakte der Leinleiterquelle im Microtox™-Test von Juli 2000 bis April 2001

Auffällig ist, dass die neutrale Fraktion häufig eine Leuchtverstärkung zur Folge hat.

Die Leinleiter bei Gasseldorf

Hier ergibt sich eine ähnliche Hemmung wie bei der Leinleiter-Quelle. Die Probenahmestelle bei Gasseldorf wies im Algenwachstumstest im Beobachtungszeitraum eine gleichbleibend gute Wasserqualität auf (Abb. 5.29). Die neutrale Fraktion zeigt im Monat April einen Effekt von 35%, der sich deutlich von den anderen gemessenen Effekten abhebt. Bei der Alge *C.*

rheinhardtii zeigt nur die Probe vom Monat Januar im Vergleich zu den übrigen Proben eine geringfügig erhöhte Hemmung.

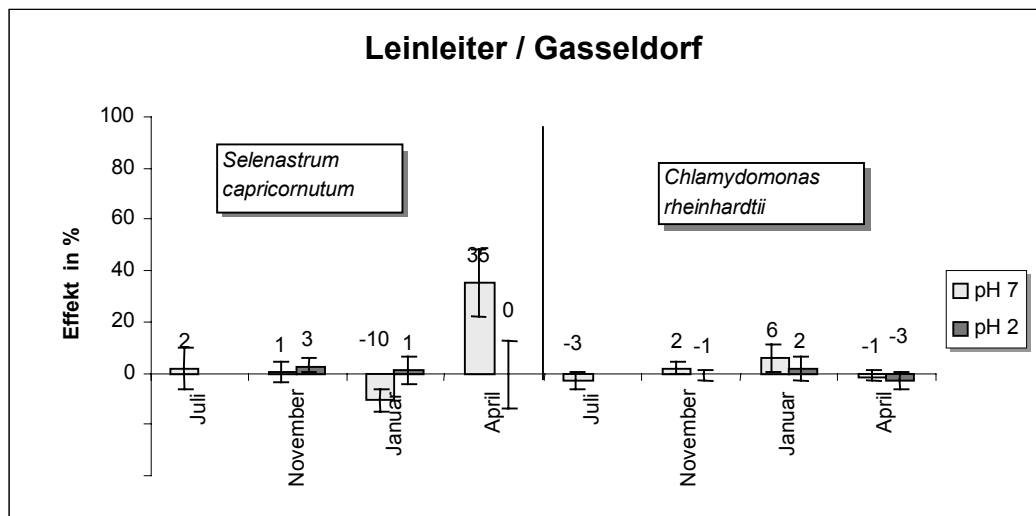


Abb. 5.29: Extrakte der Leinleiter bei Gasseldorf im Algenwachstumstest von Juli 2000 bis April 2001

Die Effekte im MicrotoxTM-Test deuten ebenfalls auf eine vergleichsweise geringe Belastung des Wassers während des gesamten Jahres hin (Abb. 5.30). Die sauren Eluate der Monate Januar und April 2001 weisen jedoch erhöhte Effekte auf. Besonders die Probe des Monats Januar fällt, wie auch diejenige der Leinleiterquelle, durch eine starke Leuchtminderung auf. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bereits in der Quelle Stoffe enthalten sind, die im Verlauf des Flusses nicht eliminiert werden. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass für diesen Probenahmezeitpunkt an den anderen Probenahmestellen der Fränkischen Schweiz kein entsprechend hoher Effekt beobachtet wird.

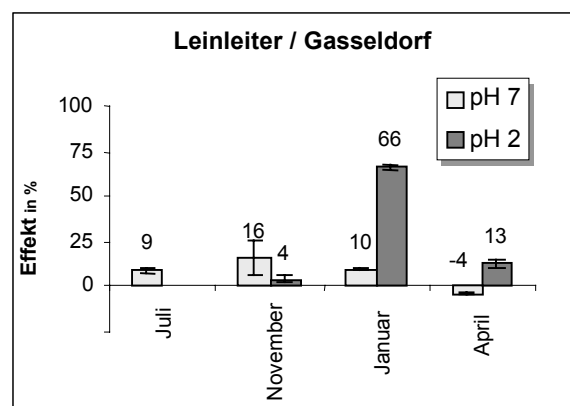


Abb. 5.30: Extrakte der Leinleiter bei Gasseldorf im MicrotoxTM-Test von Juni 2000 bis April 2001

Die neutralen Fraktionen lassen leicht erhöhte Effekte in der Leinleiter bei Gasseldorf im November und im Januar erkennen.

Die Quelle der Leinleiter zeigt auffälligerweise bei fast allen neutralen Extrakten negative Effekte, die auf eine Leuchtverstärkung hinweisen. Dies wurde bereits manchmal bei der Anwesenheit von Kalziumionen beobachtet, die jedoch durch die Anreicherung eigentlich nicht mehr im Eluat vorhanden sein dürften. Eine Erklärung hierfür wäre die Komplexbildung des Kalziums durch Huminstoffe, wodurch eine Retention des Kalziums ermöglicht wird. Da anschließend im Eluat keine Ionen mehr vorhanden sind, kann es durch Gleichgewichtsverschiebung zur Freisetzung des Kalziums kommen. Bekannt ist, dass sich im MicrotoxTM-Test die Kalziumkonzentration stimulierend auf das Leuchten auswirken kann [Krebs, 1992].

5.2.1.4 Die Wiesent

Die Wiesent ist der größte Fluss der Fränkischen Schweiz, der diese in Richtung Süd-Westen entwässert. Die Probenahmestelle befand sich einige Kilometer hinter der größten Ortschaft der Fränkischen Schweiz, dem Ort Ebermannstadt. Auffällige Hemmungen sind im Januar und im April bei der sauren Fraktion gegenüber *S. capricornutum* zu verzeichnen (Abb. 5.31). Anders als erwartet zeigt die Wiesent weniger algentoxische Extrakte als z.B. die Aufseß in ihrem Lauf. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Belastung an dieser Stelle geringer wäre, sie kann infolge der Verdünnung jedoch vermindert worden sein.

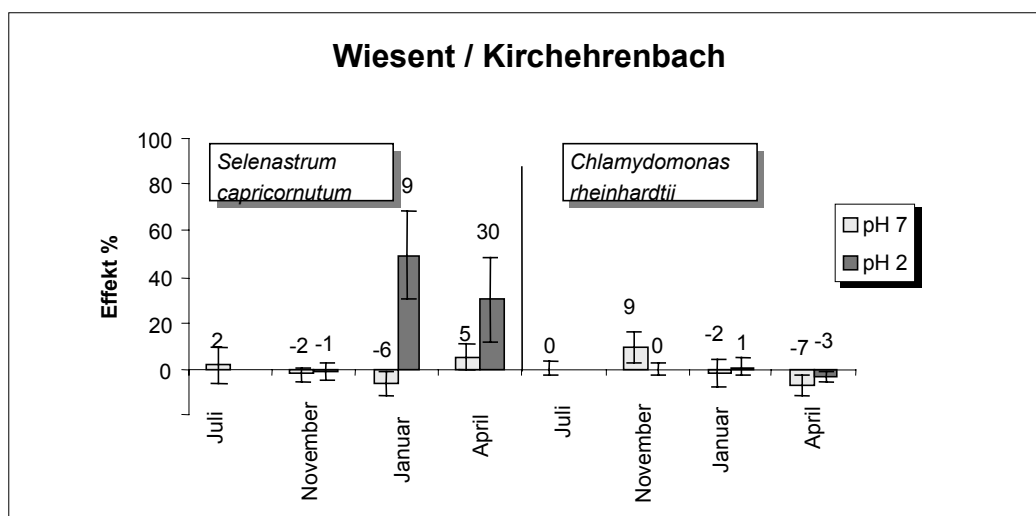


Abb. 5.31: Extrakte der Wiesent im Algenwachstumstest von Juni 2000 bis April 2001

Anders stellt sich das Bild im MicrotoxTM-Test (Abb. 5.32) dar. Es fällt auf, dass sich hier die Toxizitäten der sauren Extrakte von Januar und April 2001 mit denen des Algenwachstumshemmtests decken, wodurch auf Stoffe hingewiesen wird, die sowohl algentoxisch als auch bakterientoxisch sind. Außerdem zeigen beide Fraktionen vom November einen signifikanten Effekt.

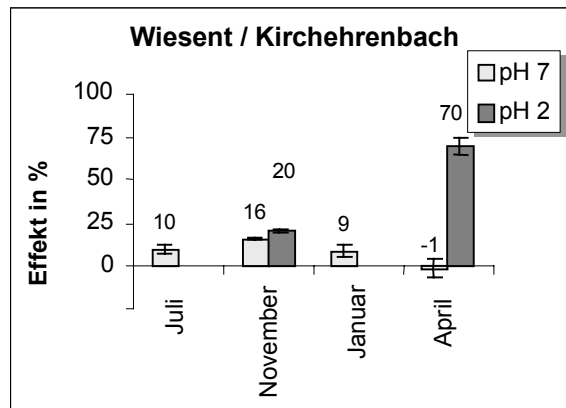


Abb. 5.32: Extrakte der Wiesent bei Kirchehrenbach im MicrotoxTM-Test von Juni 2000 bis April 2001

Die Messung an der Probenahmestelle der Wiesent zeigt während des ganzen Jahres im MicrotoxTM-Test keinen auffallenden Verlauf. Obwohl die Wiesent der am stärksten durch anthropogene Einflüsse ausgesetzte Fluss ist, wurden weder mehr noch höhere Effekte als an den anderen Probenahmestellen gemessen. Der höchste Effekt trat im April auf, dem Monat, in dem auch im Algenwachstumshemmtest gegenüber *S. capricornutum* ein höherer Effekt festgestellt wurde. Eine Erklärung für diese Tatsache kann der erhöhte Verdünnungseffekt in diesem Fluss sein.

5.2.1.5 Die Karstquelle des oberfränkischen Beispielbetriebes für Fischzucht

Die Quelle des Fischzuchtbeispielbetriebs in Aufseß wurde nur während der Wintermonate beprobt. Dies erfolgte parallel zu einer Diplomarbeit [Nieslony, 2001], die die Ursache für die geringen Laichausbeuten dieses Betriebes beleuchtet hat.

Die Effekte der Extrakte sind in Abb. 5.33 dargestellt. Es wurde nur der Extrakt des Monats Januar im Algenwachstumstest überprüft. Dabei zeigte sich die Alge *C. reinhardtii* deutlich empfindlicher als *S. capricornutum*. Dies ist vermutlich auf die hohe Atrazinbelastung zurückzuführen. Die Konzentration im getesteten Extrakt beträgt etwa 60 µg/L, welche bereits zu deutlichen Hemmungen führt, da der EC₅₀-Wert von 50 µg/L für die Alge *C. reinhardtii* beträgt (s. Kap. 5.1.7.2). Beide Fraktionen, sowohl die saure als auch die neutrale, führten zu einer gleich hohen Hemmung. Andererseits kam es zu keiner auffälligen

Hemmung gegenüber *S. capricornutum*. Im MicrotoxTM-Test waren die sauren Extrakte gegenüber den Leuchtbakterien beider Monate deutlich toxisch. Dagegen zeigen die neutralen Extrakte keine Hemmung. Hinsichtlich der Effekte der sauren Fraktionen ist die Quelle vergleichbar mit dem Hemmmuster der Aufseß/Kläranlage und der Wiesent. Es handelt sich hierbei um Probenahmestellen, die mit erhöhten anthropogenen Einflüssen zu rechnen haben. Bei den anderen beiden Quellen traten nur vereinzelt hohe Effekte auf.

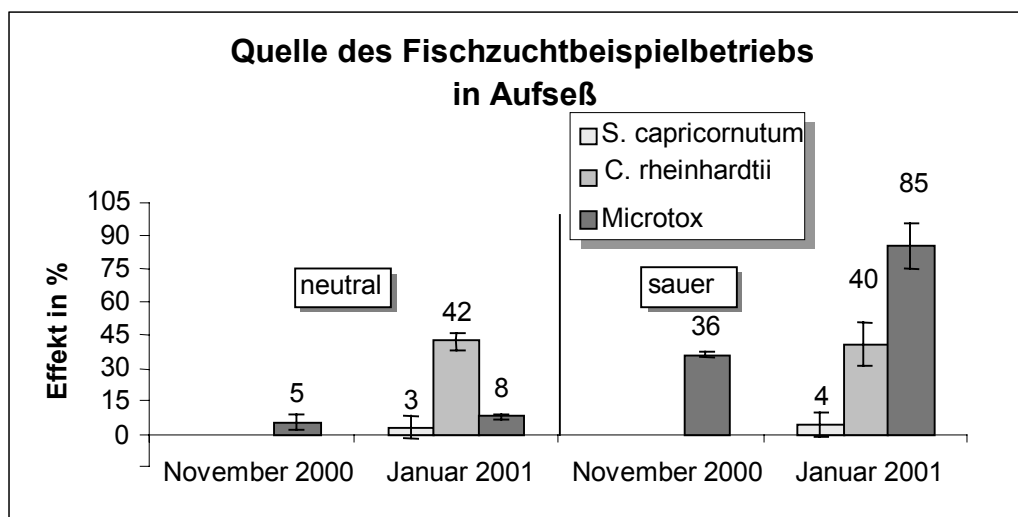


Abb. 5.33: Extrakte der Quelle des Fischzuchtbeispielbetriebes in allen drei Biotests

5.2.2 Ökotoxikologisches Flusswassermonitoring des Mähringsbachs und des Zinnbachs

Beide Flüsse wurden an zwei Stellen beprobt, die zwischen einem halben und einem Kilometer auseinander lagen. Wie erwartet, unterscheiden sich die Toxizitäten aufgrund der geringen Entfernungen nur geringfügig. Zudem sind an diesen Streckenabschnitten weder Kläranlagen noch industrielle Einleiter oder andere Verschmutzer vorhanden.

Die Effekte der sauren Fraktionen verursachten Hemmungen der Biolumineszenz zwischen 80 und 90 %; diese Effekte werden deshalb gesondert in Kap. 5.2.2.3 behandelt.

5.2.2.1 Der Mähringsbach

Die beiden Probenahmestellen des Mähringsbachs befinden sich an einer lichten Stelle im Wald nahe einer Brücke. Die Stelle Mähringsbach I liegt oberhalb der Stelle Mähringsbach II. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden jeweils die neutralen Fraktionen (Abb. 5.34) und die sauren Fraktionen (Abb. 5.35) in einer Abbildung zusammengefasst.

Die neutralen Fraktionen zeigen bis auf eine Probenahmestelle im April keine deutlichen Effekte, weder gegenüber *S. capricornutum* noch gegenüber *C. reinhardtii*. Bei den sauren

Extrakten traten wiederum im November und im April deutliche Hemmungen gegenüber *S. capricornutum* auf.

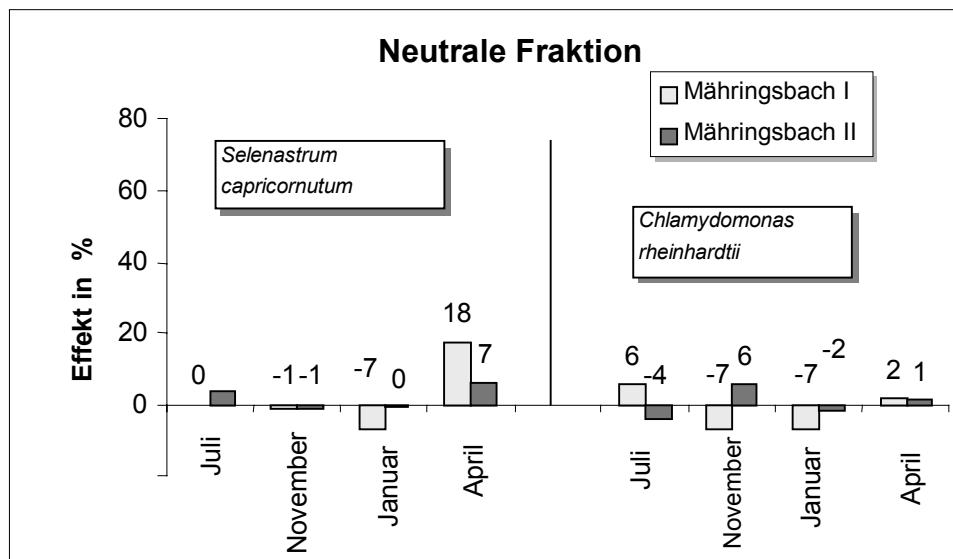


Abb. 5.34: Neutrale Extrakte des Mähringsbachs im Algenwachstumstest von Juni 2000 bis April 2001

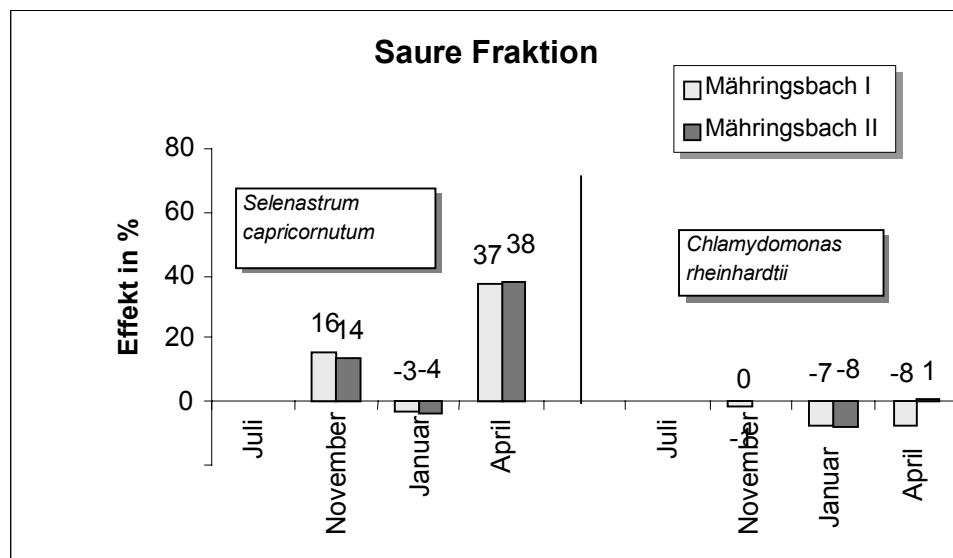


Abb. 5.35: Saure Extrakte des Mähringsbachs im Algenwachstumstest von Juni 2000 bis April 2001

Es fällt auf, dass Effekte vor allem bei *S. capricornutum* vorkommen. Dies zeigte sich bereits bei den Fließgewässern der Fränkischen Schweiz. Die Effekte im MicrotoxTM-Test (Abb. 5.36) lassen deutliche Hemmungen der neutralen Fraktion im Juli erkennen, leicht erhöhte Toxizitäten zeigen sich nur im November und im April. Die Januarprobe übt nahezu keinen Effekt auf die Leuchtbakterien aus.

