

**Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Bewertung der Wirkung von Arzneimittelrückständen in der Umwelt am
Modellorganismus *C. elegans***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizinischen Wissenschaften (Dr. rer. medic.)
in der Fachrichtung Umwelttoxikologie

von Oliver Krings

Betreuer*in:

Prof. Dr. Heidi Foth

Gutachter*innen:

Prof. Dr. Wim Wätjen, Halle

PD Dr. Claudia Röhl, Dessau

Datum der Verteidigung: 02.11.2023

Referat

Die Wirkung der nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) Ibuprofen und Naproxen, sowie deren Metaboliten nach UV-C Behandlung und den beiden Störgrößen Ammonium und Nitrat aus der kommunalen Abwasserreinigung wurde am Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente dienen der Entwicklung einer neuen effizienten, nachhaltigen Abwasserreinigungsstufe für Spurenstoffe. Weiterhin wurde die Abbaubarkeit der Wirkstoffe mittels UV-C Bestrahlung und die Eignung der Methode für eine Modellkläranlage auf Grundlage der toxikologischen Untersuchungen geprüft.

Die akute Toxizität (24 und 48 h) und der Einfluss auf die Lebensspanne und Lokomotion der Nematode, zur Abbildung der chronischen Wirkung der Testsubstanzen, wurden bestimmt. Eine mögliche Beeinflussung der Reproduktion wurde ebenfalls untersucht, um die damit verbundenen potentiellen Wechselwirkungen im Ökosystem zu diskutieren.

Die Substanzen und Metaboliten zeigten keine akute Toxizität oder Effekte auf die Beweglichkeit der Nematoden. Der Wirkstoff Naproxen wirkte sich nur in den mit *E. coli* unkonditionierten Expositionsgruppen dosisabhängig auf die Lebensspanne von *C. elegans* aus. Bei der Exposition mit 25 µM Naproxen trat eine deutliche Abweichung ($p=0,00008$) der Lebensspanne, eine Reduktion der medianen Lebensspanne auf 25 % (95 % KI; 0,14-0,45), sowie der relativen Anzahl an Nachkommen/Nematode um 25 % zur Kontrolle auf. Aus der Vorkonditionierung der Bakterien mit den Wirkstoff Naproxen ließ sich eine protektive Wirkung auf den Nematoden ableiten. Es zeigten sich Veränderungen im Muster der Eiablage für die Wirkstoffe, Metabolite und Störgrößen, die mit keiner deutlichen Reduktion oder Zunahme der relativen Anzahl an Nachkommen/Nematode einhergingen. Insgesamt kann gezeigt werden, dass die beiden NSAID keine bis moderate Auswirkungen auf den Modellorganismus besitzen. Die Wirkungen waren beim Wirkstoff Naproxen ausgeprägter.

Die Störgrößen nahmen keinen Einfluss auf *C. elegans*., sodass eine Exposition unter Realbedingungen durchgeführt werden kann. Da keine adversen Effekte aus den Untersuchungen mit UV-C Strahlung behandelten Wirkstofflösungen hervorgingen und effiziente Abbaubarraten durch die Bestrahlung erzielt wurden, hat das untersuchte Verfahren ein hohes Potential für die Entwicklung einer 4. Reinigungsstufe.

Es sind Untersuchungen mit erweiterten Endpunkten, zusätzlichen Organismen höherer Trophiestufen und weiteren umweltrelevanten Arzneimittelwirkstoffen zu empfehlen.

Krings, Oliver Bewertung der Wirkung von Arzneimittelrückständen in der Umwelt am Modellorganismus *C. elegans*, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis.....	
Tabellenverzeichnis.....	
1 Einleitung	1
1.1 Arzneimittel in der Umwelt.....	1
1.2 Eintrag von Arzneimittelwirkstoffen in die Umwelt	3
1.2.1 Nichtsteroidale Antiphlogistika.....	5
1.2.2 Human- und Ökotoxizität von nichtsteroidalen Antiphlogistika.....	7
1.3 Herkömmliche Elimination von Fremdstoffen aus dem Umweltmedium Wasser.....	9
1.3.1 Störgrößen in der Abwasserbehandlung	11
1.3.2 Die vierte Reinigungsstufe	13
1.4 Modellorganismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	14
2 Zielstellung.....	16
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Material	17
3.1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	17
3.1.2 Bakterienstämme	17
3.1.3 Chemikalien	18
3.1.4 Lösungen	19
3.1.5 Medien	20
3.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	21
3.2 Methoden.....	23
3.2.1 Kultivierung, Aufkonzentrierung und Konzentrationsbestimmung von <i>Escherichia coli</i> OP50	23
3.2.2 Kultivierung von <i>Caenorhabditis elegans</i>	24
3.2.3 Synchronisation von <i>Caenorhabditis elegans</i>	25

