

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit, die Teil eines interdisziplinären Forschungsprojektes war, wurden sieben Oberflächensedimente aus Nord- und Ostsee mit Hilfe der biotestgeleiteten Fraktionierung untersucht. Die Schwerpunkte dieser Arbeit lagen auf der Quantifizierung von mittelpolaren Xenobiotika wie z.B. Chloranilinen und Chloralkylphosphaten und der Ermittlung der (öko)toxikologischen Effekte in den organischen Sedimentextrakten mit Hilfe des Leuchtbakterientests (*Vibrio fischeri*) zur Ermittlung der akuten Toxizität. Durch die Kombination aus chemischer Analytik mit einer Bandbreite von biologischen Tests sollten ökotoxikologisch relevante organische Substanzen identifiziert werden. Gleichzeitig wurde eine neue Quantifizierungsmethode für Schadstoffe, die in marinen Proben dieser Region nachgewiesen wurden, entwickelt. Die Kenntnis der genauen Gehalte in den Probenextrakten ist für eine Zuordnung der beobachteten Effekte zu identifizierten Substanzen erforderlich.

Die erarbeitete Analysenmethode bestand in einer sequenziellen Kaltextraktion des feuchten Sediments zur Erstellung der Proben-Rohextrakte, gefolgt von einer Probenaufreinigung durch eine Größenausschluss-Chromatographie. Daran schloss sich eine Fraktionierung mit einer NP-HPLC zur Komplexitätsreduzierung der Probeninhaltsstoffe an, so dass auf dieser Stufe eine detaillierte GC/MS-Analyse möglich war. Bei auffälligen Effekten in der Biotestbatterie wurde eine weitere Unterfraktionierung mittels NP-HPLC vorgenommen. Die einzelnen Fraktionen jeder Untersuchungsstufe wurden in biotestkompatible Lösungsmittel überführt und in den biologischen Testsystemen zur Ermittlung des toxikologischen Potentials eingesetzt.

Bei der Quantifizierung der verschiedenen organischen Verbindungsklassen in den untersuchten Sedimenten von Nord- und Ostsee hat sich herausgestellt, dass die prioritären Schadstoffe PAH und PCB sowie chlororganische Pestizide nach wie vor eine Rolle spielen. Dies trifft insbesondere auf die Ostseesedimente zu. Es erscheint daher ratsam, ihre Konzentrationen in den Monitoringprogrammen von Sedimenten weiter zu verfolgen. Aus den Klassen der Nitroaromaten und Chloraniline wurden in den Nordseesedimenten der Deutschen Bucht 2,5-Dichloranilin, 2,4,6-Trichloranilin und Pendimethalin quantitativ bestimmt. Sie stellen bekannte Kontaminanten der Elbe dar. Triazine wie Irgarol hatten in keiner der hier untersuchten Sedimentproben eine Relevanz. Über die Hauptvertreter der polycyclischen Moschusduftstoffe HHCB und AHTN konnten aufgrund der Hintergrundwerte keine quantitativen Aussagen getroffen werden. Dies galt in abgeschwächter Form auch für Tris(2-chlorethyl)phosphat, welches zusammen mit anderen Vertretern der als Weichmacher und Flammschutzmittel verwendeten Phosphorsäureester (z.B.

Tris(chlorpropyl)phosphat und Triphenylphosphat) einen relevanten anthropogenen Eintrag in das marine System aufweist.

Mit Hilfe der Biotestbatterie ist es gelungen, verschiedenartiges toxikologisches Potential in den Extrakten von Nordsee- und Ostseesedimenten nachzuweisen und die Toxizitätsveränderungen im Verlauf der Fraktionierung zu verfolgen. Wie erwartet, waren die toxischen Effekte im Vergleich zu Elbesedimenten geringer. In den meisten Fällen ging mit der Komplexitätsreduzierung der Probeninhaltsstoffe eine Abschwächung der ermittelten Wirkung einher, so dass bei weitreichender Unterfraktionierung kaum noch Effekte messbar waren. Die für die Biotestbatterie notwendige Anreicherung von großen Mengen an Probenmaterial hatte zudem Einschränkungen in der analytischen Identifizierung von Substanzen zur Folge, weil auf diese Weise auch die Laborhintergrundwerte erheblich steigen.