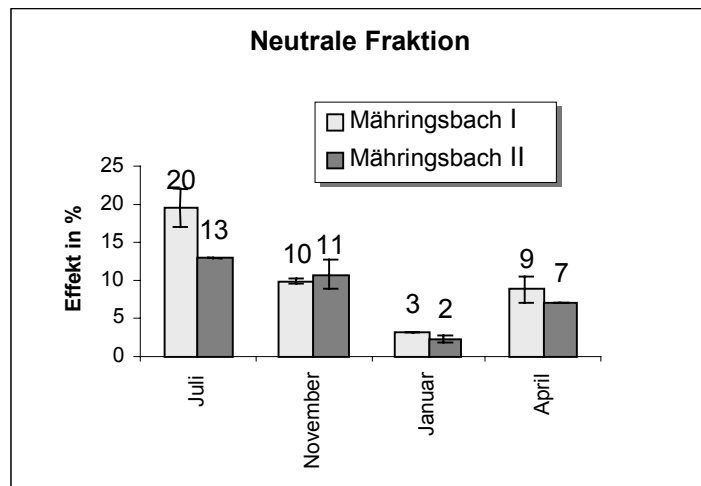


Abb. 5.36: Extrakte des Mähringsbachs im Microtox™-Test von Juni 2000 bis April 2001

Die neutralen Fraktionen sind weder im Algenwachstumstest noch im Microtox™-Test deutlich toxisch. Hervorzuheben ist jedoch, dass der neutrale Extrakt des Monats Juli einen signifikanten Effekt im Microtox™-Test zeigt, wogegen im Algenwachstum kein deutlicher Effekt zu beobachten ist. Dies lässt eher auf bakterientoxische Verbindungen als auf algentoxische Verbindungen schließen.

5.2.2.2 Der Zinnbach

Die beiden Probenahmestellen des Zinnbachs liegen in der Nähe von Mühlen, wobei nur die Timpermühle zum Zeitpunkt des Monitorings bewohnt war. In Abb. 5.37 sind die gemessenen Effekte der neutralen Fraktion im Algenwachstumstest dargestellt. Sie verursachen keine signifikante Hemmung, so wie es auch beim Mähringsbach beobachtet wurde.

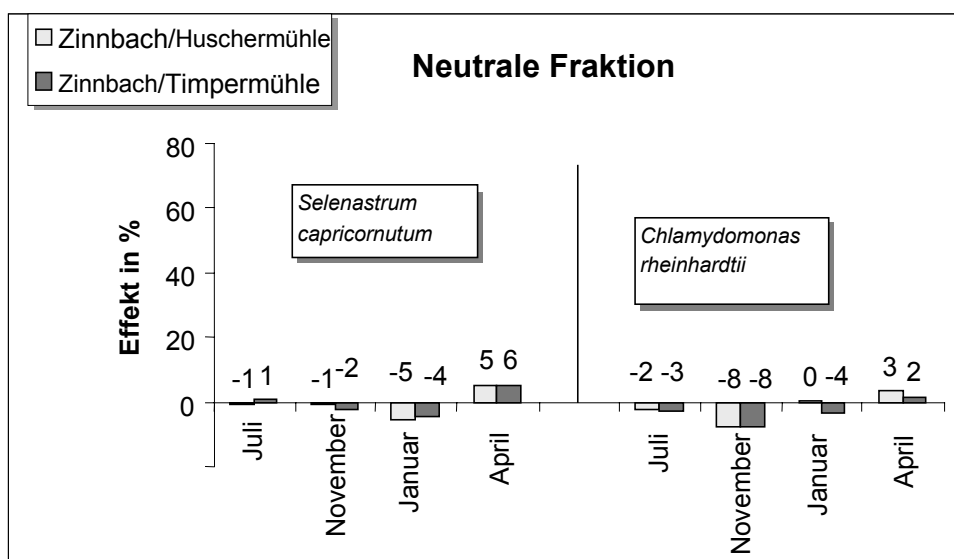


Abb. 5.37: Neutrale Extrakte des Zinnbachs im Algenwachstumstest von Juni 2000 bis April 2001

Anders verhält es sich mit den sauren Extrakten des Zinnbachs (Abb. 5.38), die in einigen Fällen deutliche Hemmungen auf das Algenwachstum ausüben, vor allem gegenüber *S. capricornutum*.

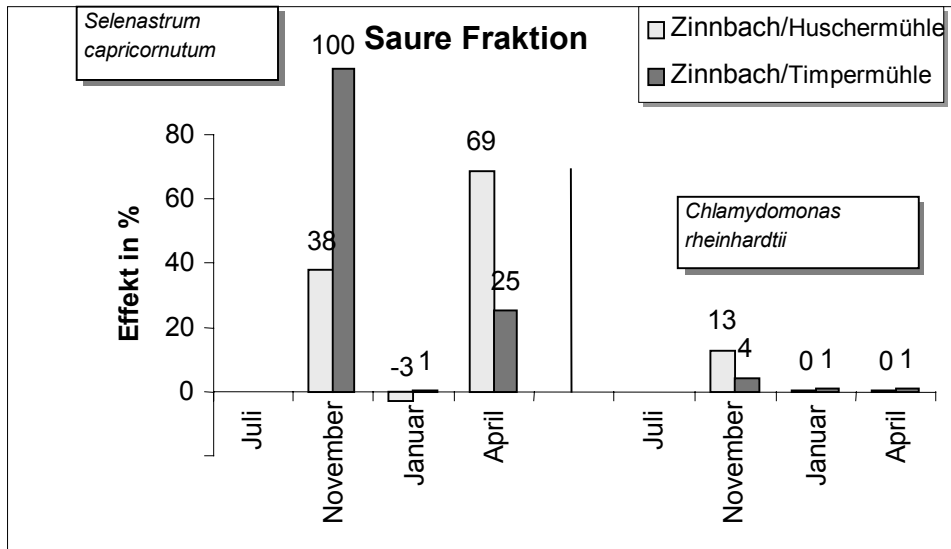


Abb. 5.38: Saure Extrakte des Zinnbachs im Algenwachstumstest von Juni 2000 bis April 2001

Hier fallen besonders die Monate November und April mit Hemmungen bis zu 100% auf. *C. reinhardtii* zeigt nur im November eine leichte Reaktion auf das saure Extrakt.

Das Hemmungshistogramm der neutralen Fraktionen im MicrotoxTM-Test (Abb. 5.39) sieht ähnlich wie das der sauren Fraktionen gegenüber *S. capricornutum* aus. Offensichtlich befinden sich während der kalten Wintermonate weniger aktive Substanzen im Wasser als in den wärmeren Monaten.

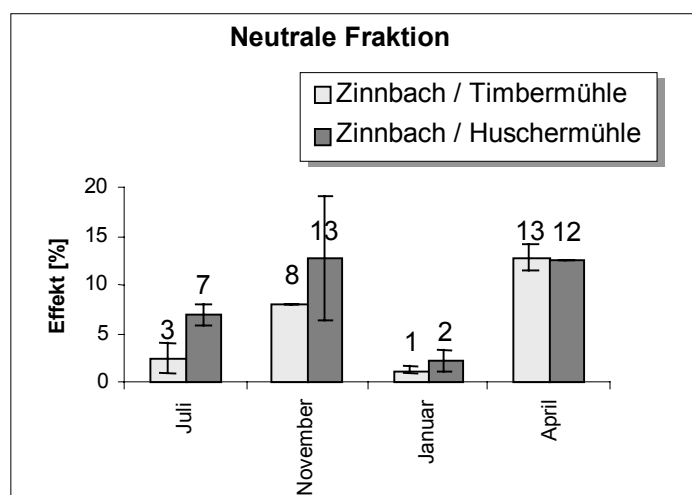


Abb. 5.39: Extrakte des Zinnbachs im MicrotoxTM-Test von Juni 2000 bis April 2001

Die Wasserqualität des Zinnbachs scheint den Ergebnissen der Biotests zufolge stärker zu schwanken als die des Mähringbachs, was durch die Nähe zu den Siedlungen bedingt sein kann. Es ist somit von Belastungen durch Punktquellen auszugehen.

5.2.2.3 Saure Extrakte der Bäche im Microtox™-Test

Da sich während des Monitorings herausstellte, dass die sauren Extrakte des Mähringbachs und des Zinnbachs im Microtox-Test zu Effekten zwischen 70 und 100 % führten, wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um eine Erklärung hierfür zu erhalten. Naheliegend war die Absorption der Biolumineszenz durch farbige Huminverbindungen (s. Kap. 5.1.9.1). Eine Überprüfung des Einflusses der Färbung mit einer Farbkorrektur-Küvette führte zu dem Ergebnis, dass es durch die farbige Probe zwar zu einer gewissen Unterdrückung der Biolumineszenz kommt, diese jedoch nicht den gesamten Hemmeffekt erklären kann. Das Prinzip dieser Untersuchung beruht auf der räumlichen Trennung von Probe und Bakteriensuspension. Als Vergleich wird ein Wasserleerwert herangezogen. Es wurde die in der Arbeit von [Klein, 1990] beschriebene Formel angewendet. Die erhaltenen korrigierten Hemmwerte werden jedoch nur als Anhaltspunkte herangezogen. Andere Arbeiten weisen in diesem Zusammenhang darauf hin [Schrader, 1998], dass die Korrektur zu einer starken Verbreiterung des 95%-Vertrauensbereiches führt und sogar Toxizität vortäuschen kann. Aus diesem Grund wurde davon abgesehen, diese Effekte zu korrigieren und in die Bewertung des Monitorings einzubeziehen.

Die entsprechenden Eluate wurden außerdem in einer weiteren Verdünnung getestet, die einer 4,5fachen Aufkonzentrierung der ursprünglichen Wasserproben entsprach. Es sollte untersucht werden, ob andere toxischere Stoffe vorhanden sind, die durch die Färbung maskiert werden. Die gemessenen Hemmungen der verdünnten Eluate wiesen jedoch keine signifikanten Effekte auf, die Werte sanken auf 0 bis 15 %. Aufgrund des Ausbleibens eines toxischen Effektes konnte zumindest mit Sicherheit festgestellt werden, dass keine weiteren deutlich toxischeren Substanzen in den Extrakten vorlagen.

5.2.3 Jahreszeitliche Schwankungen der Effekte aller Probenahmestellen

Für die monatlichen Messkampagnen wurde Mediane gebildet, um festzustellen, ob während der verschiedenen Jahreszeiten natürliche Einflüsse die Gewässer verändern. Je stärker die dazu ermittelten 95-Percentile streuen, desto variabler sind die Flusswasserqualitäten von Probe zu Probe, und es ist davon auszugehen, dass hier keine jahreszeitlich abhängige

Untergrundbeeinträchtigung des Wassers vorliegt. Je enger dieses Percentil ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass die gemessenen Effekte durch natürliche Prozesse hervorgerufen werden. Aus den nachfolgend abgebildeten sechs Diagrammen sind die Effekte, getrennt nach Testorganismus und neutraler und saurer Fraktion (Abb. 5.41 und Abb. 5.42), zu entnehmen. Im Juli zeigen beide Algenarten gegenüber den neutralen Fraktionen keine signifikanten Hemmungen, und das dazu ermittelte 95-Percentil ist ebenfalls sehr klein. Hingegen ist im MicrotoxTM-Test das 95-Percentil deutlich größer, womit dieser Test empfindlicher auf die unterschiedlichen Probenzusammensetzungen reagiert. Im November liegen die Mittelwerte für beide Algenarten um 0 %. Das Percentil für die Effekte gegenüber *C. reinhardtii* ist zwar etwas größer, jedoch liegen 95 % der Werte unterhalb des Schwellenwertes von 10 %. Die Effektbandbreite im MicrotoxTM ist im November schmal, hier liegt der Mittelwert allerdings um die 10 %, was bereits eine erhöhte Toxizität für 95 % der Proben bedeutet. Im Januar liegen für alle Biotests die Effekte um 0 %. Im Falle von *C. reinhardtii* gibt es einen Ausreißer, wie die Standardabweichung andeutet. 95% der Proben schwanken um einen Bereich unterhalb von 10 %. Ursache der erhöhten Standardabweichung ist eine Probe der Quelle des Fischzuchtbetriebes, die eine Atrazinkonzentration von 0,6 µg/L aufweist.

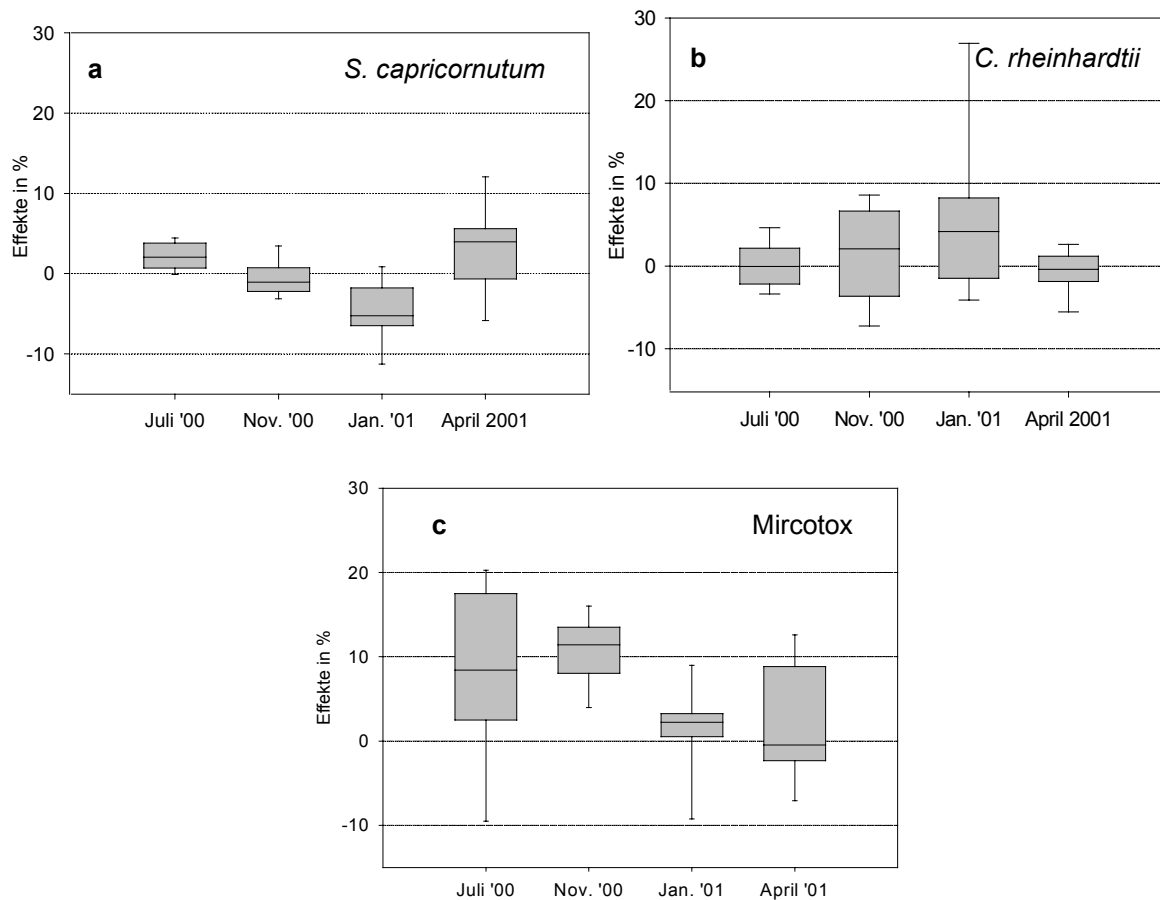


Abb. 5.41: Median, 95%-Percentil und Standardabweichung der Effekte von neutralen Fraktionen in drei Biotests (n=10)

Im April schwanken die Effekte von *S. capricornutum* und dem MicrotoxTM-Test stärker als diejenigen von *C. reinhardtii*. Die Mediane liegen jedoch mit etwa 5 % (MicrotoxTM-Test) und 0 % (Algentests) unterhalb des Signifikanzniveaus der Biotests.

In Abb. 5.42 sind die monatlichen Schwankungen der Effekte der sauren Fraktionen für die jeweiligen Organismen dargestellt. Für die Darstellung der Effekte im MicrotoxTM-Test (Abb. 5.42 c) wurden nur die Probenahmestellen der Fränkischen Schweiz zugrunde gelegt, da die Probenextrakte für den Zinn- und Mähringsbach, bedingt durch die stoffliche Zusammensetzung, zu Effekten von 100 % führen. Die statistische Auswertung der sauren Fraktionen schließt nur die Proben von November bis April ein.

