

Akute und chronische Toxizität von verschiedenen organischen Lösemitteln auf  
*Lumbriculus variegatus*

Postgradualstudium Ökotoxikologie

**mit Abschluss "Fachökotoxikologin/Fachökotoxikologe (GDCh /SETAC GLB)**

GDCh-Fachgruppe 'Umweltchemie und Ökotoxikologie'  
&  
SETAC-Europe (German Language Branch) e.V.

Vorgelegt von Katrin Weber, geb. Borrmann

Betreuung durch

Prof. Dr. Jörg Oehlmann, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Dr. Guido Gonsior, Eurofins Agrosience Services GmbH

Hiermit bestätige ich, dass das vorgeschlagene Thema nicht Bestandteil meiner Routinearbeit beim Arbeitgeber oder laufenden Tätigkeit ist.

---

Datum/Unterschrift

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Aquatische Toxizitätsversuche.....	5
1.1.1	Die Verwendung organischer Lösemittel.....	5
1.1.2	<i>Lumbriculus variegatus</i> als Testorganismus.....	6
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Testorganismus <i>Lumbriculus variegatus</i> .....	9
2.2	Testsubstanzen.....	10
2.2.1	Aceton.....	10
2.2.2	Dimethylformamid (DMF).....	11
2.2.3	Dimethylsulfoxid (DMSO).....	11
2.2.4	Ethanol.....	11
2.2.5	Ethylacetat.....	12
2.2.6	Methanol.....	12
2.3	Versuchsaufbau und Durchführung.....	13
2.3.1	Akute Toxizitätstests.....	13
2.3.2	Chronische Toxizitätstests im Wasser-Sedimentsystem.....	14
3	Ergebnisse.....	16
3.1	Akute Toxizitätstests.....	16
3.2	Chronische Toxizitätstests im Wasser-Sedimentsystem.....	17
3.2.1	Statistische Auswertung.....	19
4	Diskussion.....	21
4.1	Akute Toxizitätsversuche.....	21
4.1.1	Probleme mit Ethylacetat.....	21
4.2	Chronische Toxizitätsversuche.....	22
4.2.1	Spiked water vs. Spiked Sediment.....	22
4.2.2	Methodik zur Austreibung der Würmer aus dem Sediment.....	22
4.2.3	Vergleich der Verwendung von DMF, DMSO und Aceton.....	23
5	Literatur.....	25

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht verwendeter Lösungsmittel.....	10
Tabelle 2:	Ergebnisse des akuten Toxizitätstest nach 96 Stunden, Mortalität in %.....	16
Tabelle 3:	Anzahl gefundener Würmer im chronischen Toxizitätstest nach 28 Tagen.....	17
Tabelle 4:	Anzahl gefundener Würmer im chronischen Toxizitätstest pro Replikat.....	18
Tabelle 5:	p-Werte, Anzahl gefundener Würmer der Lösemittel Aceton, DMF und DMSO im Vergleich zur Kontrolle.....	20
Tabelle 6:	p-Werte, Zustand der Würmer der Lösemittel Aceton, DMF und DMSO im Vergleich zur Kontrolle.....	20
Tabelle 7:	Physikalisch-chemische Parameter (Min-Max-Werte).....	20

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kultur von <i>Lumbriculus variegatus</i> .....	7
Abbildung 2: Versuchsaufbau im akuten Toxizitätstest.....	13
Abbildung 3: Anzahl lebender Würmer im chronischen Toxizitätsversuch .....	18
Abbildung 4: Prozentuale Aufteilung der lebenden Würmer in Kategorien .....	19

# **1 Einleitung**

## **1.1 Aquatische Toxizitätsversuche**

Aquatische Toxizitätsversuche werden im Rahmen von Zulassungsverfahren für Pflanzenschutzmittel, Biozide, Human- und Veterinärpharmaka und Industriechemikalien durchgeführt. Die Richtlinien zur Durchführung von aquatischen Toxizitätsversuchen wurden von einer Reihe von nationalen und internationalen Organisationen veröffentlicht. Die für die EU relevanten Richtlinien stammen von der European Economic Community (EEC) und der Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Für den amerikanischen Markt gelten die Richtlinien der Environmental Protection Agency (US-EPA). Ursprünglich wurden diese Richtlinien für die Verwendung von wasserlöslichen und stabilen Substanzen entwickelt. Jedoch fallen eine ganze Reihe von Substanzen, die registriert werden müssen, nicht in diese Gruppe, da sie z.B. nur schwer wasserlöslich sind. Durch diese Eigenschaft wird die Applikation in/mit Wasser erschwert, und es stellt sich die Frage, wie Testlösungen hergestellt werden können, welche die Testsubstanz zu 100 % enthalten (ECETOC, Monograph No. 26; 1996).

### **1.1.1 Die Verwendung organischer Lösemittel**

In aquatischen Toxizitätsversuchen werden aus diesem Grund organische Lösemittel für die Applikation von schlecht wasserlöslichen Substanzen verwendet. Lösemittel, die mit Wasser mischbar sind, fungieren in diesem Fall als Vehikel und sorgen dafür, dass Substanzen quantitativ ins Testmedium überführt werden. Lösemittel sollten nur zum Einsatz kommen, wenn es keine andere Möglichkeit gibt, eine Substanz zu applizieren, da diese durchaus mit der Testsubstanz interagieren können. Die „OECD Series No 23“ listet eine Reihe von Lösemitteln auf, die in Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der zu applizierenden Substanz gewählt werden sollen. Zur Auswahl stehen Aceton, Ethanol, Methanol, tertiärer Butylalkohol, Acetonitril, Dimethylformamid (DMF) und Triethylenglykol. Diese Lösemittel dürfen bis zu einer Maximalkonzentration von einem Zehntel der NOEC (no observed effect concentration) oder alternativ – beim Fehlen entsprechender Toxizitätsdaten – mit einer Konzentration von maximal 100 mg/L bzw. 100 µl/L verwendet werden. Wird

bei einem Toxizitätstest ein Lösemittel zur Applikation verwendet, so muss dieses in einer Lösemittelkontrolle parallel zur Kontrolle getestet werden und keine signifikanten letalen und subletalen Effekte hervorrufen, d.h. es soll selbst nicht toxisch auf den Testorganismus wirken (OECD Series No. 23; ANONYMUS 2000).