3.2.4	Substanzkonzentrationen in den verschiedenen Expositionsgruppen	26
3.2.5	Abbau der Arzneimittelrückstände mittels UV-C Strahlung mit und ohne Sauerstoffzufuhr.....	27
3.2.6	Akuter Toxizitätstest.....	28
3.2.7	Lebensspannentest.....	29
3.2.8	Lokomotionstest.....	29
3.2.9	Nachkommenschaftstest.....	30
3.2.10	Auswertung und Statistik.....	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Untersuchungen zur akuten Toxizität	32
4.2	Untersuchungen zur chronischen Toxizität.....	35
4.2.1	Analyse der Lebensspanne	35
4.2.2	Lokomotionsassay	44
4.3	Untersuchungen zur Reproduktionstoxizität	49
4.4	Abbau von Ibuprofen und Naproxen mittels UV-C Bestrahlung	56
5	Diskussion.....	58
6	Zusammenfassung.....	72
7	Literaturverzeichnis	73
8	Thesen.....	80
	Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung	

Abkürzungsverzeichnis

AMG	Arzneimittelgesetz
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BLAC	Bund/Länder Arbeitsgemeinschaft Chemikaliensicherheit
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center, University of Minnesota, USA</i>
COX	Cyclooxygenase
EC ₅₀	mittlere akute effektive (Wirk-)Konzentration
ECHA	Europäische Chemikalienagentur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFRE	Europäische Fonds für regionale Entwicklung
EphaA	Verfahren zur kostengünstigen Abtrennung von Problemstoffen (am Beispiel von Arzneimittelrückständen)
GMBU	Gesellschaft zur Förderung von Medizin-, Bio- und Umwelttechnologien
GW	Grenzwert
HWS	Hallesche Wasser und Stadtwirtschaft GmbH
Ibu	Ibuprofen
IMS	<i>Intercontinental Marketing Service</i>
KBE	koloniebildende Einheit
KI	Konfidenzintervall
LB	<i>lysogeny broth</i> , Nährmedium zur Bakterienkultivierung
MG	Molekulargewicht
Nap	Naproxen

NGM _k	<i>nematode growth medium</i> (komplett), Kultivierungsmedium für Nematoden
NH ₄ -N	Ammonium-Stickstoff
NO ₃ -N	Nitrat-Stickstoff
NOAEL	<i>no observed adverse effect level</i> , höchste Dosis ohne beobachtete adverse Wirkung (Humantoxikologie)
NOEC	<i>no observed effect level concentration</i> , maximale nicht wirksame Dosis (Ökotoxikologie)
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> , nichtsteroidale Antiphlogistika
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OTC	<i>over the counter</i> , (rezeptfrei in der Apotheke erhältlich)
PEC	<i>predicted effect concentration</i> , abgeschätzte Effekt-Konzentration
PNEC	<i>predicted no effect concentration</i> , abgeschätzte Nicht-Effekt-Konzentration
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , Maß für die Acidität oder Alkalität einer Lösung
PMT-Stoff	Stoff, der persistent, mobil und toxisch ist
TPM	<i>touch-provoked-movement</i> - Methode zur Vitalitätsprüfung von <i>C. elegans</i> (durch Berührung provozierte Bewegung)
SBA-15	Silikatverbindung: <i>Santa-Barbara-Amorphous Type 15</i>
SD	Standardabweichung
SRU	Sachverständigenrat für Umweltfragen
UBA	Umweltbundesamt
UV-C	ultraviolettes Licht (Wellenlänge zwischen 100 und 380 nm)
WT	Wild-Typ

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformeln von Ibuprofen (A) und Naproxen (B).....	5
Abb. 2: Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> (modifiziert nach Fielenbach und Antebi (2008)).....	25
Abb. 3: UV-C Bestrahlungssystem (GMBU e.V.).....	27
Abb. 4: Akut toxische Effekte von Ibuprofen in NGM _K ohne vorkonditionierte <i>E. coli</i> 0 µM (A) und mit vorkonditionierte <i>E. coli</i> 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Ibuprofen auf <i>C. elegans</i> nach 24 und 48 h.....	32
Abb. 5: Akut toxische Effekte von Ibuprofen in NGM _K nach zehnminütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m ² (A) und bei 50 W/m ² unter Sauerstoffzufuhr (B) auf <i>C. elegans</i> nach 24 und 48 h.	33
Abb. 6: Akut toxische Effekte von Naproxen in NGM _K ohne vorkonditionierten <i>E. coli</i> 0 µM (A) und mit vorkonditionierten <i>E. coli</i> 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Naproxen auf <i>C. elegans</i> nach 24 und 48 h.	33
Abb. 7: Akut toxische Effekte von Naproxen in NGM _K nach zehnminütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m ² (A) und bei 50 W/m ² unter Sauerstoffzufuhr (B) auf <i>C. elegans</i> nach 24 und 48 h.	34
Abb. 8: Akut toxische Effekte von Ammonium (A) und Nitrat (B) in NGM _K auf <i>C. elegans</i> nach 24 und 48 h.	35
Abb. 9: Toxische Effekte von Ibuprofen in NGM _K ohne vorkonditionierten <i>E. coli</i> 0 µM (A) und mit vorkonditionierten <i>E. coli</i> 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Ibuprofen auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i>	36
Abb. 10: Toxische Effekte von Ibuprofen in NGM _K nach zehnminütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m ² (A) und bei 50 W/m ² unter Sauerstoffzufuhr (B) auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i>	37
Abb. 11: Toxische Effekte von Naproxen in NGM _K ohne vorkonditionierten <i>E. coli</i> 0 µM (A) und mit vorkonditionierten <i>E. coli</i> 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Naproxen auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i>	39
Abb. 12: Toxische Effekte von Naproxen in NGM _K nach zehnminütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m ² (A) und bei 50 W/m ² unter Sauerstoffzufuhr (B) auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i>	41
Abb. 13: Toxische Effekte von Ammonium (A) und Nitrat (B) in NGM _K auf die Lebensspanne von <i>C. elegans</i>	43
Abb. 14: Effekte von Ibuprofen in NGM _K ohne vorkonditionierten <i>E. coli</i> 0 µM (A) und mit vorkonditionierten <i>E. coli</i> 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Ibuprofen auf die Motilität von <i>C. elegans</i> nach 4, 7, 14 und 21 Tagen.	44