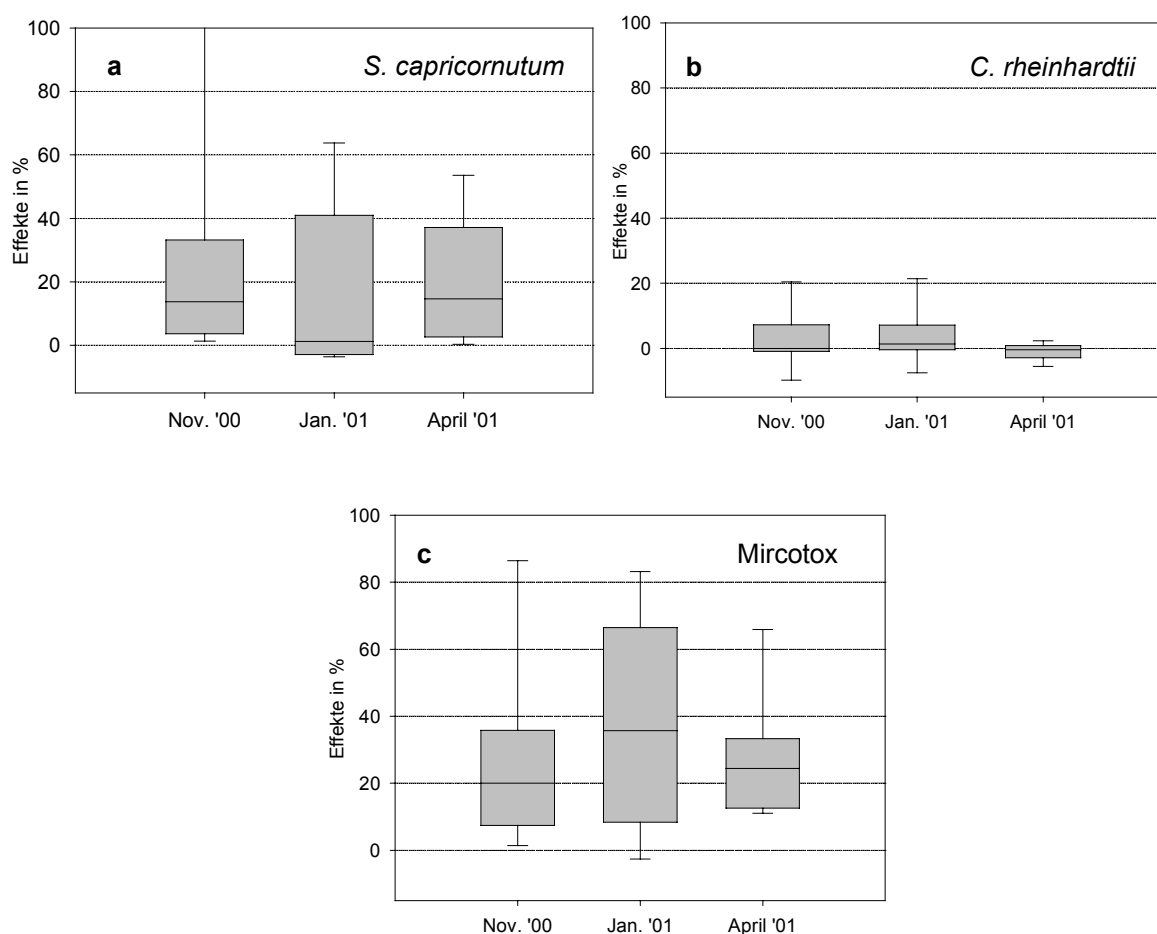


Abb. 5.42: Median, 95%-Perzentil und Standardabweichung der Effekte von sauren Fraktionen in drei Biotests (n=10)

Die sauren Extrakte zeichnen sich durch deutlich größere Schwankungsbreiten aus. Eine Erklärung hierfür ist, dass das Spektrum saurer Verbindungen von Probe zu Probe stärker variiert. Am empfindlichsten reagiert der MicrotoxTM-Test auf diese Fraktion, ausgedrückt durch Mediane von 30-40 %. Die Mediane der Effekte im Algentest liegen bei 0-15 %. Besonders im Januar sind für die Flüsse der Fränkischen Schweiz hohe Spannbreiten

aufgetreten. Die Mediane für den MicrotoxTM-Test liegen bei 30 %. Für den Algenwachstumstest liegen die Mediane für *C. reinhardtii*, für den gesamten Messzeitraum dagegen nur um etwa 0 %. Im Fall von *S. capricornutum* liegen die Mediane im November und April höher als im Januar. Bei der zuletzt genannten Alge zeigen sich ebenfalls höhere Schwankungen der Effekte. Im Monat November fallen einige Proben durch hohe Effekte gegenüber *S. capricornutum* auf, was die große Standardabweichung zum Ausdruck bringt. Dabei handelt es sich um das saure Eluat der Probenahmestelle hinter der Kläranlage von Aufseß.

Es zeigt sich, dass *C. reinhardtii* auf andere Verbindungen reagiert als die anderen beiden Organismen. Bei letzteren lässt sich die Tendenz erkennen, dass sie auf eine vergleichbare stoffliche Zusammensetzung der Probe reagieren. Der MicrotoxTM-Test reagiert insgesamt gesehen am empfindlichsten auf die Probenextrakte, insbesondere auf die saure Fraktion.

5.2.4 Einfluss von AOX, DOC und Ionenkonzentrationen auf die Effekte

Um festzustellen, ob der Anteil an organisch gelöstem Kohlenstoff Einfluss auf die Toxizität in den verschiedenen Biotests hat, wurden die gemessenen DOC-Konzentrationen den festgestellten Effekten im Algenwachstumstest und Microtox-Test gegenübergestellt. Für die aufgestellten Korrelationen wurden die Effekte der sauren Fraktionen im MicrotoxTM-Test nicht berücksichtigt, da sie offensichtlich von vornherein keine Korrelation aufweisen können, denn sie zeigen alle eine 100 %ige Hemmung.

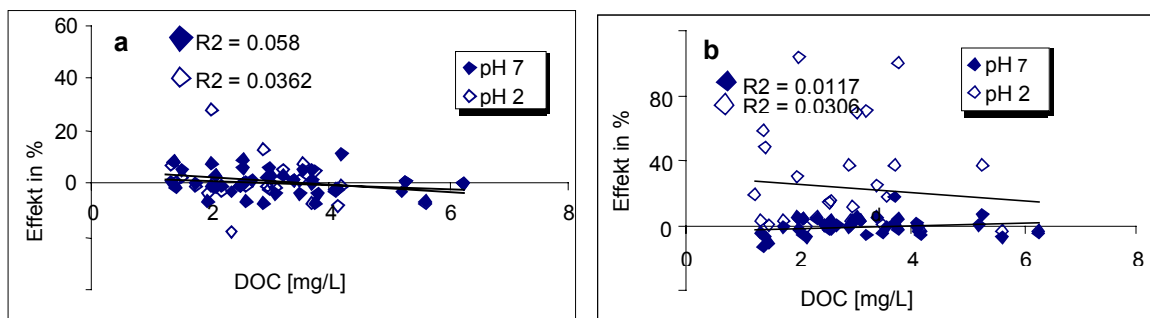


Abb. 5.43: Hemmungen im Algenwachstumstest, aufgetragen gegen den DOC-Gehalt; **a:** Alge *C. reinhardtii*, **b:** Alge *S. capricornutum*

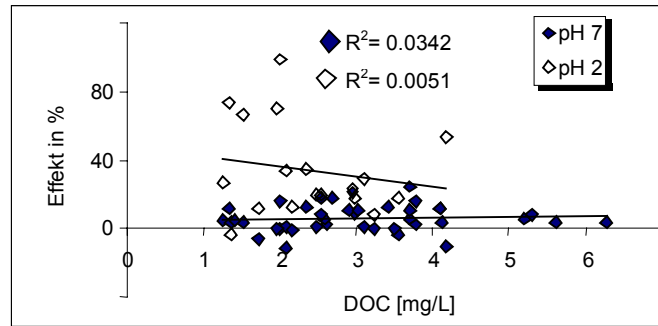


Abb. 5.44: Hemmungen im Microtox-Test, aufgetragen gegen den DOC-Gehalt

Die Abbildungen in Abb. 5.43 und in Abb. 5.44 zeigen deutlich, dass die festgestellten Effekte nicht mit dem DOC in Zusammenhang zu bringen sind. Dies führt zu dem Schluss, dass die Effekte nicht ursächlich mit dem DOC-Gehalt in Verbindung zu bringen sind.

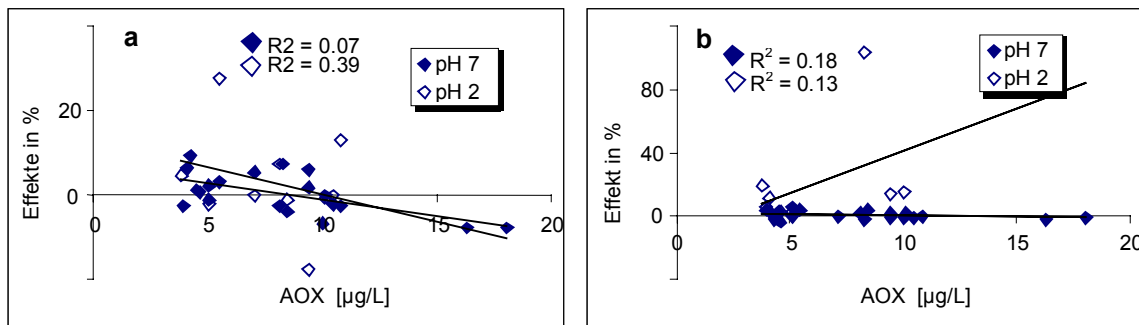


Abb. 5.45: Hemmungen im Algenwachstumstest, aufgetragen gegen den AOX-Gehalt; a: Alge *C. reinhardtii*, b: Alge *S. capricornutum*

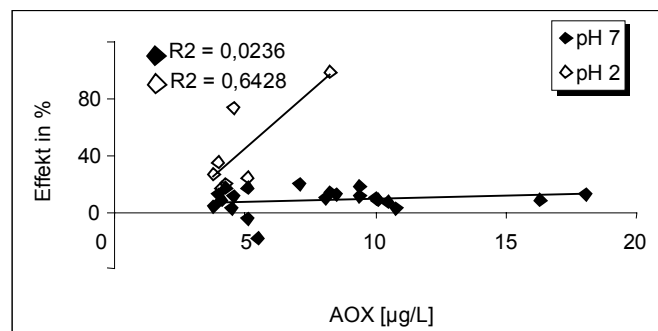


Abb. 5.46: Hemmungen im Microtox-Test, aufgetragen gegen den AOX-Gehalt

Auch eine Gegenüberstellung der Effekte gegenüber dem AOX-Gehalt (Abb. 5.45 und Abb. 5.46) zeigt anhand der vorliegenden Ergebnisse, dass die Summe der chlororganisch erfassten Substanzen mit den Effekten im Algenwachstumshemmtest und MicrotoxTM-Test nicht ursächlich in Zusammenhang zu bringen sind.

5.2.5 Atrazin als Ursache für gemessene Effekte

Eine Gegenüberstellung der Effekte im Algenwachstumshemmstest sollte herausfinden, inwieweit Atrazin für die Hemmungen verantwortlich ist (Abb. 5.47). Es zeigt sich, dass im Bereich bis etwa 150 ng/L Atrazin keine Korrelation zwischen dem gemessenen Effekt und der Atrazin-Konzentration besteht. Vor allem *S. capricornutum* zeigt im Bereich der niedrigen Konzentrationen sowohl für die saure als auch für die neutrale Fraktion erhöhte Hemmwerte. Diese Proben stammen aus der kälteren Periode des Jahres, nämlich Januar und April. Es liegen offensichtlich noch andere Verbindungen vor, die das Wachstum beeinträchtigen. Atrazin hat einen EC_{10} -Wert von 12 $\mu\text{g/L}$ gegenüber *C. reinhardtii*. Die nachgewiesenen Konzentrationen in den Proben liegen zwischen 0,01 und 0,2 $\mu\text{g/L}$, was einer Testkonzentration in den Eluaten von 1 - 20 $\mu\text{g/L}$ entspricht. Somit liegen die Atrazinkonzentrationen im Bereich der Sensitivitätsgrenze des Algenwachstumstest.

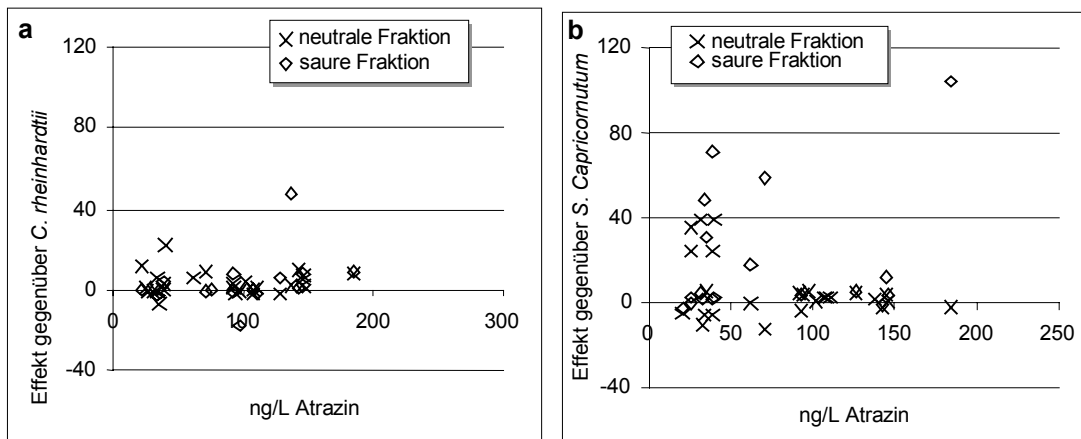


Abb. 5.47: Hemmungen im Algenwachstumstest aufgetragen gegen den Atrazin-Gehalt in der Wasserprobe, **a:** *C. reinhardtii*, **b:** *S. capricornutum*

Eine Ausnahme stellt die Probe der Quelle des Fischzuchtbeispielbetriebes vom Januar 2001 dar. Der ermittelte Effekt von 40 % gegenüber der Alge *C. reinhardtii* dürfte auf den Gehalt an Atrazin von 0,6 $\mu\text{g/L}$ zurückzuführen sein. Ein weiterer Hinweis, der dafür spricht, ist, dass die Probe gegenüber *S. capricornutum* keinen Effekt auslöst, was sich durch die deutlich geringere Empfindlichkeit dieser Alge gegenüber Atrazin erklären lässt.

5.3 Diskussion

Es ließ sich zeigen, dass der MicrotoxTM-Test am empfindlichsten vor allem auf die saure Fraktion reagierte. Bei einer sich über mehrere Monate erstreckenden Untersuchung von Proben des Epilimnions und des Hypolimnions eines Brunnen auf schädliche Einflüsse

mittels verschiedener Biotests, stellte sich der MicrotoxTM-Test ebenfalls als am empfindlichsten [Kratasyuk *et al.*, 2001] heraus. Dies bestätigt den allgemeinen Sachstand für die Empfindlichkeit des MicrotoxTM-Tests.

Von den Algen war die Alge *S. capricornutum* diejenige, die deutlicher auf Veränderungen der Wasserbeschaffenheit reagierte als die Alge *C. reinhardtii*. Die höchste Hemmung, die mit letztgenannter Alge festgestellt wurde, war in Gegenwart einer Quellwasserprobe, die 0,6 µg/L Atrazin enthielt. *S. capricornutum* zeigte hohe Effekte bei den Probenahmestellen Oberaufseß und der Kläranlage von Aufseß. Die erhöhten Effekte traten hier bei den sauren Extrakten auf.

Die Fließgewässer der Fränkischen Schweiz zeigten an denjenigen Probenahmestellen, die anthropogenen Einflüssen unterworfen waren, z.B. durch Kläranlagen oder Ortschaften, im MicrotoxTM-Test häufiger Effekte. Es handelte sich dabei meist um lokale und zeitlich begrenzte Einwirkungen, da die Effekte sich nicht bei einer weiteren Stelle des Flusses wiederholten. Dass Biotests auch den geographischen Toxizitätsverlauf aufzeigen können, zeigten Baun *et al.* [1998] anhand von Extrakten von Fließgewässerproben, die in der Nähe von Feldern genommen wurden, auf denen "Wasserspinat" angebaut wird. Diese erwiesen sich gegenüber Algen deutlich toxischer als weiter flussabwärts genommene Proben. Auch jahreszeitlich bedingte Einflüsse waren zu beobachten. Im Juli und November waren die Mediane der Effekte für den MicrotoxTM-Test höher als im Januar und April 2001. Dies lässt auf eine erhöhte Untergrundtoxizität schließen, die z.B. durch biologische abgebaute Naturstoffe verursacht wird. Abbauprodukte der Huminstoffe wie Fulvosäuren und Huminsäuren sind wohl auch der Grund für die fast 100 %ige Leuchthemmung durch die sauren Extrakte von Mähringsbach und Zinnbach.