Viele akute Toxizitätsstudien wurden schon mit den Standardtestorganismen Fisch und Daphnie und den empfohlenen Lösemitteln Aceton, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), Triethylenglykol, Methanol und Ethanol durchgeführt (ECETOC, Monograph No. 26; ANONYMUS 1996).

Mit der Revidierung des „Technical Guidance Documents on Risk Assessment“ 2003 wurde dem Sediment als umweltrelevantes Kompartiment mehr Beachtung geschenkt. Viele Substanzen können an das Sediment binden und dort über längere Zeit verweilen, womit die Exposition für Sedimentbewohner erhöht ist. Bislang wurden Studien mit *Chironomus riparius* durchgeführt (OECD 218 und 219). Als weiterer Sedimentbewohner wurde mit der OECD Richtlinie 225 *Lumbriculus variegatus* als Testorganismus eingeführt.

#### 1.1.2 *Lumbriculus variegatus* als Testorganismus

Oligochaeten spielen eine wichtige Rolle in aquatischen Sedimenten. Durch das Aufwühlen von Sedimenten und dadurch, dass sie für andere Organismen als Futterquelle dienen, haben sie großen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Substanzen. Stellvertretend für die aquatischen Oligochaeten wird *Lumbriculus variegatus* verwendet.

Systematisch eingeordnet gehört der Glanzwurm *Lumbriculus variegatus* zum Stamm der Anneliden, Klasse der Clitellaten, Ordnung der Oligochaeta und zur Familie der Lumbriculidae (C. Drewes, *Lumbriculus variegatus*: A Biology Profile).



Abbildung 1: Kultur von *Lumbriculus variegatus*

*L. variegatus* ist im Labor sehr einfach zu kultivieren. Eine Besonderheit, die im Labor beobachtet wurde, ist die Vermehrung durch Selbstfragmentierung (Autonomie). Eine sexuelle Vermehrung wurde unter Laborbedingungen bisher nicht beobachtet. Der Wurm kann sich dabei in mehrere Teile teilen, die während einer kurzen Regenerationsphase einen neuen Kopf, Schwanz oder sogar beides ausbilden können. In natürlicher Umgebung dient die Selbstfragmentierung unter anderem dem Selbstschutz. *L. variegatus* bewegt sich mit dem Kopf durch das Sediment grabend vorwärts und ernährt sich von Mikroorganismen oder verwesendem Pflanzenmaterial. Das Hinterende ragt dabei zum Gasaustausch aus dem Sediment heraus (Drewes, 2004). Durch den Kontakt mit Wasser, Porenwasser und Sediment kann er Substanzen durch seine Oberfläche, aber auch durch Ingestion über die Nahrung aufnehmen und ist somit den wichtigen Expositionswegen ausgesetzt (OECD Richtlinie 225; 2007). Aus den genannten Gründen eignet sich *L. variegatus* sehr gut als Testorganismus für chronische Wasser-Sedimentversuche, aber auch für akute Studien, da subletale Parameter wie Lysis, Paralyse, fehlende Hämolyphzirkulation, Ver- oder Entfärbung und Deformierung sehr gut beobachtet und dokumentiert werden können.

Die OECD Richtlinie 225 „Sediment-Water *Lumbriculus* Toxicity Test Using Spiked Sediment“ wurde 2007 in Kraft gesetzt. Diese gibt vor, dass ein passendes organisches Lösemittel zur Applikation von schlecht wasserlöslichen Substanzen verwendet werden soll. Bislang liegen allerdings keine Daten zur Untersuchung der

Toxizität von Lösemitteln gegenüber *L. variegatus* vor. Für die Routinetestung sind diese jedoch hoch relevant.

In der vorliegenden Arbeit wurde die akute und chronische Toxizität verschiedener Lösemittel auf den benthischen Oligochaeten *L. variegatus* getestet. Hierzu wurden im akuten Toxizitätsversuch Aceton, DMF, DMSO, Ethanol, Methanol und Ethylacetat getestet. Basierend auf den Ergebnissen der akuten Studien wurden weiterführend drei der Lösemittel ausgewählt und im chronischen Wasser-Sediment System getestet. Folgende Lösemittel wurden verwendet: Aceton, DMF und DMSO.



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Testorganismus *Lumbriculus variegatus***

Die hier verwendeten Tiere stammen aus dem Institut für Ökologie, Evolution und Diversität der Goethe-Universität Frankfurt am Main. Seit August 2009 werden diese bei der Eurofins Agroscience Services GmbH kultiviert.

Für die akuten Toxizitätstests wurden ausgewachsene, intakte Würmer aus der laboreigenen Zucht verwendet, die keine sichtbaren (helleren) Regenerationsteile aufwiesen.