In einzelnen Fällen, in denen Belastungsschwerpunkte bestimmter Verbindungen auftraten, konnten beobachtete Effekte auf konkrete Substanzklassen zurückgeführt werden: In der Probe der Kieler Bucht traten die PAH in den höchsten Konzentrationen auf und verursachten Effekte in einem Mutagenitätstest. Eine ausgeprägte Wirkung im Leuchtbakterientest wurde auch bei einigen chinoiden PAH-Metaboliten ermittelt. Die für die Einzelsubstanztests ausgewählten und in den Extrakten identifizierten Verbindungen waren nur in Spuren in den untersuchten Sedimenten enthalten. Da chinoide Strukturen aber ein häufig auftretendes Strukturelement sowohl bei anthropogenen als auch bei biogenen Substanzen darstellen, wäre ein Beitrag dieser Verbindungsklasse zur Toxizität denkbar.

Die größte Bedeutung in den hier untersuchten Proben hatten einige Isomere der bromierten Phenole und Indole, insbesondere 4-Bromphenol, 2,4-Dibromphenol, 4- und 6-Bromindol und drei Dibromindolisomere. Diese sind vermutlich biogenen Ursprungs und traten teilweise in sehr hohen Konzentrationen in den untersuchten Sedimentextrakten der Nordsee und auch in exemplarisch untersuchten Wasserproben der Deutschen Bucht auf. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe der biotestgeleiteten Analytik ein kausaler Zusammenhang zwischen beobachteten Wirkungen in akuten (Labor)-Toxizitätstests wie dem Leuchtbakterientest und dem Fischei-Test und gemessenen Konzentrationen in extrahierten Umweltproben postuliert werden. Anzumerken ist dabei, dass diese Substanzen bisher selten im Zusammenhang mit toxikologischen Effekten im marinen System beschrieben wurden.

Dagegen sind die spezifischen Ursachen einer Vielzahl anderer beobachteter Effekte

ungeklärt geblieben, u.a. weil fast alle Effektkonzentrationen der identifizierten und daraufhin getesteten Einzelsubstanzen deutlich über den in den Sedimentfraktionen zu erwartenden bzw. nachgewiesenen Gehalten lagen. Es zeigte sich, dass die Toxizität der Fraktionen nicht durch einzelne Hauptkomponenten bestimmt wurde, sondern durch ein Zusammenwirken der Mischung. Die Grenze bei der Zuordnung von Substanzen zu Effekten in marinen Sedimentextrakten bestand vor allem in der geringen Konzentration von anthropogenen Substanzen im Verhältnis zur biogenen Matrix und der nach wie vor großen Komplexität der Probenzusammensetzung. Die Ergebnisse der bromierten Phenole und Indole zeigen, dass ein Beitrag zur Toxizität dann nachzuweisen ist, wenn es sich um sehr wirksame Substanzen handelt, die gleichzeitig in hohen Konzentrationen in den Proben auftreten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse dieser wirkungsbezogenen Analytik erneut die Bedeutsamkeit der Kombination von chemischen und toxikologischen Untersuchungen unter Beweis gestellt haben. Darüber hinaus wurde in Bezug auf den regulativen Umgang mit Chemikalien deutlich, dass es für eine dem marinen Ökosystem angemessene Risikobewertung erforderlich ist, die diffusen Einträge und Kombinationswirkungen zu berücksichtigen, anstatt sich auf die isolierte Betrachtungsweise einzelner Komponenten zu beschränken.