Für den Juli wurden nur neutrale Fraktionen getestet, da keine sauren Extrakte vorlagen. Sowohl gegenüber *S. capricornutum* als auch gegenüber *C. reinhardtii* zeigen sich in diesem Monat keine signifikanten Hemmungen. Die Wasserqualität im November zeigt leicht erhöhte Effekte bei den Eluaten der Kläranlage und der Wiesent. In beiden Fällen handelt es sich um Stoffe, die das Wachstum von *C. reinhardtii* beeinträchtigen. Die neutralen Extrakte der Bäche sind auch im November durch keine Auffälligkeiten geprägt. Im Januar hebt sich die Leinleiterquelle etwas hervor, wobei vor allem der Effekt von 40 % gegenüber *C. reinhardtii* durch das neutrale Eluat der Fischzuchtquelle auffällt. Die Bachproben vom Januar rufen auch in diesem Monat keine Effekte in den Biotests hervor. Die Wasserqualität bei der Probenahme im Monat April zeigt für die Flüsse der Fränkischen Schweiz keine auffälligen Effekte für die

neutrale Fraktion. Im Falle der Bäche zeigt nur die Probenahmestelle des Mähringsbachs I einen erhöhten Effekt gegenüber *S. capricornutum*.

Die sauren Fraktionen, die bedingt durch die Aufarbeitung einen höheren Anteil an sauren Verbindungen aufweisen, führen im biologischen Monitoring zu den höchsten Effekten. Im Monat November fällt vor allem die Probenahmestelle in Aufseß hinter der Kläranlage auf. Diese zeigt gegenüber *S. capricornutum* einen sehr starken Effekt und gegenüber *C. reinhardtii* ebenfalls eine erhöhte Hemmung des Wachstums. Auch bei den Bächen sind die sauren Extrakte des Novembers, vor allem diejenigen des Zinnbachs, wachstumshemmend. Ebenso die sauren Extrakte des Mähringsbachs zeigen eine leichte Wachstumshemmung gegenüber *S. capricornutum*. Im Monat Januar treten hohe Wachstumshemmungen gegenüber *S. capricornutum* nur bei den Flüssen der Fränkischen Schweiz auf. Die Hemmungen werden durch diejenigen Eluate verursacht, die von Probenahmestellen stammen, die im Flussverlauf der Aufseß und der Wiesent genommen wurden. Auffällig ist hier die starke Hemmwirkung des Eluats der Fischzuchtquelle gegenüber *C. reinhardtii*, die nicht gegenüber *S. capricornutum* auftritt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich hier wahrscheinlich um andere Verbindungen handelt, die in den übrigen Fällen für eine Hemmung des Wachstums von *S. capricornutum* sorgen. Bei den sauren Eluaten der beiden Bäche treten im Monat Januar überhaupt keine Hemmungen auf. Im Monat April führt keines der sauren Eluate der Flussproben der Fränkischen Schweiz zu bedeutenden Effekten, ausgenommen die Wiesentprobe, die einen Effekt von etwa 30 % gegenüber *S. capricornutum* aufweist. Hingegen zeigen die sauren Eluate der beiden Bäche stärkere Hemmungen gegenüber der Alge *S. capricornutum*.

Bei den gemessenen Effekten handelt es sich um Summeneffekte, die durch die mittelpolare bis polare Fraktion des organischen Inventars der Probe verursacht werden. Eine toxizitätsgeleitete Fraktionierung ließ sich aufgrund der gering belasteten Verbindungen nicht durchführen. In dieser Arbeit beschränkte sich die Untersuchung der Effekte auf die mittelpolare bis polare Fraktion. Es darf jedoch dabei nicht außer acht gelassen werden, dass auch Metalle infolge von Versauerung oder anthropogenem Eintrag in für das jeweilige Ökosystem unnatürlich hohen Konzentrationen auftreten und somit das ökologische Gleichgewicht stören können. Baun *et al.* [1998] haben bei einer Untersuchung von Flusswasser festgestellt, dass die nicht aufgearbeitete Probe toxischer ist als nach ihrer Aufarbeitung. Dies erklärten sie mit der Anwesenheit von Stoffen, die durch die Festphasenextraktion nicht angereichert werden wie beispielsweise Metalle. Dies trifft für die

hier durchgeführte Untersuchung jedoch nicht zu, da die natürlichen Proben keine Effekte verursachten.

Die gemessenen Effekte können auf möglichen synergistischen Wirkungen beruhen, so dass es trotz subletaler Konzentrationen zu einem messbaren Effekt kommen kann. Schadstoffe, die nicht gemessen wurden, aber potentiell vorkommen können wie Organophosphat-Insektizide, verstärken beispielsweise die Wirkung von Atrazin [Pape-Lindstrom & Lydy, 1997] gegenüber Mücken. Nach Grimme *et al.* [1998] überwiegen jedoch die Effekte, die als additiv einzustufen sind, wie in einem Forschungsvorhaben gezeigt werden konnte. Sie testeten Mischungen einer großen Anzahl Stoffe mit ähnlicher und bekannterweise unähnlicher Wirkung gegenüber Algen und Leuchtbakterien und wiesen anhand zweier Konzepte, der Konzentrations-Additivität und der Unabhängigen-Wirkung, nach, dass synergistische Effekte selten auftreten. Der größte Anteil der Umweltchemikalien, die im Wasser vorkommen, haben eine narkotische Wirkung und tragen so zur Basistoxizität bei. Diese Wirkung ist nicht nur auf lipophile Verbindungen beschränkt, sondern schließt auch polare Stoffe wie Arzneimittel mit unterschiedlichen Wirkmechanismen ein, wie Escher *et al.* [2002] anhand einer Modellmembran zeigen konnten. Auch hier ist, obwohl viele dieser Chemikalien in Gewässern unterhalb ihrer Wirkungsschwelle auftreten, mit einer kumulativen Basislinientoxizität durch Überschreiten der Toxizitätsschwelle zu rechnen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die neutralen Eluate mit Ausnahme der Fischzuchtquelle, keine auffälligen Wachstumshemmungen verursachen. Jedoch treten vor allem im November und im Januar durch die sauren Eluate der Flusswasserproben der Fränkischen Schweiz erhöhte Wachstumshemmungen auf. Dagegen sind es bei den Bächen die sauren Eluate der Monate November und April, die eine Wachstumshemmung verursachen. Man kann von keiner der beprobten Fließgewässer von einer Hintergrundbelastung sprechen, da dies bedeuten würde, dass eine erhöhte Basistoxizität zu beobachten wäre.

6 Zusammenfassung

Zur Untersuchung der Wasserqualität von drei Fließgewässern aus der Fränkischen Schweiz, der Leinleiter, der Aufseß und der Wiesent und zwei Fließgewässern aus Nordostoberfranken, dem Mähringsbach und dem Zinnbach, wurden diese Flüsse vierteljährlich während eines Jahres beprobt. Untersucht wurde die mittelpolare bis polare Fraktion der Wasserinhaltsstoffe. Da es sich um relativ gering belastete Fließgewässer handelte, stellte dieses Monitoring-Programm besonders für die Planung und Durchführung der ökotoxikologischen Untersuchungen eine besondere Herausforderung dar. Anhand einer Gruppe von Leitanalyten, bestehend aus Herbiziden und einiger ihrer Metabolite, wurden Methoden für die analytischen und die ökotoxikologischen Untersuchungen erarbeitet. Die ökotoxikologischen Eigenschaften wurden an 45- und 100-fach aufkonzentrierten organischen Extrakten ermittelt. Ein wichtiges Ziel der Arbeit war es, den über die Wirkungstests ermittelten Effekten die auslösenden Substanzen analytisch zuordnen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Extrakte in Fraktionen unterteilt.

Eine zunächst eingesetzte HPLC-Methode reichte nicht aus, um die erforderlichen Nachweisgrenzen zu erzielen. Dies war durch den Anreicherungsschritt bedingt, der einen großen Anteil der organischen Matrix mit erfasste. Dadurch traten viele Störsubstanzen im UV-Chromatogramm auf, die die Identifizierung der Leitsubstanzen beeinträchtigten. Mittels einer LC-MS/MS-Methode konnten diese in Bereichen zwischen 0,5-10 ng/l detektiert werden. Auch die ökotoxikologischen Methoden mussten sich durch eine hohe Empfindlichkeit ausweisen. Hierzu musste jeder Schritt durch Leerwerte abgesichert werden, um toxische Artefaktbildung durch die Aufarbeitung zu vermeiden. Auch die Qualitätssicherung wurde auf die Anforderungen von ökotoxikologischen Testmethoden abgestimmt. Ziel war es, die Leerwerte und deren Schwankungen so gering wie möglich zu halten, um eine entsprechend hohe Aussagekraft auch für die niedrigen Effekte zu erhalten. Durch die Anreicherung der organischen Verbindungen wurde die Empfindlichkeit für beide Untersuchungssysteme erhöht.

Von den beiden untersuchten Regionen wiesen die Fließgewässer der Fränkischen Schweiz eine höhere Herbizidbelastung als diejenigen des Nordostens Oberfrankens auf. Atrazin und Desethylatrazin waren während des gesamten Jahres in allen Proben nachzuweisen, wobei in der Fränkischen Schweiz die Konzentrationen zwischen 50 – 200 ng/L und in Nordostoberfranken zwischen 1 – 10 ng/L lagen. Eine Ausnahme dabei bildete eine Quelle in der Nähe des Ortes Aufseß, die im Mittel 600 ng/L Atrazin aufwies. Während der Wachstumsphase wurde im Juni in der Aufseßquelle eine einmalige Konzentration von 580

ng/L festgestellt. Außer diesen beiden Analyten wurden keine weiteren Herbizide im Märingsbach und Zinnbach nachgewiesen, jedoch ließen sich in Aufseß, Leinleiter und Wiesent Metolachlor, Metazachlor, Diuron und Isoproturon messen. Ihre Konzentrationen lagen dabei im niedrigen ng/L-Bereich. Atrazin, Diuron und Isoproturon kommt eine besondere Bedeutung zu, da sie in der Liste der "prioritär gefährlichen Substanzen" in der europäischen Wasserrahmenrichtlinie aufgeführt werden.

Die durch die Anreicherung gewonnenen neutralen und sauren Fraktionen der Wasserproben erzielten in allen drei Biotests Effekte zwischen 0 und 100 %. Dabei erwies sich der MicrotoxTM-Test als der empfindlichste der drei Tests. Während bei den neutralen Fraktionen nur Effekte bis zu 10 % bestimmt wurden, waren bei den sauren Fraktionen in allen drei Tests Effekte bis zu 100 % zu verzeichnen. Die sauren Fraktionen enthalten vor allem Phenole, Carbonsäuren und organische Verbindungen mit aziden OH-Gruppen. Ausgenommen davon war wiederum eine Probe der Quelle nahe des Ortes Aufseß, deren neutrale wie auch saure Fraktion eine Hemmung von 40 % gegenüber der Alge *C. reinhardtii* aufwies. Hier dürfte die hohe Atrazinkonzentration von etwa 60 µg/L im Extrakt ausschlaggebend gewesen sein. Diese Annahme unterstützt der negative Effekt gegenüber der Alge *S. capricornutum*, die eine geringere Sensitivität gegenüber Atrazin aufweist. Im allgemeinen reagierte diese Alge jedoch empfindlicher auf die Flusswasserextrakte. Die höchsten Effekte wurde in der Nähe von Ortschaften bzw. Kläranlagen gemessen. Dies zeigt, dass sich im Biotest eine Veränderung der chemischen Beschaffenheit selbst in niedrig belasteten Fließgewässern manifestiert. Ein Zusammenhang zwischen den nachgewiesenen Herbiziden und den ermittelten Effekten scheint jedoch nicht zu bestehen. Eine weitere HPLC-Fraktionierung der Extrakte mit hohen Effekten brachte keine neuen Informationen über potentiell wirksame Verbindungen, da die damit verbundene Verdünnung des Extrakts mit einem Empfindlichkeitsverlust gegenüber den Biotests einherging.

Darüber hinaus wurden auch die Parameter DOC und AOX auf ihren Einfluss in den Biotests überprüft. Es konnte jedoch keine signifikante Korrelation festgestellt werden und somit auch keine direkte Abhängigkeit der gemessenen Effekte von diesen Parametern.

Das Monitoring zeigt, dass mittels Biotest und einer entsprechenden Aufarbeitung der Probe auch in gering belasteten Gewässern Änderungen der natürlichen Wasserzusammensetzung nachweisbar sind. Da eine Vielzahl von Verbindungen diese Effekte verursachen können, eine analytische Bestimmung alle in Frage kommenden Verbindungen jedoch zu aufwendig wäre, sind Biotest ein geeignetes Verfahren, um die Beschaffenheit von gering belastetem Wasser zu überwachen.

7 Abstract

In this work the quality of surface waters of two rural regions of Southern Germany, the rivers Aufsess, Leinleiter and Wiesent of Franconian Switzerland and the streams Mähringsbach and Zinnbach of the northeast of Upper Franconia have been investigated. The pollution of water being insignificant, the monitoring program had to be dedicated intensively to the planning and the feasibility of the ecotoxicological test. The ecotoxicological and analytical methods have been established with the help of a few herbicides and some of their metabolites. One part of the work deals with the determination of the ecotoxicological properties of the 45- and 100fold concentrated water extracts. An important aim of the work was to relate the ecotoxicological effects to the responsible substances, which was realised by dividing the extracts into fractions with different properties.

A HPLC-method used at first was not sensitive enough for the concentration of the herbicides in the real samples. The low sensitivity is due to the concentration procedure which does not include any purification step and consequently the chromatogram shows many matrix peaks. By means of a LC-MS/MS-method the test substances could be detected up to concentrations of 0.5 -10 ng/L. The ecotoxicological methods also had to be very sensitive. So each step had to be checked if any additional toxicity existed. The additional toxicity had to be low so that the effects on the organisms caused by the sample could be distinguished clearly. The sensitivity of both systems could be improved by the concentration step of the organic substances.

Among the two investigated regions, the rivers of Franconian Switzerland showed higher herbicide concentrations than the rivers of Upper Franconia. During the whole monitoring program Atrazine and Desethylatrazine have been detected in all samples. All over the year the concentration in the rivers of Franconian Switzerland was between 50-200 ng/L and in the streams of northeast of Upper Franconia between 1-10 ng/L, but in June, during the agricultural growth period, the concentrations in the source of the Aufseß amounted to 580 ng/L of Atrazine. Another exception was a source near the village of Aufseß, where the concentrations were 600 ng/L of Atrazine on an average.

Apart from these two analytes, in the streams Mähringsbach and Zinnbach no other herbicides could be detected. The rivers Aufsess, Leinleiter and Wiesent, however, contain Metolachlor, Metazachlor, Diuron and Isoproturon. The concentrations were in the low ng/L-range. These herbicides are of special importance because they appear in the "priority list of hazardous compounds" of the European Water Guideline.

Two fractions have been obtained by the concentration step: an acidic one and a neutral one. The effects of all three biotests ranged between 0-100 %. The MicrotoxTM-test was the most sensitive test. The acidic fractions showed effects up to 100 % in contrast to the neutral fractions which only showed effects up to 10 %. It must be mentioned that the acidic fraction contains phenols, carbonacids and organic compounds with acidic protons by its own nature. In the algal test with *C. reinhardtii* one sample, however, shows effects of 40 % in both fractions. In this case the high concentration of Atrazine is probably the responsible toxicant. This assumption is supported by the fact that the alga *S. capricornutum* which is less sensitive to Atrazine, does not show any effect to these fractions. However, *S. capricornutum* in general reacted more sensitively to the extracts than the other alga. The highest effects were measured near villages and waste water treatment plants, which shows that biotests even reveal a change of the chemical composition of low polluted water. A relation between the detected herbicides and the observed effects could not be found. Another fractionation of the extracts with high effects realised by a HPLC-procedure did not reveal new information about potentially hazardous substances. In this case you have to take into account that this chromatographic separation leads to a dilution of the sample, a consequence of which is a loss of sensitivity of the biotest.

Furthermore, other parameters like dissolved humic substances and adsorbable halogenated compounds have been determined and tested with regard to their possible influence on the effects in the biotests, but no significant dependence between the measured effects and these parameters could be observed.

The monitoring shows that with the help of biotests and a corresponding preparation of the sample changes of natural water composition are detectable even in low polluted waters. An analysis of the many different compounds which might cause these effects would be too expensive and complex, so the biotest is an appropriate instrument to get basic information about low polluted waters.

8 Anhang

8.1 Chemikalienliste

Herbizide und Metabolite	Reinheitsgrad	Firma
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	99 %	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
2,4-Dichlorpropionsäure	99 %	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
2,4-Dinitrophenol	puriss. > 99 %	Fluka, Buchs, Schweiz
3,4-Dichloranilin	-	Eastman GmbH
3-Chlor-4-methylanilin	> 99 %	Riedel-de-Hæn, Hannover
Atrazin	99 %	Riedel-de-Hæn, Hannover
Bromacil	> 99,2 %	Inst. Poland ¹
Bromoxynil	99,3 %	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Desethylatrazin	> 99 %	Inst. Poland ¹
Diuron	99 %	Riedel-de-Hæn, Hannover
Huminstoffe		Riedel-de-Hæn, Hannover
Isoproturon	> 99,5 %	Inst. Poland ¹
Metazachlor	> 99,7 %	Inst. Poland ¹
Methylchlorphenoxyessigsäure	99,7 %	Dr. Ehrenstorfer, Augsburg
Metolachlor	> 97,7 %	Inst. Poland ¹
Monolinuron	99 %	Riedel-de-Hæn, Hannover
Simetryn	99 %	Riedel-de-Hæn, Hannover

¹ Institute of Organic Industrial Chemistry, Warsaw, Poland

Salze, Säuren und Lösungsmittel	Reinheitsgrad	Firma
Acetonitril	HPLC-grade $\geq 99,8$ %	J.T. Baker, Holland
Essigsäure	p.a. $\geq 99,7$ %	Roth, Karlsruhe
Methanol	Picograde ≥ 99 %	Promochem, Wesel
Na ₂ HPO ₄	p.a.	Merck, Darmstadt
NaCl	p.a.	Merck, Darmstadt
NaOH	p.a. ≥ 99 %	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, p.a.	> 95 %	Merck, Darmstadt

8.2 Probenahmezeitplan

Tab. 8.1: Fließgewässer der Fränkischen Schweiz

Probenahmestelle	Probenahmezeitpunkt				
	Frühjahr 2000	Sommer 2000	Herbst 2000	Winter 2000 / 2001	Frühjahr 2001
Karstquelle/ Fischzuchtbetrieb	-	-	30.11.	23.01.	-
	Aufseß				
Quelle	08.06.	20.07.	30.11.	28.01.	04.04.
Höhe Oberaufseß	08.06.	20.07.	14.11.	28.01.	04.04.
1 km nach der Kläranlage Aufseß	08.06.	20.07.	14.11.	28.01.	04.04.
	Leinleiter				
Quelle	08.06.	20.07. 15.08.	14.11.	28.01.	04.04.
Höhe Gasseldorf	08.06.	20.07.	14.11.	28.01.	04.04.
	Wiesent				
Höhe Kirchehrenbach	08.06.	20.07. 31.07. 14.08.	14.11.	28.01.	04.04.