Für die chronischen Toxizitätstests wurden adulte Würmer der Population synchronisiert. Durch die Synchronisation wurde der physiologische Zustand der Tiere von unterschiedlichem Alter und Größe in der Zucht angeglichen. Die adulten Würmer wurden mit einem Skalpell in der Mitte durchtrennt, sodass gleich lange Hinterenden entstanden. Diese Hinterenden wurden in einer mit Quarzsand und Kulturwasser befüllten Kristallisierschale kultiviert. Aufgrund der Regenerationsfähigkeit konnte nach ca. 10 Tagen beobachtet werden, dass sich die Würmer mit Bildung eines neuen Kopfteils ins Sediment gruben. In diesem Stadium wurden die Würmer für die Wasser-Sedimentstudien eingesetzt.

Die Haltung der Würmer im Labor erfolgte bei 16°C in Glasaquarien, die mit gewaschenem Quarzsand und Kulturwasser befüllt waren. Hergestellt wurde das Kulturwasser durch Zugabe von Tropic Marin® zu demineralisiertem Wasser. Hierbei wurde eine Leitfähigkeit von 540 µS/cm eingestellt (ca. 1,4 g Tropic Marin pro 5 L demineralisiertem Wasser). Einmal pro Woche wurde das Kulturwasser erneuert. Die Fütterung erfolgte 2 Mal pro Woche mit Tetra Min Baby® (0,6-0,8 mg /cm<sup>2</sup> Sedimentoberfläche).

## 2.2 Testsubstanzen

Für die akuten Mortalitätsstudien wurden die folgenden organischen Lösemittel verwendet: Aceton, Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Methanol, Ethanol und Ethylacetat.

Die chronischen Toxizitätsstudien wurden mit drei der genannten Lösemittel durchgeführt; Aceton, DMF und DMSO.

In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen Lösemittel und die relevanten physikalisch-chemische Eigenschaften aufgeführt.

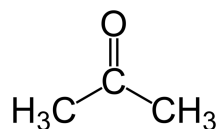
Tabelle 1: Übersicht verwendeter Lösungsmittel

Substanz	CAS-Nr.*	Dichte (20°C, g/cm <sup>3</sup> )*	Dampfdruck (20°C, hPa)*	Hersteller
Aceton	67-64-1	0,79	246	Merck (1.00012.2500)
Dimethylformamid	68-12-2	0,95	3,77	Honeywell (10314797)
Dimethylsulfoxid	67-68-5	1,10	2,5	AppliChem
Ethanol	64-17-5	0,79	58	VWR Prolabo
Ethylacetat	141-78-6	0,902	98	VWR Prolabo (83660.320)
Methanol	67-56-1	0,79	129	JT Baker (8402)

\*Quelle: wikipedia.de, Stand November 2010

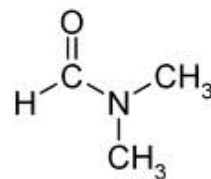
### 2.2.1 Aceton

Aceton ist eine farblose, niedrigviskose Flüssigkeit, welche als aprotisches Lösemittel Verwendung findet. Aceton dient u.a. als Ausgangsstoff für viele Synthesen der organischen Chemie, z.B. zur Herstellung von Acrylglas oder Plexiglas. Aceton ist in jedem Verhältnis mit Wasser und den meisten organischen Lösemitteln mischbar.



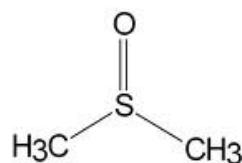
### 2.2.2 Dimethylformamid (DMF)

DMF ist eine farblose bis gelbliche Flüssigkeit. Es wird aus Ameisensäuremethylester und Dimethylamin hergestellt und ist somit ein Amid der Ameisensäure. Es dient als Lösemittel für eine Vielzahl von festen, flüssigen oder gasförmigen Stoffen, für Polymere sowie für Cellulose und deren Derivate. DMF ist mischbar mit Wasser und vielen organischen Lösemitteln.



### 2.2.3 Dimethylsulfoxid (DMSO)

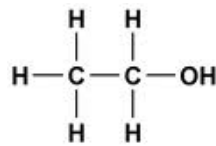
DMSO ist eine farb- und geruchlose, hygroskopische Flüssigkeit. Nach längerer Lagerung weist es häufig einen fauligen Geruch (nach Dimethylsulfid) auf. Es ist in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar, weiterhin mit vielen organischen Lösemitteln. DMSO hat antiphlogistische und analgetische Eigenschaften und findet daher therapeutische Verwendung als perkutanes Arzneimittel zur Behandlung lokaler Schmerzzustände. Es dringt leicht in Haut und Zellmembranen ein und dient daher u.a. zur Einschleusung der eigentlichen Wirkstoffe oder als Transportvermittler. DMSO wird aus Dimethylsulfid in Anwesenheit von Sauerstoff hergestellt.



### 2.2.4 Ethanol

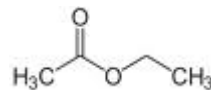
Ethanol ist eine farblose, leicht entzündliche Flüssigkeit mit charakteristischem, würzigem Geruch, die im Allgemeinen nur als Alkohol bezeichnet wird. Bekannt ist Ethanol vor allem als Trinkalkohol. Ethanol ist ein wichtiges organisches Lösemittel, eine Grundchemikalie in der Industrie und ein Desinfektionsmittel. Eine der

technischen Hauptverwendungen von Ethanol ist die Nutzung als Biokraftstoff. Ethanol ist beliebig mit Wasser mischbar.



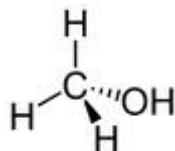
### 2.2.5 Ethylacetat

Ethylacetat, auch Essigsäureethylester genannt, ist eine farblose Flüssigkeit, die charakteristisch nach „Klebstoff“ riecht. Die Herstellung beruht auf der Veresterung von Ethanol mit Essigsäure. Es wird u.a. zur Extraktion von Antibiotika und zur Aromatisierung von Arzneimitteln verwendet. Es ist das am häufigsten eingesetzte Tötungsmittel bei der Präparation von Insekten. Ethylacetat ist nur mäßig mit Wasser mischbar (ca. bis zu 86 g/L).