## 8. Summary

The presented work was part of an interdisciplinary research project in which the method of bioassay-directed fractionation was applied to organic extracts of seven sediments from the North Sea and Baltic Sea. The focus was laid on the quantification of xenobiotics of mid-polarity, such as chloroanilines and chloroalkyl-phosphates, as well as the evaluation of ecotoxicological effects in the sediment fractions using the luminescent bacteria assay with *Vibrio fischeri*. The combination of chemical analysis with a variety of biological test systems resulted in the identification of ecotoxicologically relevant substances. In parallel, quantification of selected organic pollutants was undertaken, thus allowing a correlation between identified substances and observed effects

The analytical method established herein consisted in a sequential extraction of wet sediments followed by a clean up procedure based on size exclusion chromatography. In order to reduce fraction complexity and enable a detailed analysis, a NP-HPLC fractionation was performed. In case of marked effects in the biotest battery a further fractionation step was applied. The fractions of each step of the analytical procedure were transferred to solvents that were suited for use in the respective biological assays.

It was found that the priority pollutants of PAHs, PCBs and organochlorine pesticides are still important for a toxicological evaluation of marine sediments, as these have been quantified in different investigated sediments from the North Sea and Baltic Sea. It is, therefore, still considered advisable to monitor the development of these concentrations. From the groups of nitroaromatic and chloroaniline compounds, 2,4-dichloroaniline, 2,4,6-trichloroaniline and pendimethalin were determined quantitatively in the sediments of the North Sea. These substances are known pollutants of the river Elbe. Triazines like irgarol were of no relevance for any of the investigated sediment samples. Because of background contamination with the two main polycyclic musks HHCb and AHTN no quantitative values could be determined for these substances. The same applies more or less to organic alkylphosphates (e.g. tris(2-chloroethyl)phosphate and triphenylphosphate) which are plasticizers and flame retardants with considerable input into the marine system.

All bioassays included in the present study indicated different toxicological potential in the organic extracts of the investigated North Sea and Baltic Sea sediments. As expected, the effects were less pronounced than those of river Elbe sediments. During the fractionation procedure and its reduction of sample complexity most of the effects decreased and finally disappeared. In some cases, observed effects could be

linked with the occurrence of special substance groups in the respective sample: high concentrations of PAHs were found in the Bight of Kiel that caused significant effects in a mutagenicity assay. The luminescent bacteria assay showed a remarkable sensitivity to some chinoid PAH metabolites. Even if no single substance was prevalent in sufficiently high concentrations to cause an effect, chinoid compounds, which occur frequently in environmental samples, can be suspected as contributors to the toxicological potential.

Brominated phenols and indoles, especially 4-bromophenol, 2,4-dibromophenol, 4- and 6-bromoindole and three isomers of dibromoindole, which are assumed to be of biogenic origin turned out as highly relevant for the investigations. They occurred in striking concentrations in the sediment samples from the North Sea and in some water samples from the German Bight. With the help of bioassay-directed analysis a cause-effect relationship could be established between observed effects in acute laboratory bioassays (luminescent bacteria assay and embryo test with *Danio rerio*) and concentrations in extracted samples. These compounds have hardly been discussed so far in the context of toxic effects in the marine ecosystem.

Many of the observed effects remained without explanation. Almost all substances that have been identified in the organic extracts and that have afterwards been tested in the bioassays did only show weak toxicity. Obviously, toxicity of fractions was caused by a mixture of compounds rather than by some single substances. The correlation of substances to effects was difficult due to relatively low concentrations of pollutants in comparison to the biogenic matrix and to the remaining complexity of the fractions. The results with respect to the brominated phenols and indoles highlight the possible use of bioassay directed fractionation in the case of high concentrations and high toxicity.

The results of this biotest-directed analysis demonstrate the importance of a combination of chemical and biological investigations in order to link the occurrence of pollutants to possible effects and, *vice versa*, find explanations for observed effects. Moreover, it has been shown that a marine risk assessment requires focussing on the input of diffuse sources and taking into account the fact of mixture toxicity.