Tab. 8.2: Fließgewässer Nordostoberfrankens

Probenahmestelle	Probenahmezeitpunkt			
	Sommer 2000	Herbst 2000	Winter 2000 / 2001	Frühjahr 2001
	Mähringsbach			
Östlich	20.07.	06.12	31.01.	05.04.
Westlich	20.07.	06.12	31.01.	05.04.
	Zinnbach			
Timpermühle	20.07.	06.12	31.01.	05.04.
Huscherkmühle	20.07.	06.12	31.01.	05.04.

8.3 Physiko-chemische Parameter der Flussproben

8.3.1 Methoden

8.3.1.1 pH-Wert-Messung

Zur Messung des pH-Wertes wurde eine pH-Elektrode von Brandt verwendet. Sie wurde vor jeder Messreihe jeweils mit einem Puffer von pH 7 und pH 4 kalibriert. Da das Wasser der beiden Bäche eine geringe Ionenstärke aufweist, ist zur Bestimmung des pH-Wertes ein spezielles pH-Meter, ein sogenanntes Schliffdiaphragma, erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit stand jedoch ein solches nicht zur Verfügung, deshalb wurde die Ionenstärke durch Zusatz von NaCl erhöht und der pH-Wert auf diese Weise bestimmt [Hütter, 1994].

8.3.1.2 DOC-Bestimmung

Die Messung wurde mit einem TOC 5050-Gerät der Fa. Shimadzu durchgeführt. Die Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) erfolgte nach Ansäuern der Probe mit Phosphorsäure (25 %ig) auf pH 1 durch Verbrennen an einem Katalysator (Pt/Al₂O₃) bei 700°C zu Kohlendioxid, welche mittels Infrarot-Detektion gemessen wurde. Es wurden mindestens drei Aliquote gemessen, gegebenenfalls so oft bis der Variationskoeffizient kleiner als 5 % war. Die Bestimmungsgrenze liegt bei 0.2 mg/L.

8.3.1.3 AOX-Bestimmung

Die AOX-Bestimmung erfolgt mit der Säulenmethode nach DIN EN 1485. Verwendet wird dazu ein Multi X 2000 von Analytik-Jena. Es wurde eine Probemenge von 100 ml eingesetzt. Der optimale Messbereich liegt zwischen 5 µg/l und 800 µg/l.

8.3.1.4 Bestimmung der Ionen

Die Konzentrationen der Kationen Ca²⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺ und NH₄⁺ und der Anionen SO₄²⁻, Cl⁻, NO₃⁻ wurden in der Zentralen Analytik des BITÖK's untersucht. Die Messung der Alkali- und Erdalkaliionen erfolgte mittels Atomemissionsspektroskopie im induktiv-gekoppelten Plasma (ICP-AES). Ionenchromatographisch (DIONEX DX 100) wurden die Anionen und NH₄⁺ analysiert. Bestimmungsgrenzen und Unsicherheit der Messungen sind in Tab. 8.3 aufgeführt.

Tab. 8.3: Nachweisgrenzen der Ionenanalytik (*Quelle:* Römpf, 1999)

	Na ⁺	K ⁺	Mg ⁺	Ca ²⁺	NH ₄ ⁺	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
Bestimmungsgrenze [mg/L]	0,2	0,26	0,056	0,23	0,38	0,47	0,45	0,58
Unsicherheit [%]	2,9	1,6	1,7	1,2	3,9	2,3	2,2	2,9

8.3.2 Zusammensetzung der Flusswasserproben

8.3.2.1 Leitfähigkeit, pH, DOC- und AOX-Gehalte

Tab. 8.4: Leitfähigkeit der untersuchten Proben in $\mu\text{S}/\text{cm}$

Datum	08.06.00	20.07.00	14.11.- 6.12.00	23.-31.1.01	5.4.01
Jahreszeit	Frühjahr	Sommer	Herbst	Winter	Frühjahr
Fischzuchtquelle	n.b.	n.b.	748	756	n.b.
Aufseß/Quelle	706	662	672	613	n.b.
Aufseß/Oberaufseß	709	690	690	632	n.b.
Aufseß/Kläranlage	693	674	676	684	n.b.
Leinleiter/Quelle	709	588	685	621	n.b.
Leinleiter/Gasseldorf	621	551	602	568	n.b.
Wiesent/Pretzfeld	583	586	628	587	n.b.
Mähringsbach I	n.b.	85	110	135	136
Mähringsbach II	n.b.	114	111	133	132
Zinnbach/Timpermühle	n.b.	80	111	123	127
Zinnbach/Huschermühle	n.b.	130	170	166	166

n.b.: nicht bestimmt

Tab. 8.5: pH-Werte der untersuchten Proben

Datum	08.06.00	20.07.00	14.11.- 6.12.00	23.- 31.1.01
Jahreszeit	Frühjahr	Sommer	Herbst	Winter
Wiesent/Pretzfeld	8.39	8.11	8.25	7.97
Leinleiter/Gasseldorf	8.02	7.98	8.27	7.84
Leinleiter/Quelle	7.52	7.41	7.24	6.84
Aufseß/Quelle	7.46	7.35	7.4	7.18
Aufseß/Oberaufseß	8.11	8.04	7.97	7.44
Aufseß/Kläranlage	8.37	7.98	8.06	8.00
Fischzuchtquelle	-	-	7.6	7.37
Mähringsbach I	-	8.62	8.13	7.24
Mähringsbach II	-	7.9	7.39	7.25
Zinnbach/Timpermühle	-	8.03	7.51	7.09
Zinnbach/Huschermühle	-	7.9	7.49	6.98

Tab. 8.6: AOX-Konzentrationen in µg/L

Probenahmestelle	Sommer	Winter
Wiesent/Pretzfeld	10.10	4.30
Leinleiter/Gasseldorf	8.10	5.10
Leinleiter/Quelle	5.50	4.60
Aufseß/Quelle	4.50	4.10
Aufseß/Oberaufseß	5.10	3.95
Aufseß/Kläranlage	9.40	8.30
Fischzuchtquelle	n.b.	3.80
Mähringsbach I	8.50	9.40
Mähringsbach II	7.10	10.00
Zinnbach/Timpermühle	10.50	18.10
Zinnbach/Huschemühle	10.80	16.30

n.b.: nicht bestimmt

Tab. 8.7: DOC-Konzentrationen in mg/L

Datum	08.06.00	20.07.00	14.11.+ 6.12.00	23. + 31.1.01	8. + 9.4.01
Jahreszeit	Frühjahr	Sommer	Herbst	Winter	Frühjahr
Fischzuchtquelle	-	-	1,3	n.b.	n.b.
Aufseß/Quelle	2,6	2,6	3,0	3,6	2,5
Aufseß/Oberaufseß	3,5	2	2,4	3,2	2,1
Aufseß/Kläranlage	2,5	2,7	2,0	1,4	3,1
Leinleiter/Quelle	3,7	2,1	1,3	4,2	1,7
Leinleiter/Gasseldorf	3,9	4,1	3,0	1,5	2,2
Wiesent/Pretzfeld	5,0	3,7	2,5	1,4	2,0
Mähringsbach I	-	3,8	2,5	4,1	5,3
Mähringsbach II	-	3,7	2,6	5,6	3,7
Zinnbach / Timpermühle	-	4,1	2,9	6,3	3,0
Zinnbach / Huschemühle	-	5,2	3,8	3,5	3,4

n.b.: nicht bestimmt

8.3.2.2 Ionenkonzentrationen der Flussproben

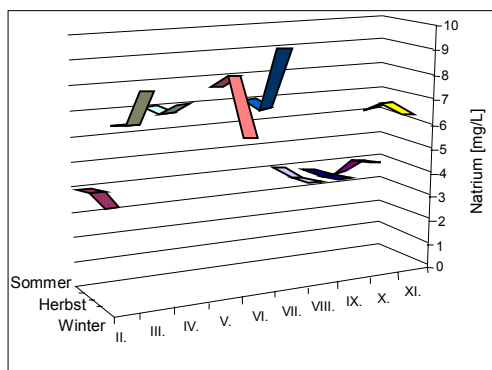
Die römischen Zahlen entsprechen folgenden Probenahmestellen:

Probenahmestellen in der Fränkischen Schweiz

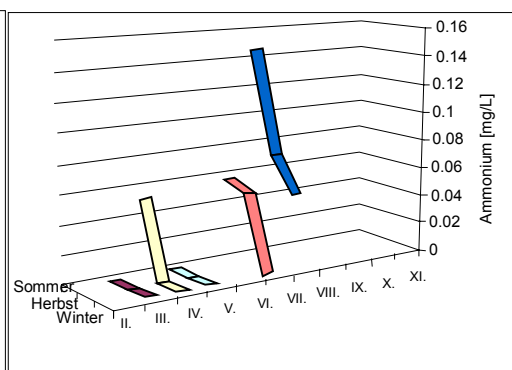
- I. Karstquelle der Fischzuchtanstalt
- II. Aufseß/Quelle
- III. Aufseß/Oberaufseß
- IV. Aufseß/Kläranlage
- V. Leinleiter/Quelle
- VI. Leinleiter/Gasseldorf
- VII. Wiesent/Pretzfeld

Probenahmestellen im Nördlichen Fichtelgebirge

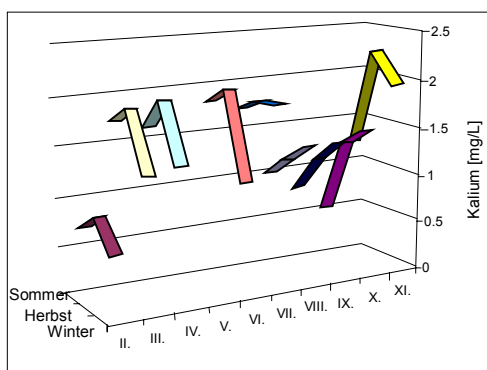
- VIII. Mähringsbach/westl.
- IX. Mähringsbach/östl.
- X. Zinnbach/Schanz
- XI. Zinnbach/Huschemühle

Kationen

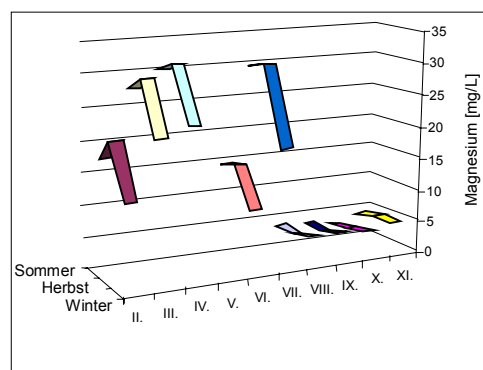
Natrium



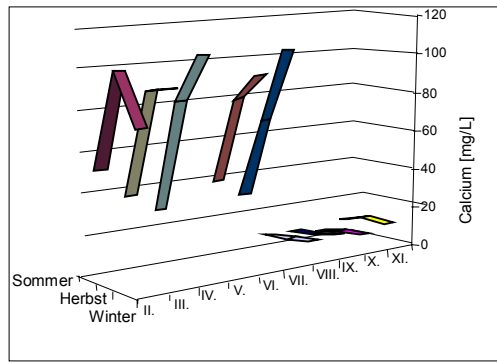
Ammonium



Kalium

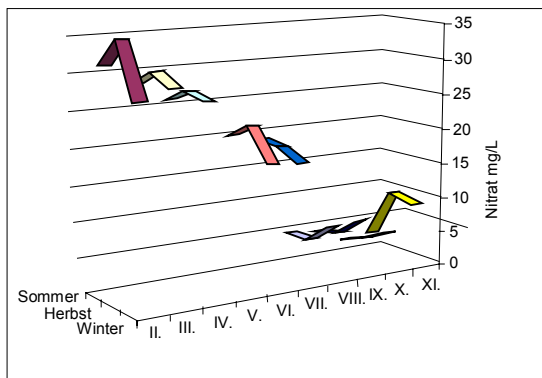


Magnesium

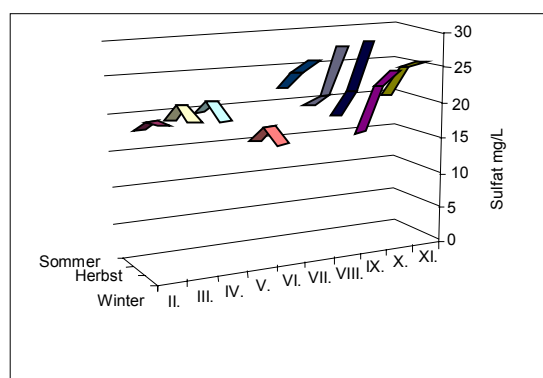


Calcium

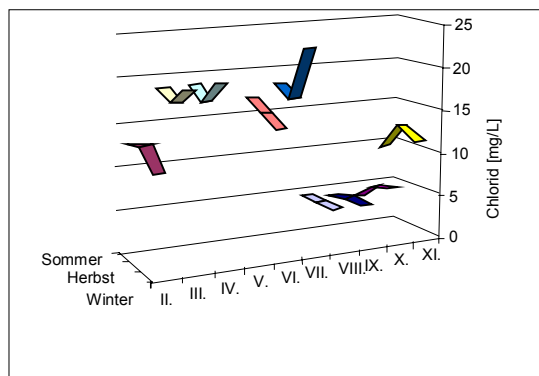
Anionen



Nitrat



Sulfat



Chlorid

8.4 Analytische Untersuchung

8.4.1 HPLC - Parameter

Tab. 8.8: UV-Absorptionsmaxima der Leitanalyten

Herbizid	Wellenlänge [nm]	Herbizid	Wellenlänge [nm]	Herbizid	Wellenlänge [nm]
Atrazin	200 (1) 270 (0,2)	2,4-Dinitrophenol	363 (1) 224 (0,7)	Bromacil	213 (1) 279 (0,8)
Diuron	212 (1) 251 (0,6)	MCPA	199 (1) 231 (0,4)	2,4-D	200 (1) 231 (0,3) 287 (0,1)
3-Chlor-4-methylanilin	207 (1) 239 (0,3)	Metolachlor / Metazachlor	200 (1)	Isoproturon (pH 6)	208 (1) 243 (0,8)

In Klammern: relative Intensitäten

Tab. 8.9: Chromatographische Bedingungen für die HPLC-DAD-Methode

Säule	Nucleosil, 100-10-C18, 10 µm, 200 x 4,0 mm
Detektion:	Wellenlängenbereich: 200 - 400 nm L-4500 Diodenarray-Detektor (Fa. Merck-Hitachi)
Ternäre Niederdruck Pumpe:	L-6200 A Intelligent Pump (Fa. Merck-Hitachi)
Interface:	D 6000 Interface (Fa. Merck-Hitachi)
Injektor:	Rheodyne-Ventil
Injektionsvolumen:	100 µL
Mobile Phasen	A: 5 mM Phosphatpuffer, pH7; B: Acetonitril
Gradient:	15 min: 85 % A 40 min: 50% A 45 min: 15 % A 46 min: 100 % B 60 min: 100 % B
Fluss:	1 ml/min
Datenaufnahme:	50 min

8.4.2 MS-MS-Einstellungen

Tab. 8.10: Einstellungen am APCI-3000 für alle Analyten gemessen im positiven Modus

Analyt	DP	FP	EP	CE	CXP
Atrazin	32	200	-8	26	9
Desethylatrazin	51	290	-10	27	8
Metolachlor	91	120	-10	21	14
Metazachlor	26	180	-10	17	12
Bromacil	46	290	-10	19	12
Diuron	41	270	-10	41	12
Isoproturon	51	270	-10	35	12
Monolinuron	36	170	-10	25	6
3,4-Dichloranilin	35	200	-10	30	15
3-Chlor-4-methylanilin	30	200	-10	30	15

Tab. 8.11: Einstellungen am APCI-3000 für alle Analyten gemessen im negativen Modus

Analyt	DP	FP	EP	CE	CXP
2,4-D	-46	-80	10	-20	-7
MCPA	-60	-200	10	-30	-5
2,4-DP	-16	-100	5	-16	-13
Bromoxynil	-46	-200	10	-42	-1
3,4,5-Trichlorphenol	-50	-280	5	-26	-13
2,4-DNP	-36	-210	10	-34	-5

8.5 Ökotoxikologische Untersuchungen

8.5.1 Nährmedium für Algen

Tab. 8.12: Nährmedium nach Kuhl [1962]