### 2.2.6 Methanol

Bei Raumtemperatur ist Methanol eine klare, farblose, entzündliche und leicht flüchtige Flüssigkeit mit alkoholischem Geruch. Methanol entsteht in geringen Mengen bei Gärungsvorgängen als Nebenprodukt neben Trinkalkohol. In der chemischen Industrie werden aus Methanol Grundchemikalien wie Formaldehyd und Essigsäure hergestellt. Methanol lässt sich mit Wasser in jedem Verhältnis mischen.



## 2.3 Versuchsaufbau und Durchführung

### 2.3.1 Akute Toxizitätstests

Die akuten Toxizitätstests wurden in 24-well-Platten durchgeführt. Jedes der organischen Lösungsmittel wurde im Vergleich zu einer Kontrolle mit den folgenden Konzentrationen getestet: 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 und 100.0 g/L. Bei der Berechnung der Applikationsmenge wurde die Dichte der Substanzen berücksichtigt. Im Folgenden sind die Testkonditionen aufgeführt:

Dauer:	96 Stunden,
Applikation:	einmalig bei Teststart (statisches System)
Temperatur:	20 °C +/- 2 °C
Hell/Dunkelrhythmus:	16 h/8h
Lichtintensität:	~ 1000 lux
Test-Medium:	demineralisiertes Wasser bis zu einer Leitfähigkeit von ~ 540 µS/cm mit Tropic Marin® versetzt
Replikate:	vier pro Konzentration, ein adulter Wurm pro Replikat



Abbildung 2: Versuchsaufbau im akuten Toxizitätstest

Alle 24 Stunden wurden die Tiere unter dem Binokular begutachtet und deren Zustand dokumentiert. Krämpfe, Fragmentierung und Deformierung wurden als subletale Effekte gewertet. Die Auflösung der Zellen (Lyse), Lähmung (Paralyse), fehlende Hämolymphezirkulation und Entfärbung wurden als letale Effekte gewertet.

Als ökotoxikologischer Endpunkt wurde die Konzentration bestimmt bei, welcher 50 % der Testtiere letale Effekte zeigte (LC<sub>50</sub>). Die Berechnung des LC<sub>50</sub> erfolgte mit Spearman-Kaerber (ANELLIS & WERKOWSKI, 1968).

### 2.3.2 Chronische Toxizitätstests im Wasser-Sedimentsystem

Die drei verwendeten organischen Lösungsmittel Aceton, DMF und DMSO wurden mit einer Konzentration von 100 mg/L im Vergleich zur Kontrolle getestet. Bei der Berechnung der Applikationsmenge wurde die Dichte der Substanzen berücksichtigt. Appliziert wurde in die Wasserphase. Im Folgenden sind die Testkonditionen aufgeführt:

Dauer:	28 Tage
Applikation:	am Tag 0, 7, 14 und 21 in die Wasserphase, keine Erneuerung des Testmediums
Temperatur:	20 °C +/- 2 °C
Hell/Dunkelrhythmus:	16h/8h
Lichtintensität:	~ 300 lux
Test-Medium:	demineralisiertes Wasser wurde bis zu einer Leitfähigkeit von ~ 540 µS/cm mit Tropic Marin® versetzt; 150 mL pro Gefäß
Sediment:	50 g künstliches OECD-Substrat pro Gefäß, bestehend aus: 75 % Quarzsand 20 % Kaolin 5 % Weißtorf 0.2 % Kalk 0.5 % gemahlene Brennesselpulver als Futterquelle
Anzahl Replikate:	6 für Kontrolle und 100 mg/L, mit jeweils 10 synchronisierten Würmern pro Replikat

Das Sediment wurde einen Tag, bevor es in die Testgläser eingefüllt wurde, mit Wasser befeuchtet, bis dessen Wasserhaltekapazität erreicht war. Nach Befüllen der Testgläser wurden 150 mL Testmedium ohne Aufwirbelung vorsichtig auf die Sedimentschicht gegeben. Am Tag danach wurde die Belüftung angeschlossen. Die mit Sediment und Testmedium befüllten Gläser wurden bis zum Einsetzen der Testorganismen 14 Tage unter Testkonditionen vorequibriert. Am Tag des Teststarts wurden die Würmer in die Gefäße eingesetzt und das jeweilige Lösungsmittel appliziert. 7, 14 und 21 Tage nach Teststart wurde erneut appliziert. In jeweils einem Replikat wurden Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffkonzentration (%) bestimmt. Nach 28 Tagen wurden die Würmer gezählt. Dazu wurde das Sediment portionsweise entnommen, in eine Schale überführt und mit Wasser aus einer Spritzflasche versetzt. Die Würmer wurden vorsichtig mit einer Federstahlpinzette entnommen. Die lebenden Würmer wurden in die folgenden Kategorien eingeteilt:

- a) komplette Würmer
- b) komplette Würmer mit regenerierten Anteilen
- c) nicht komplette Würmer (kürzlich fragmentiert)

Die Ermittlung von Signifikanzen bezüglich der kompletten Anzahl der Würmer und der Verteilung in den oben genannten Kategorien wurde mit dem Statistikprogramm SAS<sup>®</sup> Proprietary Software durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Akute Toxizitätstests

Vergleicht man die Wirkung der getesteten Lösemittel Aceton, DMF, DMSO, Ethanol und Methanol miteinander, so wurde beobachtet, dass alle Würmer bei der jeweils höchsten getesteten Konzentration von 100 g/L nach spätestens 24 Stunden tot waren. Bei DMF war bereits bei 10 g/L eine Wirkung zu sehen. Bereits 24 Stunden nach Teststart konnten nur noch schwache Lebenszeichen nach Berührung beobachtet werden. Nach 48 Stunden konnte die Bewegung nur noch im Kopfbereich festgestellt werden. 72 Stunden nach Teststart lag die Mortalität bei 25%. Bei allen Würmern waren Deformationen in Form von Blasen und Verkrampfungen zu sehen. Diese Effekte wurden als letal gewertet. Somit liegt der ermittelte LC<sub>50</sub> für DMF bei 3.2 g/L, hingegen für Aceton, DMSO, Ethanol und Methanol bei 32 g/L.

Beim Herstellen der Ethylacetatkonzentration von 100 g/L konnte nach Zugabe des Ethylacetats zum Wasser eine Blasenbildung beobachtet werden. Innerhalb kurzer Zeit lösten sich diese auf. Der charakteristische Geruch von Ethylacetat breitete sich schnell aus und konnte 24 Stunden nach Teststart noch immer olfaktorisch wahrgenommen werden. Für Ethylacetat wurde 24 Stunden nach Teststart eine Mortalität von 100 % in allen Konzentrationen und der Kontrolle festgestellt. Dieses Ergebnis wurde durch die Wiederholung des Versuchs bestätigt. Aufgrund dieser Feststellung wurde Ethylacetat nicht weiter in die Analyse mit einbezogen.

Tabelle 2 zeigt die prozentuale Mortalitäten nach 96 Stunden.

Tabelle 2: Ergebnisse des akuten Toxizitätstests nach 96 Stunden, Mortalität in %

Konzentration [g/L]	Mortalität [%] für die Lösemittel					
	Aceton	DMF	DMSO	Methanol	Ethanol	Ethylacetat
Kontrolle	0	0	0	0	0	100
0,01	0	0	0	0	0	100
0,1	0	0	0	0	0	100
1,0	0	0	0	0	0	100
10,0	0	25	0	0	0	100
100,0	100	100	100	100	100	100



### 3.2 Chronische Toxizitätstests im Wasser-Sedimentsystem

Die Lösemittel Aceton, DMF und DMSO wurden im Wasser-Sedimentversuch im Vergleich zu einer Kontrolle getestet.

Im ersten Durchgang des Versuchs wurden 2 L Bechergläser, befüllt mit 350 g Sediment und 1 L Kulturwasser verwendet. Durch die große Sedimentmenge kam es allerdings zu Problemen bei der Auszählung der Würmer, da dies sehr lange dauerte und am Ende nicht sichergestellt werden konnte, dass auch alle Würmer gefunden wurden. Daher wurde der Test wiederholt, diesmal im kleineren Maßstab.

Während des Versuchs (sowohl im ersten als auch im zweiten Durchgang) entwickelte sich in den Gläsern, bei welchen DMSO zugesetzt wurde, ein auffälliger charakteristischer Geruch. Weitere Auffälligkeiten konnten während der gesamten Versuchsdauer bei keinem der getesteten Lösemittel beobachtet werden.

In keinem der Replikate wurden tote Würmer gefunden. Die Validitätskriterien ( $\geq 18$  Würmer bei Testende in der Kontrolle) der Richtlinie OECD 225 (2007) wurden eingehalten. In Tabelle 3 und Abbildung 3 sind die Anzahl der gefundenen Würmer nach Testende dargestellt.

Tabelle 3: Anzahl gefundener Würmer im chronischen Toxizitätstest nach 28 Tagen

Replikat	Status	Kontrolle	Aceton	DMF	DMSO
1	lebend	33	30	11	31
	tot	-	-	-	-
2	lebend	18	31	16	23
	tot	-	-	-	-
3	lebend	32	28	17	28
	tot	-	-	-	-
4	lebend	30	31	27	29
	tot	-	-	-	-
5	lebend	28	30	13	21
	tot	-	-	-	-
6	lebend	28	27	14	27
	tot	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	lebend	167	178	98	159

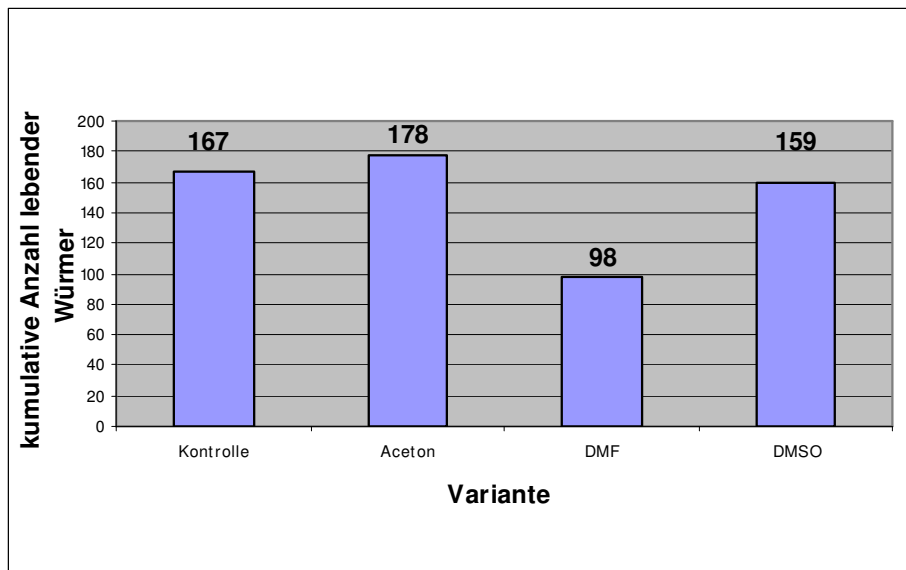


Abbildung 3: Anzahl lebender Würmer im chronischen Toxizitätsversuch

Weiterhin ist in Tabelle 4 und Abbildung 4 die Aufteilung der lebenden Würmer in die drei Kategorien „adulte komplette Würmer, komplette Würmer mit regenerierten Anteilen und nicht komplette Würmer“ dargestellt. Replikate Nr. 4 bei DMF wurde nach Dixon ( $\alpha = 0.05$ ;  $n = 6$ ) als Ausreißer deklariert.