Makroelemente	Konzentration [mg/L]	Spurenelemente	Konzentration [µg/L]
KNO ₃	1010	H ₃ BO ₃	61
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	620	FeSO ₄ • 7 H ₂ O	6950 (25 µM)
Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	89,0	Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	1860 (5,5 µM)
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	247	MnSO ₄ • H ₂ O	169
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	14,7	ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	287
		CuSO ₄ • 5 H ₂ O	2,5
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4 H ₂ O	12,4

8.5.2 Kontrollkarten für den Fluoreszenzparameter F_v/F_m : Jahr 2000

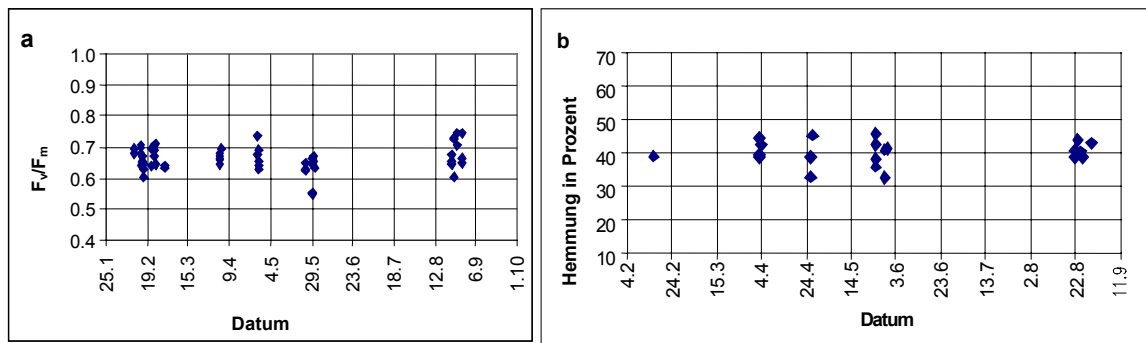


Abb. 8.1: unbelastete Kontrolle (a) und Qualitätskontrolle, 100 µg/L Atrazin (b)

8.5.3 Dosis-Wirkungsbeziehung im Mikrotiterplattentest mit *C. reinhardtii*

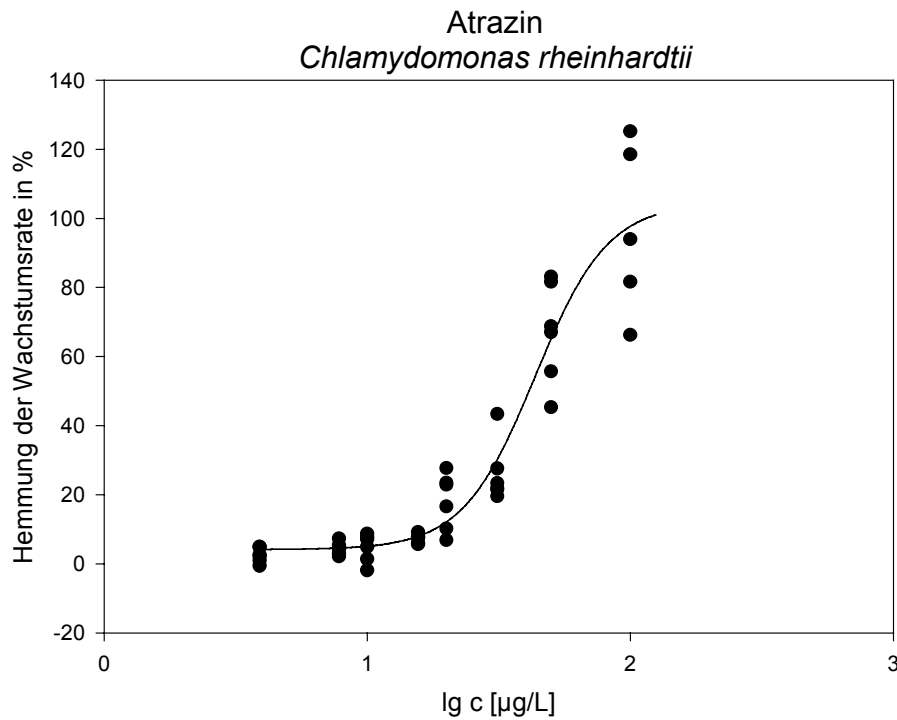


Abb. 8.2: Dosis-Wirkungsbeziehung von Atrazin, Y-Werte: Darstellung der Einzelwerte

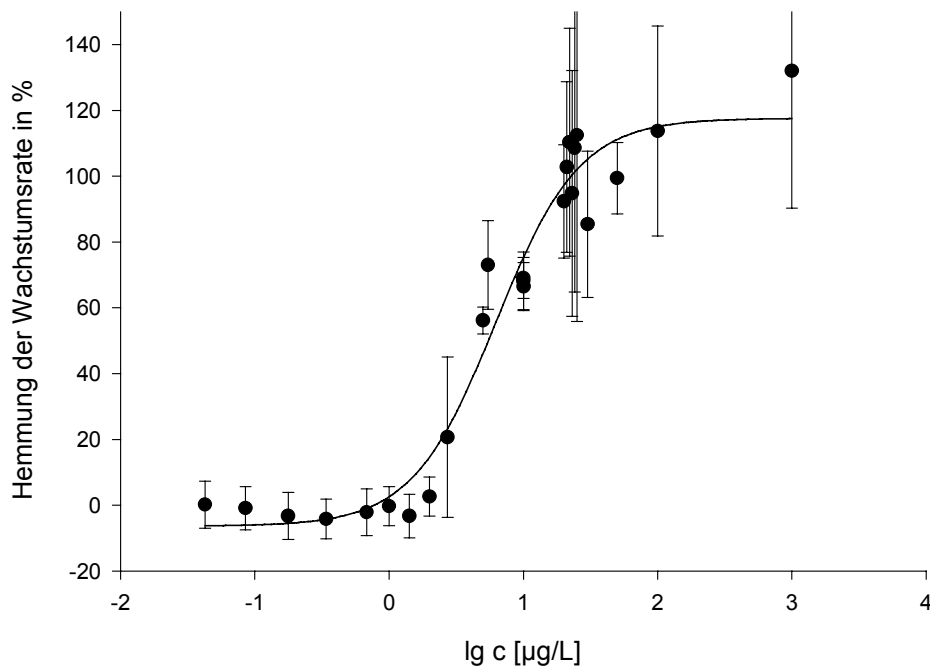


Abb. 8.3: Dosis-Wirkungsbeziehung von 3,4-Dichloranilin, Y-Werte: Darstellung der Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung

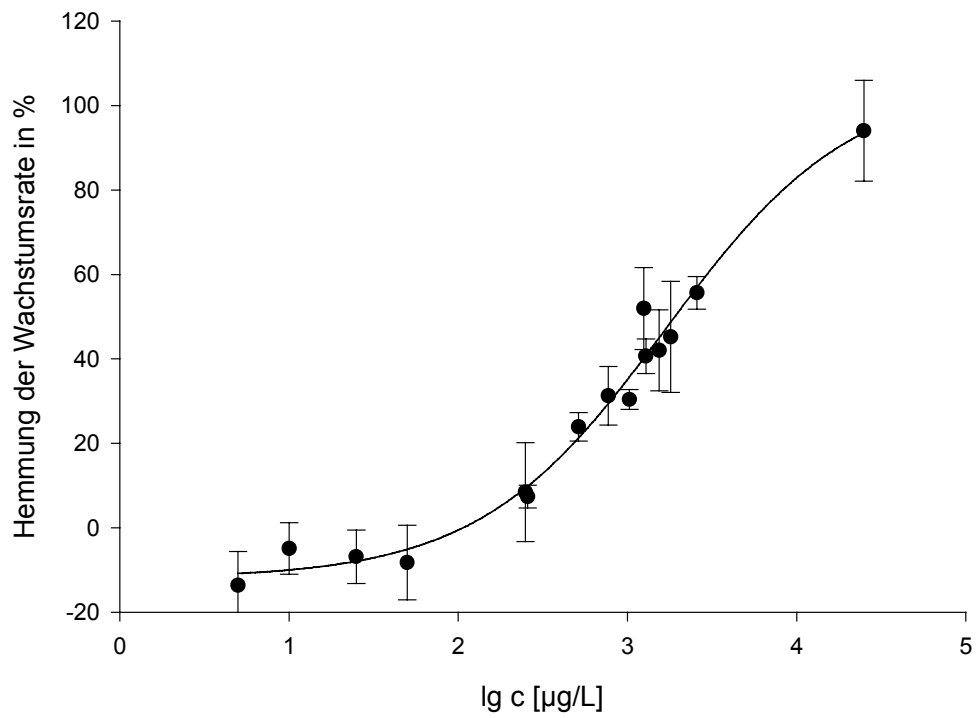


Abb. 8.4: Dosis-Wirkungsbeziehung von Desethylatrazin, Y-Werte: Darstellung der Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung

9 Literaturverzeichnis

- AGERTVED J., RÜGGE K. & BARKER J.F. (1992) Transformation of the Herbicides MCPP and Atrazine under Natural Aquifer Conditions. *Ground Water* **30**, 500-506.
- AGUILAR C., BORRULL F. & MARCÉ R.M. (1996) On-line and off-line solid-phase extraction with styrene-divinylbenzene-membrane extraction disks for determining pesticides in water by reversed-phase liquid chromatography-diode-array detection. *Journal of Chromatography A* **754**, 77-84.
- AITKEN M.D., MASSEY I.J., CHEN T. & HECK P.E. (1994) Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Water Research* **28**, 1879-1889.
- ALLNER, B. Toxikokinetik von 3,4-Dichloranilin beim dreistachligen Stichling (*Gasterosteus aculeatus*) unter besonderer Berücksichtigung der Fortpflanzungsphysiologie. 1997. Universität Mainz, Dissertation.
- ARCHIBALD F., VALEANU L., LEICHTLE G. & GUILBAULT B. (1998) Nonspecific chlorination of organics: a chemistry unique to human industry? (Putting kraft mill AOX emissions into perspective). *Water Quality Research Journal of Canada* **33**, 347-362.
- ARNDT U. (1974) The Kautsky effect: A method for the investigation of the action of air pollutants in chloroplasts. *Environmental Pollution* **6**, 181-194.
- ASPERGER A., EFER J., KOAL T. & ENGEWALD W. (2001) On the signal response of various pesticides in electrospray an atmospheric pressure chemical ionization depending on the flow-rate of eluent applied in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **937**, 65-72.
- ASPLUND G. & GRIMVALL A. (1991) Organohalogenes in nature - more widespread than previously assumed. *Environ.Sci.Technol.* **25**, 1346-1350.
- BACH, M., HUBER, A., FREDE, H. G., MOHAUPT, V., AND ZULLEI-SEIBERT, N. Schätzung der Einträge von Pflanzenschutzmitteln aus der Landwirtschaft in die Oberflächengewässer Deutschlands. Umweltbundesamt. 3/00, 1-287. 2000. Berlin, Erich Schmidt Verlag. Forschungsbericht 295 24 034 UBA-FB 99-114.
- BAGLIO D., KOTZIAS D. & LARSEN B.R. (1999) Atmospheric pressure ionisation multiple mass spectrometric analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* **854**, 207-220.
- BALTUSSEN E., SNIJDERS H., JANSSEN H.-G., SANDRA P. & CRAMERS C.A. (1998) Determination of phenylurea herbicides in water samples using on-line sorptive preconcentration and high-performance liquid chromatography with UV or electrospray mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **802**, 285-295.
- BARCELÓ D. & HENNION M.-C. (1997) *Trace determination of pesticides and their degradation products in water*. Amsterdam: Elsevier. pp. 1-542.
- BAUN A., BUSSARAWIT N. & NYHOLM N. (1998) Screening of pesticide toxicity in surface water from an agricultural area at Phuket Island. *Environmental Pollution* **102**, 185-190.
- BAUN A., KLÖFT L., BJERG P.L. & NYHOLM N. (1999) Toxicity testing of organic chemicals in groundwater polluted with landfill leachate. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 2046-2053.
- BAYERISCHES LANDESAMT FÜR WASSERWIRTSCHAFT (1994) *10 Jahre PSM-Monitoring in Bayern*
- BEIMBORN D., BRAND G., FISCHER S., FLEMMING H.-C., GRUMMT T., HANSEN P.-D., HOCK B., KANNE R., KOHLER H.-P., LUDWIG W., OBST U., REICHERT S., SCHMID R.D., SCHOLZ-MURAMATSU H., STEINBERG C. & ZABOROSCH C. (1998) Wirkungsbezogene Umweltanalytik. *GIT* **10**, 1058-1062.

- BENECKE, G.; FALKE, W.; SCHMIDT, CH. (1982) Use of algal fluorescence for an automated biological monitoring system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **28** (4), 385-395
- BERENDS A.G., BOUTONNET J.C., DE ROOIJ C.G. & THOMPSON R.S. (1999) Toxicity of trifluoroacetate to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 1053-1059.
- BESTER K., HÜHNERFUSS H., NEUDORF B. & THIEMANN W. (1995) Atmospheric deposition of triazine herbicides in northern Germany and the German bight (North Sea). *Chemosphere* **30**, 1639-1653.
- BILITEWSKI U., BIER F.F., BEYERSDORF-RADECK B., RUGER P., ZISCHKALE F. & SCHMIDT R.D. (1992) Biosensor systems for pesticide Determination in water. *SPIE* **1716**, 176-184.
- BLÜBAUM-GRONAU E., SPEISER O.H. & KREBS F. (1992) Bewertungskriterien für einen Verhaltensfischtest zur kontinuierlichen Gewässerüberwachung. In *Biologische Testverfahren, Beiträge zu den Biotest-Statusseminaren 1989 und 1992*. Eds K.G. Steinhäuser & P.-D. Hansen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. pp. 333-348.
- BOLUDA R., QUINTANILLA J.F., BONILLA J.A., SÁEZ E. & GAMÓN M. (2002) Application of the Microtox® test and pollution indices to the study of water toxicity in the Albufera Natural Park. *Chemosphere* **42**, 355-369.
- BOPP, S. Entwicklung eines Biotestverfahrens zur Toxizitätsabschätzung von Stoffgemischen in Nebelproben. 1-64. 2000. Lehrstuhl für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Universität Bayreuth, Diplomarbeit
- BRACK, W. Ökotoxikologische Bewertung leichtflüchtiger Bestandteile von Deponiesickerwässern. 1-129. 1996. Universität Bayreuth., Dissertation
- BRACK W., ALTENBURGER R., ENSENBACH U., MÖDER M., SEGNER H. & SCHÜÜRMAN G. (1999) Bioassay-Directed Identification of Organic Toxicants in River Sediment in the Industrial Region of Bitterfeld (Germany) - A Contribution to Hazard Assessment. *Arch. Environ. Contamination and Toxicology*
- BRACK W. & FRANK H. (1998) Chlorophyll a Fluorescence: A Tool for the Investigation of Toxic Effects in the Photosynthetic Apparatus. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **40**, 34-41.
- BRACK W., RÖTTLER H. & FRANK H. (1998) Volatile fractions of landfill leaches and their effect on *Chlamydomonas reinhardtii*: in vivo chlorophyll a fluorescence. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* **17**, 1982-1991.
- BREHM J. & MEERTINUS P.D.M. (1996) *Fließgewässerkunde*. Heidelberg: Quelle und Meyer. pp. 1-302.
- BRINGMANN G. & KÜHN R. (1978) Grenzwerte der Schädwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Blaualgen (*Microcystis aeruginosa*) und Grünalgen (*Scenedesmus quadricauda*) im Zellvermehrungshemmtest. *Vom Wasser* **50**, 45-60.
- BUDZIKIEWICZ H. (1998) *Massenspektrometrie Eine Einführung*. 4. Auflage Ed. Weinheim: W. pp. 1-189.
- BUECHEL C. & WILHELM Ch. (1993) In vivo analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: progress, problems and perspectives. *Photochem. Photobiol.* **58**, 137-148.
- CAMPANELLA L., CUBADDA F., SAMMARTINO M.P. & SAONCELLA A. (2000) An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Research* **35**, 96-76.
- CANCILLA D.A., HOLTKAMP A., MATASSA L. & FANG X. (1997) Isolation and characterization of Microtox-active components from aircraft de-icing/anti-icing fluids. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 430-434.
- CAPPIELLO A., FAMIGLINI G., MANGANI F., ANGELINO S. & GENNARO M.C. (1999) Simultaneous Determination of Acidic and Basic-Neutral Pesticides in Water at ppt Concentration Level by Ion-Interaction Micro-HPLC/MS. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 3905-3910.