Tabelle 4: Anzahl gefundener Würmer im chronischen Toxizitätstest pro Replikat

	Replikat						TOTAL	%
	1	2	3	4	5	6		
<b>Kontrolle</b>								
komplette Würmer	11	9	3	5	8	5	<b>41</b>	25
komplette Würmer mit regenerierten Anteilen	22	6	25	22	19	22	<b>116</b>	69
nicht komplette Würmer	-	3	4	3	-	-	<b>10</b>	6
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>18</b>	<b>32</b>	<b>30</b>	<b>27</b>	<b>27</b>	<b>167</b>	
<b>Aceton</b>								
komplette Würmer	7	5	10	4	6	5	<b>37</b>	21
komplette Würmer mit regenerierten Anteilen	21	24	14	27	24	20	<b>130</b>	73
nicht komplette Würmer	2	2	5	-	-	2	<b>11</b>	6
<b>TOTAL</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>29</b>	<b>31</b>	<b>30</b>	<b>27</b>	<b>178</b>	
<b>DMF</b>								
komplette Würmer	9	2	3	4	2	3	<b>23 / 19**</b>	27**
komplette Würmer mit regenerierten Anteilen	1	14	12	21	11	11	<b>70 / 49**</b>	69**
nicht komplette Würmer	1	-	2	2	-	-	<b>5 / 3**</b>	4**
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>27*</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>98 / 71**</b>	

DMSO	Replikat						TOTAL	%
	1	2	3	4	5	6		
komplette Würmer	9	2	12	9	0	1	33	21
komplette Würmer mit regenerierten Anteilen	22	20	16	20	20	25	123	77
nicht komplette Würmer	-	1	-	-	1	1	3	2
<b>TOTAL</b>	<b>31</b>	<b>23</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>21</b>	<b>27</b>	<b>159</b>	

\* Ausreißer nach Dixon (1953)

\*\* Werte ohne Replikat Nr. 4

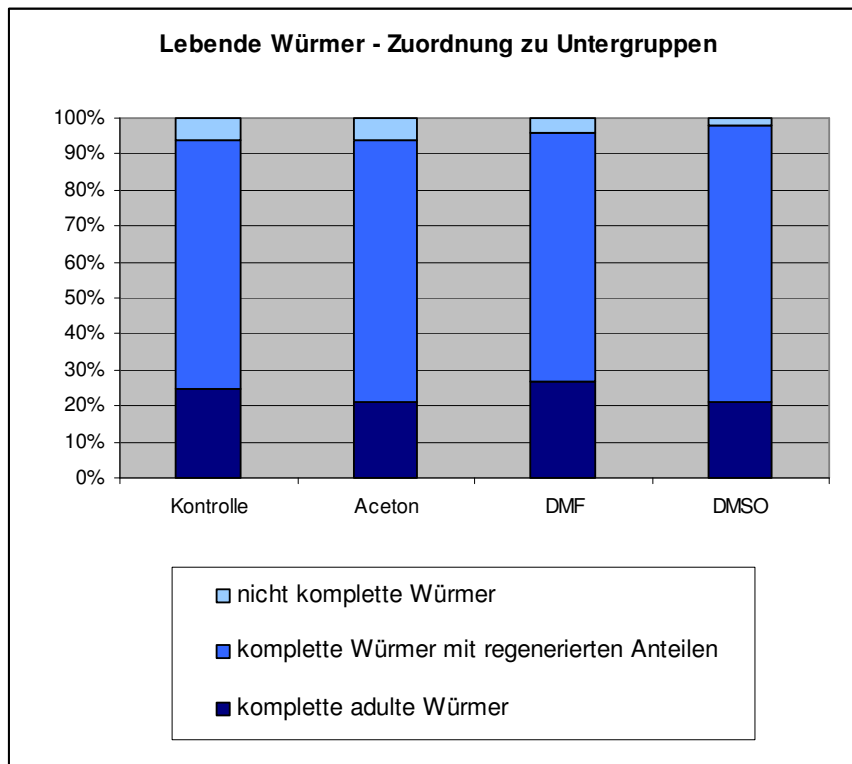


Abbildung 4: Prozentuale Aufteilung der lebenden Würmer in Kategorien

### 3.2.1 Statistische Auswertung

Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilks ermittelt, die Varianzhomogenität mittels F-Test. Im Fall von DMF und DMSO im Vergleich zur Kontrolle waren die Daten normal verteilt und varianzhomogen, im Falle von Aceton im Vergleich zur Kontrolle normal verteilt, aber nicht varianzhomogen. Zur Ermittlung von Signifikanzen wurde bei Normalverteilung und Varianzhomogenität der t-test (pooled) gewählt, bei fehlender Varianzhomogenität der t-test (satterthwaite). Zur Überprüfung, ob sich die Anzahl der Würmer in den einzelnen Kategorien der einzelnen Lösemittel im Vergleich zur Kontrolle signifikant unterscheiden, wurde ein  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

Die Anzahl lebender Würmer in der DMF-Variante unterscheidet sich signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Hier wurden deutlich weniger Würmer gefunden (Tabelle 5). Das Verhältnis der Würmer in den einzelnen Kategorien ist bei keinem der Lösemittel signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 6).