- CASTILLO M. & BARCELÓ D. (1999) Identification of Polar Toxicants in Industrial Wastewaters Using Toxicity-Based Fractionation with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **71**, 3769-3776.
- CAUX P.-Y., MÉNARD L. & KENT R.A. (1996) Comparative Study of the effects of MCPA, Butylate, Atrazine, and Cyanazine on *Selenastrum Capricornutum*. *Environmental Pollution* **92**, 219-225.
- CEGLAREK U., EFER J., SCHREIBER A., ZWANZIGER E. & ENGEWALD W. (1999) Determination of linear alkylbenzenesulfonates in communal wastewater by means of solid phase microextraction coupled with API-MS and HPLC-FLD. *Fresenius' J.Anal.Chem.* **365**, 674-681.
- CHAO, M.-R. AND CHEN, C.-Y. Discrepancies between different response parameters in batch and continuous algal toxicity tests. *Journal of Hazardous Materials* **82**(2), 129-136. 30-3-2001.
- CHARIZOPOULOS E. & PAPADOPOULOU-MOURKIDOU E. (1999) Occurrence of Pesticides in Rain of the Axios River Basin, Greece. *Environ.Sci.Technol.* **33**, 2363-2368.
- CHEVREUIL M., GARMOUMA M., TEIL M.J. & CHESTERIKOFF A. (1996) Occurrence of organochlorines (PCBs, pesticides) and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere and in the fallout from urban and rural stations of the Paris area. *The Science of the Total Environment* **182**, 25-37.
- CHIRON S., PAPILOU S., HAERDI W. & BARCELÓ D. (1995) Automated On-Line-Liquid-Solid Extraction Followed by Liquid Chromatography-High-Flow Pneumatically Assisted Electrospray Mass Spectrometry for the Determination of Acidic Herbicides in Environmental Waters. *Analytical Chemistry* **67**, 1637-1643.
- CHRISTENSEN E.R., CHEN D., NYHOLM N. & KUSK K.O. (2001) Joint action of chemicals in algal toxicity tests: influence of response level and dose-response regression model. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 2361-2369.
- CLEUVERS M. & RATTE H.T. (1999) Der Einfluß der Photonenflußdichte auf die Ergebnisse im Algenwachstums-Hemmtest. In *Ökotoxikologie*. Eds J.Oehlmann & B.Markert. Landsberg: ecomed verlag.
- CONRAD R., BUECHEL C., WILHELM Ch., ARSALANE W., BERKALOFF C. & DUVAL J.C. (1993) Changes in yield of in-vivo fluorescence of chlorophyll as a tool for selective herbicide monitoring. *J.Appl.Phycol.* **5**, 505-516.
- COQUART V. & HENNION M.-C. (1991) Interference removal in the organic trace-level analysis of aqueous environmental samples by on-line liquid chromatographic preconcentration techniques with two precolumns. *Journal of Chromatography* **553**, 329-343.
- CROSSLAND N.O. (1990) A review of the fate and toxicity of 3,4-Dichloranilin in aquatic environments. *Chemosphere* **21**, 1489-1497.
- CURINI R., GENTILI A., MARCHESE S., PERRET D. & MARINO A. (2000) Solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography-ionspray interface-mass spectrometry for monitoring of herbicides in environmental water. *Journal of Chromatography A* **874**, 187-198.
- D'ASCENZO G., GENTILI A., MARCHESE A., MARINO A. & PERRET D. (1998) Multiresidue Method for Determination of Post-Emergence Herbicides in Water by HPLC/ESI/MS in Positive Ionization Mode. *Environ.Sci.Technol.* **32**, 1340-1347.
- DAIGNAULT S.A., NOOT D.K., WILLIAMS D.T. & HUCK P.M. (1988) A review of the use of XAD resins to concentrate organic compounds in water. *Water Research* **22**, 803-813.
- DAVIES P.E., COOK L.S.J. & GOENARSO D. (1993) Sublethal Responses to Pesticides of Several Species of Australian Freshwater Fish and Crustaceans and Rainbow Trout. *Environ.Toxicol.Chem.* **12**, 1341-1354.

- DI CORCIA A., COSTANTINO A., CRESCENZI C. & SAMPERI R. (1999) Quantification of phenylurea herbicides and their free and humic acid-associated metabolites in natural waters. *Journal of Chromatography A* **852**, 465-474.
- DI CORCIA A., NAZZARI M., RAMESH R., SAMPERI R. & SEBASTIANI E. (2000) Simultaneous determination of acidic and non-acidic pesticides in natural waters by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **878**, 87-98.
- DIJKMAN E., MOOIBROEK D., HOOGERBRUGGE R., HOGENDOORN E., SANCHO J.-V., POZO O. & HERNÁNDEZ F. (2001) Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **926**, 113-125.
- DIN. Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L), Leuchtbakterienabwassertest, DIN 38 412 Teil 341. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser und Schlammuntersuchung. 2002.
- DODARD S.G., RENOUX A.Y., HAWARI J., AMPLEMAN G., THIBOUTOT S. & SUNAHARA G.I. (1999) Ecotoxicity characterization of dinitrotoluenes and some of their reduced metabolites. *Chemosphere* **38**, 2071-2079.
- DOERFFEL K. (1990) *Statistik in der analytischen Chemie*. 5. Ed. Leipzig: Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH. pp. 1-256.
- DORGERLOH M. (1997) Labor-Algentest: Bedeutung der toxikologischen Endpunkte. *UWSF* **9**, 222-224.
- DUBUS I.G., HOLLIS J.M. & BROWN C.D. (2000) Pesticides in rainfall in Europe. *Environmental Pollution* **110**, 331-344.
- DUGAY J., MIÈGE C. & HENNION M.-C. (1998) Effect of the various parameters governing solid-phase microextraction for the trace-determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A* **795**, 27-42.
- DUPAS S., GUENU S., PICHON V., MONTIEL A., WELTÉ B. & HENNION M.-C. (1996) Long-Term Monitoring of Pesticides and Polar Transformation Products in Ground Water Using Automated On-Line Trace-Enrichment and Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *Intern.J. Environ. Anal. Chem.* **65**, 53-68.
- (DVKW) DEUTSCHER VEREIN DES GAS- UND WASSERFACHS E.V. (1988) Wassergütekontrolle., Bd. 54, Eschborn
- EBERIUS, M. Gewichtung von Biotest durch unterschiedliche Auswertungsmethoden Bestandsaufnahme der Eigenschaften der normierten Ermittlungsmethoden für Hemmwerte, Entwurf. LemnaTec GmbH. 8-4-2000
- EL JAY A. (1996) Effects of Organic Solvents and Solvent-Atrazine Interactions on Two Algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **31**, 49-90.
- ERDINGER, L., HÖPKER, K.-A., DÖRR, I., FRIED, M., AND DÜRR, M. Genotoxische organische Verbindungen in der Außenluft. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg. 25. 1997.
- ESCHER B.I., EGGEN R.L., SCHREIBER U., SCHREIBER Z., VYE E., WISNER E. & SCHWARZENBACH R.P. (2002) Baseline toxicity (narcosis) of organic chemicals determined by in vitro membrane potential measurements in energy-transducing membranes. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1971-1979.
- ESCHER, B. I., HUNZKER, R. W., KÜHNHOLZ, O., BECKER VAN SLOOTEN, K., AND SCHWARZENBACH, R. P. Poster: Interaction of phenolic uncouplers in mixtures lead to synergistic effects. 1999. Atmospheric reactive substances, Bayreuth
- FAIRCHILD J.F., RUESSLER D.S. & CARLSON A.R. (1998) Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environ. Toxicol. Chem.* **32**, 353-357.

- FAUST M., ALTENBURGER R., BACKHAUS T., BLANCK H., BOEDEKER W., GRAMATICA P., HAMER V., SCHOLZE M., VIGHI M. & GRIMME L.H. (2001) Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquatic Toxicology* **56**, 13-32.
- FENT, K. Ökotoxikologie, Umweltchemie, Toxikologie, Ökologie. 1998, Stuttgart: Thieme Verlag
- FIEHN, O. Toxizitätsgeleitete Fraktionierung und Charakterisierung organischer Schadstoffe in gewerblichen Abwässern. VDI. 187, 1-118. 1997. Düsseldorf, VDI. Fortschrittsberichte VDI Reihe 15: Umwelttechnik.
- FRANCO I., CATALANO L., CONTIN M. & DE NOBILI M. (2001) Interactions between Organic Model Compounds and Pesticides with Water-soluble Soil Humic Substances. *Acta hydrochim.hydrobiol.* **29**, 88-99.
- FRIEDRICH G. (1986) Stand der Gütebewertung und nutzungsbezogene Qualitätsanforderungen an Fließgewässer in der Bundesrepublik Deutschland. In *Bewertung der Gewässerqualität und Gewässergüteanforderungen*. Bd. 40 Ed. Wien: Oldenbourg Verlag.
- GALASSI S. & BENFENATI E. (2000) Fractionation and toxicity evaluation of waste waters. *Journal of Chromatography A* **889**, 149-154.
- GAMILLA H.A. & NAGLAA F.A. (1999) Estimation of the Hazard Concentration of Industrial Wastewaters Using Algal Bioassay. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* **63**, 407-414.
- GARRIDO M., LUBIÁN L.M. & SOARES A.M.V.M. (1999) Oxygen Production Rate as a Test for Determining Toxicity of Copper to *Rhodomonas salina* Hill and Wehterbee (Crytophyceae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **62**, 776-782.
- GAYNOR J.D. & VOLK V.V. (1981) Runoff Losses of Atrazine and Terbutryn from Unlimed and Limed Soil. *Environ.Sci.Technol.* **15**, 440-443.
- GEERDINK R.B. (1988) Determination of aniline derivatives by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography* **445**, 273-281.
- GEERDINK R.B., KOOISTRA-SIJPERSMA A., TIESNITZSCH J., KIENHUIS P.G.M. & BRINKMAN U.A.Th. (1999) Determination of polar pesticides with atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry-mass spectrometry using methanol and/or acetonitrile for solid-phase desorption and gradient liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **863**, 147-155.
- GELLERT G. & STOMMEL A. (1999) Influence of Microplate Material on the Sensitivity of Growth Inhibition Tests with Bacteria Assessing Toxic Organic Substances in Water and Waste Water. *Environ.Toxicol.* **14**, 424-428.
- GIRAUD D., VENTURA A., CAMEL V., BERMOND A. & ARPINO P. (1997) Determination of traces of pesticides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **777**, 115-125.
- GIRLING A.E., PASCOE D., JANSSEN C.R., PEITHER A., WENZEL A., SCHAEFER H., NEUMEIER B., MITCHELL G.C., TAYLOR E.J., MAUND S.J., LAY J.P., JÜTTNER F., CROSSLAND N.O., STEPHENSON R.R. & PERSOONE G. (2000b) Development of Methods for Evaluating Toxicity to Freshwater Ecosystems. *Ecotoxicol.Environ.Saf.* **45**, 148-176.
- GIRLING A.E., TATTERSFIELD L., MITCHELL G.C., CROSSLAND N.O., PASCOE D., BLOCKWELL S.J., MAUND S.J., TAYLOR E.J., WENZEL A., JANSSEN C.R. & JÜTTNER I. (2000a) Derivation of Predicted No-Effect Concentrations for Lindane, 3,4-Dichloroaniline, Atrazine, and Copper. *Ecotoxicol.Environ.Saf.* **46**, 148-162.
- GREMM T.J. & FRIMMEL F.H. (2000) Characterization of AOX by Fractionation Analysis and Size-Exclusion Chromatography. *Acta hydrochim.hydrobiol.* **28**, 202-211.

- GRIMME, L. H., ALTENBURGER, R., BACKHAUS, T., BÖDEKER, W., FAUST, M., AND SCHOLZE, M. Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen. Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH. 25, 1-319. 1998. UFZ-Bericht.
- GROS, P. Bestimmung von Halogenacetaten mittels LC-ESI-MS. 1-93. 2002. Universität Bayreuth, Diplomarbeit
- HAAS R. & OESTE F.D. (2001) Passivsammler zur Wasseruntersuchung. *UWSF* **13**, 2-4.
- HAAS, T. Fremdstoffinteraktionen in Biotests. 1-130. 1999. Universität Bayreuth, Diplomarbeit
- HABECK-TROPFKE H.H. (1980) *Abwasserbiologie*. Düsseldorf: Werner Verlag.
- HALLING-SØRENSEN B., NYHOLM N. & BAUN A. (1996) Algal toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight flasks with CO₂ enriched headspace. *Chemosphere* **32**, 1513-1526.
- HAUSSEL E. (2000) Wasserbau und Wassergüte. In *Fische und ihre Welt in Oberfranken*. Ed R.Klupp. Bayreuth: Bezirksfischereiverband Oberfranken e.V. und Teichgenossenschaft Oberfranken. pp. 45-60.
- HEGER, W., JUNG, S., MARTIN, S., RÖNNEFAHRT, I., SCHIECKE, U., SCHMITZ, S., TEICHMANN, H., AND PETER, H. Ökotoxikologische Testverfahren mit aquatischen Organismen. Umweltbundesamt. 1-275. 1998.
- HENDRIKS A.J., MAAS-DIEPEVEEN J.L., NOORDSIJ A. & VAN DER GAAG M.A. (1994) Monitoring response of XAD-concentrated water in the Rhine delta: a major part of the toxic compounds remains unidentified. *Water Research* **28**, 581-598.
- HENNION M.-C., CAU-DIT-COUMES C. & PICHON V. (1998) Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples Tools for the rapid prediction and optimisation of the solid-phase extraction parameters. *Journal of Chromatography A* **823**, 147-161.
- HERSH C.M. & CRUMPTON W.G. (1987) Determination of Growth Rate Depression of Some Green Algae by Atrazine. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* **39**, 1041-1048.
- HERTERICH R. (1991) Atrazin - Atmosphärischer Eintrag und Immissions-Konzentrationen. *UWSF* **3**, 196-200.
- HOCK B., FEDTKE C. & SCHMIDT R.R. (1995) *Herbizide, Entwicklung, Anwendung, Wirkungen, Nebenwirkungen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- HOGENDOORN E., DIJKMAN E. & BAUMANN B. (1999) Strategies in Using Analytical Restricted Access Media Columns for the Removal of Humic Acid Interferences in the Trace Analysis of Acidic Herbicides in Water Samples by Coupled Column Liquid Chromatography with UV Detection. *Analytical Chemistry* **71**, 1111-1118.
- HONG S.-S. & XU D.-Q. (1999) Light-induced increase in initial chlorophyll fluorescence F₀ level and the reversible inactivation of PS II reaction centers in soybean leaves. *Photosynth. Res.* **61**, 269-280.
- HOTTENROTH, S. Nitrophenole im Nebel: Analytik und Interpretation atmosphärischer Parameter. 1-127. 2001. Universität Bayreuth, Diplomarbeit
- HOWARD, P.H.; MEYLAN, W.M. (1997) Handbook of physical properties of organic chemicals, Boca Raton: CRC Press.
- HÜTTER L.A. (1994) *Wasser und Wasseruntersuchung*. 6. Auflage Ed. Frankfurt am Main: Salle + Sauerländer. pp. 1-515.
- IRMER, U. Kontinuierliche Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins. Umweltbundesamt. 1/95, 1-289. 1995. Berlin, Erich Schmidt Verlag. Berichte.

- IRMER U., ROCKER W. & BLONDZIK K. (1997) Qualitätsanforderungen an Oberflächengewässer: Zielvorgaben, Qualitätsziele und chemische Gewässergüteklassifizierung. *Acta hydrochim.hydrobiol.* **25**, 62-70.
- KAISER K.L.E. (1998) Correlations of *Vibrio fischeri* Bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environmental Health Perspectives* **106**, 583-591.
- KAISER K.L.E. & RIBO J.M. (1988) *Photobacterium phosphoreum* Toxicity Bioassay. II. Toxicity Data Compilation. *Toxicity Assessment* **3**, 195-237.
- KASAI F., TAKAMURA N. & HATAKEYAMA S. (1993) Effects of simetryne on growth of various freshwater algal taxa. *Environ.Poll.* **79**, 77-83.
- KAUNE, A. Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen zur Modellierung der Mineralisierung ausgewählter Triazine im Boden. 1997. Dissertation
- KAUTSKY H. & FRANCK U. (1943) Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. *Biochem.Z.* **315**, 139-232.
- KIRBY M.F., BLACKBURN M.A., THAIN J.E. & WALDOCK M.J. (1998) Assessment of water quality in estuarine and coastal waters of England and Wales using a contaminant concentration technique. *Marine Pollution Bulletin* **36**, 631-642.
- KLEIN B. (1990) Möglichkeiten und Grenzen der Farbkorrektur im Leuchtbakterientest mit Hilfe von Adsorptions-Korrektur-Küvetten. *Z.Wasser-Abwasser-Forsch.* **236**, 70-74.
- KLUPP R. (2000) Forellenteichwirtschaft in Oberfranken. In *Fische und ihre Welt in Oberfranken*. Ed R.Klupp. Bayreuth: Bezirksfischereiverband Oberfranken e.V. und Teichgenossenschaft Oberfranken. pp. 317-330.
- KOLBE A., GEISS S. & EINAX J.W. (1999) GC/MS-Nontargetanalytik zur Aufklärung einer organischen Grundwasserkontamination. Teil I: Probenahme - Analytik - Identifikation der organischen Verbindungen. *Acta hydrochim.hydrobiol.* **27**, 58-64.
- KONG F.X., HU W. & LIU Y. (1998) Molecular structure and biochemical toxicity of four halogeno-benzenes on the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environmental and Experimental Botany* **40**, 105-111.
- KOSIAN P.A., MAKYNEN E.A., MONSON P.D., MOUNT D.R., SPAICE A., MEKENYAN O.G. & ANKLEY G.T. (1998) Application of toxicity-based fractionation techniques and structure-activity relationship models of the identification of phototoxic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment pore water. *Environ.Toxicol.Chem.* **17**, 1021-1033.
- KÖNIG A., SECKER J., RIEDEL K. & METZGER J.W. (1998) A microbial sensor for measuring inhibitors and substrates for nitrification in wastewater. *International Laboratory* 15-19.
- KRATASYUK V.A., ESMBEKOVA E.N., GLADYSHEV M.I., KHROMICHEK E.B., KUZNETSOV A.M. & IVANOVA E.A. (2001) The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems. *Chemosphere* **42**, 909-915.
- KRAUSE G.H., VERNOTTE C. & BRIANTAIS J.M. (1982) Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. Resolution into two components. *Biochim.Biophys.Acta* **679**, 116-124.
- KRAUSE G.H. & WEIS E. (1991) Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **42**, 313-349.
- KREBS F. (1992) Gewässeruntersuchung mit dem durch Alkali- und Erdalkaliionen-Zugabe optimierten DIN-Leuchtbakterientest, dargestellt am Beispiel der Saar. In *Biologische Testverfahren, Beiträge zu den Biotest-Statusseminaren 1989 und 1992*. Eds K.G.Steinhäuser & P.-D.Hansen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. pp. 657-673.