Tabelle 5: p-Werte, Anzahl gefundener Würmer der Lösemittel Aceton, DMF und DMSO im Vergleich zur Kontrolle

	Aceton	DMF	DMSO
	t- test satterthwaite	t-test pooled	
p-Werte, linksseitig	0,7719	0,0003	0,3159

Tabelle 6: p-Werte, Zustand der Würmer der Lösemittel Aceton, DMF und DMSO im Vergleich zur Kontrolle

	Aceton	DMF	DMSO
	$\chi^2$ -Test		
p-Werte	0,7049	0,9279	0,0980

Die physikalisch-chemischen Parameter wurden bei Teststart, nach jeder Applikation und bei Testende ermittelt und sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Die Bestimmung der Gesamthärte und des Ammoniumgehaltes erfolgte bei Teststart. Es konnten keine Auffälligkeiten beobachtet werden. Die gemessenen Werte liegen alle im erlaubten Bereich der OECD Richtlinie 225; 2007.

Tabelle 7: Physikalisch-chemische Parameter (Min-Max-Werte)

	Kontrolle	Aceton	DMF	DMSO
pH-Wert	8,11 – 8,47	8,10 – 8,49	7,80 – 8,53	8,24 – 8,63
Sauerstoff (%)	80 - 98	78 - 93	75 - 95	80 - 102
Temperatur (°C)	19,8 – 20,6	19,8 – 20,6	19,8 – 20,6	19,7 – 20,6
Gesamthärte (Teststart)	16	13	14	13
Ammonium (mg/L, Teststart)	0,6	0	1,0	1,0

## **4 Diskussion**

### **4.1 Akute Toxizitätsversuche**

Die Ergebnisse der Versuche zeigen, dass bei 100 mg/L bei keinem der Lösemittel toxische Effekte innerhalb von 96 Stunden beobachtet werden konnten (Ausnahme Ethylacetat, siehe 4.1.1). Erst bei einer Konzentration von 10 g/L wurden bei DMF subletale Effekte festgestellt, bei 100 g/L lag die Mortalität bei 100 %. Bei den anderen getesteten Lösemitteln wie Aceton, DMSO, Ethanol und Methanol trat erst bei der höchsten getesteten Konzentration (100 g/L) eine Mortalität von 100 % auf. Hieraus lässt sich schließen, dass alle verwendeten Lösemittel bis zu einer Konzentration von 100 mg/L ohne Effekte verwendet werden können (siehe auch 4.1.1, Probleme mit Ethylacetat).

#### **4.1.1 Probleme mit Ethylacetat**

Bei dem akuten Test mit Ethylacetat waren alle Tiere, auch die in der Kontrolle, 24 Stunden nach Teststart tot. Um eine Kontamination der Kontrollen mit Ethylacetat ausschließen zu können wurde der Test wiederholt. Dies führte aber zu keinem anderen Ergebnis. Ethylacetat zeichnet sich durch einen charakteristischen Geruch, der sich sehr schnell ausbreitet, aus. Da auch in der Kontrolle alle Würmer tot waren, lag der Schluss nahe, dass Ethylacetat abdampft. Allerdings liegt der Dampfdruck von Ethylacetat bei ca. 100 hPa, was etwa 1/10 des Normaldrucks entspricht. Somit ist Abdampfen als Ursache eher unwahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit ist die Tatsache, dass Ethylacetat leicht entzündliche Dampf-Luft-Gemische bilden kann. Dies geschieht bereits bei 20 °C. Möglicherweise ist ein solches Gemisch entstanden, welches sich dann in der 24-well-Platte ausgebreitet hat. Da das System durch einen Deckel geschlossen war, konnte das Gemisch nicht entweichen, sich aber innerhalb der Testeinheit ausbreiten. Dies könnte die gleiche Wirkung in allen Testkonzentrationen und der Kontrolle erklären.

In diesem akuten Toxizitätsversuch wurden allerdings Konzentrationen getestet, die um den Faktor 1000 höher liegen als bei der Verwendung von Lösemitteln zur Applikation erlaubt ist. Es ist sehr gut möglich, dass bei der Verwendung von max. 100 mg/L im Vergleich zur Kontrolle keine Mortalitäten aufgetreten wären.

Trotzdem wurde die Verwendung von Ethylacetat für den chronischen Versuch nicht weiter berücksichtigt.

## **4.2 Chronische Toxizitätsversuche**

### **4.2.1 Spiked water vs. Spiked Sediment**

Bei den chronischen Toxizitätsversuchen wurde, anders als von der Richtlinie OECD 225 angegeben, das jeweilige Lösemittel in die Wasserphase appliziert (spiked water) anstatt in das Sediment eingearbeitet (spiked sediment). Weiterhin wurde zwar ein statischer Test durchgeführt, die Lösemittel aber über die Testdauer im Abstand von einer Woche erneut zugegeben (Tag 0, 7, 14 und 21). Bei der Zugabe von Lösemitteln zum Sediment wird dieses auf einen Anteil Quarzsand appliziert. Das Lösemittel lässt man vollständig abdampfen, bevor man den Quarzsand in das restliche Sediment einmischt. Man geht davon aus, dass dadurch Effekte des Lösemittels auf den Testorganismus verhindert werden. Ziel dieser Arbeit war es hingegen eine Aussage über die Effekte von Lösemitteln zu gewinnen und das mögliche Risiko einer nicht vollständigen Abdampfung am Sediment zu erfassen. Aus diesem Grund wurde das Lösemittel in die Wasserphase appliziert und dies auch wöchentlich wiederholt, um eine Exposition über den gesamten Versuchszeitraum zu erhalten.