- KRISTENSEN G.B., JOHANNESSEN H. & AAMAND J. (2001) Mineralization of aged atrazine and mecoprop in soil and aquifer chalk. *Chemosphere* **45**, 927-934.
- KÜHN – BIRETT (2002) Merkblätter Gefährliche Arbeitsstoffe
- KUHL A. (1962) Grundnährlösung für einzellige Grünalgen. In *Beiträge zur Physiologie und Morphologie einzelliger Algen*. 1 Ed. Ed Deutsch.Bot.Ges. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. pp. 157-166.
- KUNZ P. & FRIETSCH G. (1986) *Mikrobizide Stoffe in biologischen Kläranlagen*. Berlin: Springer Verlag.
- LARSEN L., SØRENSEN S.R. & AAMAND J. (2000) Mecoprop, Isoproturon, and Atrazine in and above a Sandy Aquifer: Vertical Distribution of Mineralization Potential. *Environ.Sci.Technol.* **34**, 2426-2430.
- LAWA. Zielvorgaben zum Schutz oberirdischer Binnengewässer (Erarb. v. Bund/Länder-Arbeitskreis "Qualitätsziel [Blak QZ]). Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA). (Band III), 1-57. 1998. Berlin.
- LEBKUECHER J.G. & HOUTMAN R.A. (1999) The use of chlorophyll a fluorescence to examine the effects of water quality on primary photochemistry. *Bull.Biochem.Biotechnol.* **12**, 49-52.
- LEE S.K., FREITAG D., STEINBERG C., KETTRUP A. & KIM Y.H. (1993) Effects of dissolved humic materials on acute toxicity of some organic chemicals to aquatic organisms. *Water Research* **27**, 199-204.
- LICHTENTHALER H.K. (1992) The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics. *Photosynthetica* **27**, 45-55.
- MALLHOT H. (1987) Prediction of Algal Bioaccumulation and Uptake Rate of Nine Organic Compounds by Ten Physicochemical Properties. *Environ.Sci.Technol.* **21**, 1009-1013.
- MANDAL R., HASSAN N.M., MORIMBOH J., CHAKRABARTI C.L., BACK M.H., RAHAYU U. & LEAN D.R.S. (2002) Chemical Speciation and Toxicity of Nickel Species in Natural Waters from the Sudbury Area (Canada). *Environ.Sci.Technol.* **36**, 1477-1484.
- MARQUET P. & LACHATRE G. (1999) Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology (review). *Journal of Chromatography B* **733**, 93-118.
- MÄHNER E. (2000) Besonderheiten der Fischerei im Fichtelgebirge. In *Fische und ihre Welt in Oberfranken*. Ed R.Klupp. Bayreuth: Bezirksfischereiverband Oberfranken e.V. und Teichgenossenschaft Oberfranken. pp. 93-104.
- MERSCHHEMKE, CH. Automatische Biotestsysteme zur kontinuierlichen Rheinüberwachung: Biolum, ein kontinuierlicher Leuchtbakterientest, und FluOx, ein Algentestautomat. Schriftenr. Ver. Wasser-,Boden- und Lufthyg. 93, 215-225. 1993. Germany.
- MERSIE W., SEYBOLD C., TIERNEY D. & MCNAMEE C. (1998) effect of temperature, disturbance and incubation time on release and degradation of atrazine in water columns over two types of sediments. *Chemosphere* **36**, 1867-1881.
- MEYER R.V. (1987) *Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie*. 5. Auflage Ed. Diesterweg Verlag. pp. 1-275.
- MILLINGTON L.A., GOULDING K.H. & ADAMS N. (1988) The influence of growth medium composition on the toxicity of chemicals to algae. *Water Research* **22**, 1593-1597.
- MINGAZZINI M., SÁENZ M.E., ALBERGONI F.G. & MARRÉ M.T. (1997) Algal Photosynthesis Measurements in Toxicity Testing. *Fresenius Environ.Bull.* **6**, 308-313.
- MITOBE H., IBARAKI T., TANABE A., KAWATA K. & YASUHARA A. (2001) High performance liquid chromatographic determination of pesticides in soluble phase and suspended phase in river water. *Toxicological and Environmental Chemistry* **in press**

- MOORE D.R.J. & CAUX P.-Y. (1997) Estimating low toxic effects. *Environ.Toxicol.Chem.* **16**, 794-801.
- MUNTEANU F.D., LINDGRENA., EMNÉUS J., GORTON L., RUZGAS T., CSÖREGI E., CIUCU A., VAN HUYSTEE R.B., GAZARIAN I.G. & LAGRIMINI L.M. (1998) Bioelectrochemical monitoring for phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases. *Analytical Chemistry* **70**, 2596-2600.
- NALEWAJKO C. & OLAVESON M.M. (1998) Ecophysiological Considerations in Microalgal Toxicity Tests. In *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. Eds P.G.Wells, K.Lee & Ch.Blaise. USA: CRC, Boca Raton, Fla. pp. 289-310.
- NETUCHOVA H. & TICHY V. (1970) Effect of humus substances on the production and the quality of the biomass of *Scenedesmus quadricauda*. *Arch.Hydrobiol.Suppl.* **39**, 26-37.
- NIEDAN V.W. & SCHOELER H.F. (1997) Natural formation of chlorobenzoic acids (CBA) and distinction between PCB-degraded CBA. *Chemosphere* **35**, 1233-1241.
- NIESLONY, C. Untersuchung zur mikrobiellen und stofflichen Belastung bei der Laichaufzucht von Salmoniden. 1-83. 2001, Universität Bayreuth, Diplomarbeit
- NISTOR C. & EMNÉUS J. (1999) Bioanalytical tools for monitoring polar pollutants. *Waste Management* **19**, 147-170.
- NOACK U. & WALTER J. (1992) Das Algentoximeter in der kontinuierlichen Gewässertüberwachung. In *Biologische Testverfahren, Beiträge zu den Biotest-Statusseminaren 1989 und 1992*. Eds K.G.Steinhäuser & P.-D.Hansen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. pp. 305-309.
- NULTSCH W. (2001) *Allgemeine Botanik*. 11. Auflage Ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. pp. 1-663.
- NYSTRÖM B., BJÖRNSÄTER B. & BLANCK H. (1999) Effects of sulfonylurea herbicides on non-target aquatic micro-organisms Growth inhibition of micro-algae and short-term inhibition of adenine and thymidine incorporation in periphyton communities. *Aquatic Toxicology* **47**, 9-22.
- PAPE-LINDSTROM P.A. & LYDY M.J. (1997) Synergistic toxicity of atrazine and organophosphate insecticides contravenes the response addition mixture model. *Environ Toxicol Chem* **16**, 2415-2420.
- PARRIS (1980) *Environ.Sci.Technol.* **14**, 1099-1106.
- PERUZZI M., BARTOLUCCI G. & CIONI F. (2000) Determination of phenoxyalkanoic acids and other herbicides at the ng/ml level in water by solid-phase extraction with poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) sorbent and high-performance liquid chromatography-diode-array detection. *Journal of Chromatography A* **867**, 169-175.
- PICHON V., CAU-DIT-COUMES C., CHEN L. & HENNION M.-C. (1996) Solid-phase extraction, clean-up and liquid chromatography for routine multiresidue analysis of neutral and acidic pesticides in natural waters in one run. *Intern.J.Environ.Anal.Chem.* **65**, 11-25.
- PIRSON, A. AND RUPPEL, H. G. Über die Induktion einer Teilungshemmung in synchronen Kulturen von Chlorella. *Arch.Microbiol.* **42**, 299-305. 1962.
- PONGRATZ. Physikalisch-chemische Daten zur Aufseß. Wasserwirtschaftsamt Bayreuth. 2000.
- PONGRATZ. Gewässergüte in Oberfranken 2000. Regierung von Oberfranken. 1-57. 2001.
- PURVIS M., GLEDHILL S.J., DRAGE B.E., HOGENBOOM A.C., JOLLY d.A., VREULS R.J.J. & BRINKMAN U.A.Th. (1999) Determination and Monitoring of Polar Compounds and Acidic Herbicides Using a Modified SAMOS System. *Intern.J.Environ.Anal.Chem.* **74**, 135-154.
- REEMTSMA T., FIEHN O. & JEKEL M. (1999) A modified method for the analysis of organics in industrial wastewater as directed by their toxicity to *Vibrio fischeri*. *Fresenius J Analytical Journal* **363**, 771-776.

- REINEKE N., BESTER K., HÜHNERFUSS H., JASTORFF B. & WEIGEL S. (2002) Bioassay-directed chemical analysis of river Elbe surface water including large volume extractions and high performance fractionation. *Chemosphere*
- RÖMPP, A. Haloacetate und Nitrophenole im Nebel. *Diplom-Arbeit*. 1999. Universität Bayreuth. Dissertation
- SCHLEYER R., FILLIBECK J., HAMMER J. & RAFFIUS B. (1995) Eintrag von atmo-genen Nitrophenolen und Methylnitrophenolen in das Grundwasser. *Vom Wasser* **85**, 377-399.
- SCHMIDT-BÄUMLER K., HEBERER Th. & STAN H.-J. (1999) Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part II: Substituted phenols in Berlin surface water. *Acta hydrochim.hydrobiol.* **27**, 143-149.
- SCHMIDT C. (2000) Muscheln in Oberfranken. In *Fische und ihre Welt in Oberfranken*. Ed R.Klupp. Bayreuth: Bezirksfischereiverband Oberfranken e.V. und Teichgenossenschaft Oberfranken. pp. 255-276.
- SCHMIDT, CH. Der Algen-Fluoreszenztest als empfindlicher Biotest auf algizide Substanzen im Oberflächenwasser. Umweltbundesamt. UBA-FB 76-097, 1-32. 1985. Berlin.
- SCHRADER, G. Erprobung mikrobiologischer und zoologischer (Öko-)Toxizitätstests für UTD-relevante Abfalleluate. 1998. TU Braunschweig, Dissertation
- SCHRADER K.K., DE REGT M.Q., TUCKER C.S. & DUKE S.O. (1997) A Rapid Bioassay for Selective Algicides. *Weed Technology* **11**, 767-774.
- SCHRÖDER H. (1997) Analysis of polar organic pollutants in the Elbe river by flow injection analysis and high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **777**, 127-139.
- SCHRÖDER H.F. (1993) Polare, schwer abbaubare, organische Abwasserinhaltsstoffe - Detektion, Identifikation und Quantifizierung. *Vom Wasser* **81**, 299-314.
- SCHUETZLE D. & LEWTAS J. (1986) Bioassay-Directed Chemical Analysis in Environmental Research. *Analytical Chemistry* **58**, 1061 A-1075 A
- SCHÜTZE A. (2000) Besonderheiten der Fischerei in der Fränkischen Schweiz. In *Fische und ihre Welt in Oberfranken*. Ed R.Klupp. Bayreuth: Bezirksfischereiverband Oberfranken e.V. und Teichgenossenschaft Oberfranken. pp. 105-120.
- SCHWEDT G., REITER Ch., UTHEMANN R. & GRABERT E. (1997) Development of an automated bacterial luminiscence test for biomonitoring of environmental contaminants. *Fresenius' J.Anal.Chem.* **359**, 161-166.
- SENESE N. & TESTINI C. (1984) Theoretical aspects and experimental evidence of the capacity of humic substances to bind herbicides by charge-transfer mechanisms. *Chemosphere* **13**, 461-468.
- SERRANO L. & BOON P.I. (1991) Effect of polyphenolic compounds on alkaline phosphatase activity: Its implications for phosphorus regeneration in australian freshwaters. *Archiv.Hydrobiol.* **123**, 1-19.
- SLOBODNIK J., ÖTZEKIZAN Ö., LINGEMAN H. & BRINKMAN U.A.Th. (1996) Solid-phase extraction of polar pesticides from environmental water samples on graphitized carbon and Empore-activated carbon disks and on-line coupling to octadecyl-bonded silica analytical columns. *Journal of Chromatography A* **750**, 227-238.
- SOLOMON K.R., BAKER D.B., RICHARDS K., DIXON K.R., KLAINÉ S.J., LA POINT T.W., KENDALL R.J., WEISSKOPF C.P., GIDDINGS J.M., GIESY J.P., HALL L.W., WILLIAMS Jr. & WILLIAMS W.M. (1996) Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem* **15**, 76
- SOMMER U. (2001) *Algen, Quallen, Wasserfloh*. Heidelberg: Springer. pp. 1-192.

- SPLIID N.H. & KÇPPEN B. (1998a) Determination of acidic herbicides using liquid chromatography with pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **803**, 157-168.
- SPLIID N.H. & KÇPPEN B. (1998b) Occurrence of pesticides in danish shallow ground water. *Chemosphere* **37**, 1307-1316.
- ST.-LAURENT D., BLAISE C., MACQUARRIE P., SCROGGINS R. & TROTTIER B. (1992) Comparative Assessment of Herbicide Phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* Using Microplate and Flask Bioassay Procedure. *Environ.Toxicol.Water Qual.* **7**, 35-48.
- STARODUB N.F., KANJUK N.I., KUKLA A.L. & SHIRSHOV Yu.M. (1999) Multi-enzymatic electrochemical sensor: field measurement and their optimisation. *Analytica Chimica Acta* **385**, 461-466.
- STEEN R.J.C.A., HOGENBOOM A.C., LEONARDS P.E.G., PEERBOOM R.A.L., COFINO W.P. & BRINKMAN U.A.Th. (1999) Ultra-trace-level determination of polar pesticides and their transformation products in surface and estuarine water samples using column liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **857**, 157-166.
- STEINBERG Ch., HAITZER M., HÖSS S., LORENZ R., BRÜGGEMANN R. & BURNISON B.K. (1997) Veränderung von Biokonzentration und Wirkung vom PSM in Anwesenheit von Huminstoffen. *UWSF* **9**, 64-68.
- STEWART A.J. (1987) Interactions between dissolved humic materials and organic toxicants. In *Synthetic Fuel Technologies, Results of Health and Environmental Studies*. Ed K.E.Cowser. Butterworth Publ. pp. 505-521.
- STRÜDER, F., VON DANKWITZ, B., AND SCHOLZE, M. Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen: Binäre Kombination von unähnlich wirkenden Substanzen unter Bedingungen akuter und chronischer Exposition. LUA NRW. 1-209. 1998. Essen.
- TAHEDL H. (1999) Fast examination of water quality using the automatic biotest ECOTOX based on the movement behavior of a freshwater flagellate. *Water Research* **33**, 426-432.
- TAKINO M., DAISHIMA S. & YAMAGUCHI K. (2000) Determination of haloacetic acids in water by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *Analyst* **125**, 1097-1102.
- TANG J.-X., HOAGLAND K.D. & SIEGFRIED B.D. (1997) Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **59**, 631-637.
- TOMLIN C.D.S. (2000) *The Pesticide Manual*. 12 th. Ed. Farnham, Surrey, UK: British Crop Protection Council.
- TÖLGYESSY P. & LISKA I. (1999) Study of applicability of various solid-phase extraction materials for sample handling in screening analysis of organic micropollutants. *Journal of Chromatography A* **657**, 247-254.
- TREMP J., MATRREL P., FINGLER S. & GIGER W. (1993) Phenols and nitrophenols as tropospheric pollutants: emissions from automobile exhaust and phase transfer in the atmosphere. *Water, Air and Soil Pollution* **68**, 113-123.
- UMWELTBUNDESAMT. 1,2-Dichlornitrobenzol. Report No. 52. 1990
- UMWELTBUNDESAMT. Zielvorgaben für gefährliche Stoffe, Jahresbericht. 98. 1993.
- UMWELTBUNDESAMT. Wassergüte in Österreich Jahresbericht 2000.
- UMWELTBUNDESAMT. Umweltdatenbank. umweltbundesamt.org/dzu/default.html . 2002

- VAN DEN HOEK Ch., JAHNS H.M. & MANN D.G. (1993) *Algen*. 3. Auflage Ed. Stuttgart: Georg Thieme. pp. 1-411.
- VAN DER HEEVER J.A. & GROBBELAAR J.U. (1998) *In Vivo* Chlorophyll *A* Fluorescence of *Selenastrum capricornutum* as a Screening Bioassay in Toxicity Studies. *Arch. Environ. Contamination and Toxicology* **35**, 281-286.
- VAN DIJK H.F.G. & GUICHERIT R. (1999) Atmospheric dispersion of current-use pesticides: a review of the evidence from monitoring studies. *Water, Air and Soil Pollution* **115**, 21-70.
- VINK J.P.M. & VAN DER ZEE S.E.A.T.M. (1997) Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* **31**, 2858-2868.
- WEBER E. (1972) *Grundriss der biologischen Statistik*. 7 Ed. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- WEIGL, W. Toxizitätsgeleitete Identifizierung von organischen Substanzen und Bestimmung des Anteils an Metalltoxizität im Nebel. 2001. Universität Bayreuth, Diplomarbeit
- WELLS P.G. (1993) Effect of pH and dissolved organic carbon on the toxicity of copper to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*) in natural lake waters of low alkalinity. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* **50**, 1356-1362.
- YONEYAMA K., NAKAJIMA Y., MAEJIMA N., OGASAWARA M., KONNAI M., TOKUTAKE N., IWAMURA H., SATO F., ICHINOSE K. & ET AL. (1993) Simple and rapid screening method for photosystem II inhibitory herbicides using photoautotrophically cultured plant cells with chlorophyll fluorescence monitoring. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **57**, 1389-1390.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, daß ich die Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre ferner, daß ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Erlangen, den 7. Januar 2003