### **4.2.2 Methodik zur Austreibung der Würmer aus dem Sediment**

Die Methodik, mit welcher das Sediment nach Würmern durchsucht wurde, spielt in Bezug auf das Versuchsergebnis eine große Rolle. Die Richtlinie gibt hier vor, eine funktionierende Methode zu wählen, d.h. eine Methode, die sicherstellt, dass auch alle Würmer gefunden werden. Nicht gefundene Würmer werden als tote Würmer gezählt. Bei der ersten Durchführung des Versuchs konnte aufgrund der verwendeten Sedimentmenge von 350 g nicht sichergestellt werden, dass auch alle

Würmer gefunden wurden. Zudem war es sehr zeitaufwändig, diese Menge an Sediment zu durchzusuchen. Die Verwendung eines Wasserbads und Austreibung durch Wärme führte nicht zum Erfolg. Auch der Einsatz eines Siebs ist nicht optimal, da die Würmer nur schwer ohne Verletzung daraus zu entfernen sind. Das Mittel der Wahl ist die manuelle Suche in kleineren Sedimentportionen. Die Reduzierung der Sedimentmenge auf 50 g im zweiten Durchgang hat entscheidend zum Erfolg beigetragen. Portionsweise konnten kleinere Sedimentmengen dem Testgefäß entnommen werden und vorsichtig mit einer Spritzflasche, welche mit Wasser befüllt war, aufgewirbelt werden.

#### 4.2.3 Vergleich der Verwendung von DMF, DMSO und Aceton

Mit dem oben beschriebenen Ansatz (spiked water) wurde nur im Fall von DMF eine Wirkung auf die Anzahl lebender/gefundenen Würmer am Testende ermittelt. Die Testansätze wurden nur spärlich belüftet, um ein Ausstrippen der Lösemittel zu verhindern. DMF hat im Vergleich zu den anderen getesteten Lösemitteln einen sehr niedrigen Dampfdruck, er ist im Vergleich zu Aceton 60 Mal geringer. Der Dampfdruck von DMSO ist allerdings genau so niedrig wie der von DMF, wobei hier keine signifikante Wirkung ermittelt wurde. Es ist nicht gesagt, dass bei richtlinienkonformer Durchführung des Tests und Applikation der Lösemittel ins Sediment auch eine signifikante Wirkung ermittelt werden würde. Nach der Applikation sollten die Lösemittel vollständig aus dem System entweichen können, so dass sie tatsächlich nur als Hilfsvehikel für die zu applizierenden Substanzen dienen. Hierzu müssten weitere Versuche mit spiked sediment durchgeführt werden.

Bei der Verwendung von DMSO entwickelte sich während der kompletten Versuchsdauer ein sehr charakteristischer Geruch. Was genau zur Entstehung des Geruchs führte, ist bislang unklar. Die Anzahl der gefundenen Würmer war zwar vergleichbar mit der Kontrolle, dennoch ist dies im Vergleich zur Verwendung von Aceton ein Nachteil. Es ist unklar, ob dieser Geruch eine Auswirkung auf andere Testsysteme im selben Versuchsraum und das Personal hat.

Der Dampfdruck von Aceton ist im Vergleich zu DMF und DMSO um ein Vielfaches höher, was den Vorteil hat, dass es relativ schnell aus dem System entweicht und somit mit größerer Wahrscheinlichkeit und anders als DMF und DMSO gar nicht erst ins Testsystem eingebracht wird.

Aufgrund der Tatsache, dass DMF eine signifikante Wirkung zeigte und sich bei Verwendung von DMSO ein charakteristischer Geruch bildete, erweist sich schließlich Aceton als geeignet zur Applikation von schwer wasserlöslichen Testsubstanzen.



## 5 Literatur

ANELLIS, A. and WERKOWSKI S. (1968): Estimation of Radiation Resistance Values of Microorganisms in Food Products J. of Microbiology, Sept. 1968, p. 1300 – 1308.

ANONYMUS (2007) OECD Guideline 225: Sediment-water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment. Original URL:  
<http://www.oecdilibrary.org/docserver/download/fulltext/9722501e.pdf?expires=1296385067&id=0000&acname=freeContent&checksum=1C8DEF0C0EF7E82ED4F4C821ABF00170>

ANONYMUS (2010) <http://de.wikipedia.org/wiki/Aceton>  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Dimethylformamid>  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Dimethylsulfoxid>  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Ethanol>  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Essigs%C3%A4ureethylester>  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Methanol>  
(Stand November 2010)

ANONYMUS (2000):OECE Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. Original URL:  
[HTTP://WWW.EPA.GOV/ENDO/PUBS/REF-2\\_OECD\\_GD23\\_DIFFICULT\\_SUBSTANCES.PDF](HTTP://WWW.EPA.GOV/ENDO/PUBS/REF-2_OECD_GD23_DIFFICULT_SUBSTANCES.PDF)

DIXON, W.J. (1953):Processing data for outliers, Biometrics 9 74-89, Appendix p.89

DREWES C.D: <http://www.eeob.iastate.edu>

ECETOC MONOGRAPH No. 26 (1996): Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile and Unstable Substances

SAS INSTITUTE INC. (2002-2008). SAS<sup>®</sup> Proprietary Software 9.2; Cary, NC, USA.