Abb. 15: Effekte von Ibuprofen in NGM _k nach zehnmütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m ² (A) und bei 50 W/m ² unter Sauerstoffzufuhr (B) auf die Motilität von <i>C. elegans</i> nach 4, 7, 14 und 21 Tagen.	45
Abb. 16: Effekte von Naproxen in NGM _k ohne vorkonditionierten <i>E. coli</i> 0 µM (A) und mit vorkonditionierten <i>E. coli</i> 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Naproxen auf die Motilität von <i>C. elegans</i> nach 4, 7, 14 und 21 Tagen.	46
Abb. 17: Effekte von Naproxen in NGM _k nach zehnmütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m ² (A) und bei 50 W/m ² unter Sauerstoffzufuhr (B) auf die Motilität von <i>C. elegans</i> nach 4, 7, 14 und 21 Tagen.	47
Abb. 18: Effekte von Ammonium (A) und Nitrat (B) in NGM _k auf die Motilität von <i>C. elegans</i> nach 4, 7, 14 und 21 Tagen.	48
Abb. 19: Relative Anzahl an Nachkommen pro Nematode nach Inkubation mit Ibuprofen in NGM _k ohne vorkonditionierten <i>E. coli</i> 0 µM (A) und mit vorkonditionierten <i>E. coli</i> 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Ibuprofen.	49
Abb. 20: Relative Anzahl an Nachkommen pro Nematode nach Inkubation mit Ibuprofen in NGM _k nach zehnmütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m ² (A) und bei 50 W/m ² unter Sauerstoffzufuhr (B).	50
Abb. 21: Relative Anzahl an Nachkommen pro Nematode nach Inkubation mit Naproxen in NGM _k ohne vorkonditionierten <i>E. coli</i> 0 µM (A) und mit vorkonditionierten <i>E. coli</i> 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Naproxen.	51
Abb. 22: Relative Anzahl an Nachkommen pro Nematode nach Inkubation mit Naproxen in NGM _k nach zehnmütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m ² (A) und bei 50 W/m ² unter Sauerstoffzufuhr (B).	52
Abb. 23: Relative Anzahl an Nachkommen pro Nematode nach Inkubation mit Ammonium (A) und Nitrat (B).	52
Abb. 24: Anzahl an Nachkommen pro Nematode und Tag nach Inkubation mit Ibuprofen in NGM _k ohne vorkonditionierten <i>E. coli</i> 0 µM (A) und mit vorkonditionierten <i>E. coli</i> 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Ibuprofen.	53
Abb. 25: Anzahl an Nachkommen pro Nematode und Tag nach Inkubation mit Ibuprofen in NGM _k nach zehnmütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m ² (A) und bei 50 W/m ² unter Sauerstoffzufuhr (B).	54

Abb. 26: Anzahl an Nachkommen pro Nematode und Tag nach Inkubation mit Naproxen in NGM _k ohne vorkonditionierten E. coli 0 μM (A) und mit vorkonditionierten E. coli 2,5 μM (B), 10 μM (C) und 25 μM (D) Ibuprofen.	55
Abb. 27: Anzahl an Nachkommen pro Nematode und Tag nach Inkubation mit Naproxen in NGM _k nach zehnminütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m ² (A) und bei 50 W/m ² unter Sauerstoffzufuhr (B).	55
Abb. 28: Anzahl an Nachkommen pro Nematode und Tag nach Inkubation mit Ammonium (A) und Nitrat (B).	56
Abb. 29: Abbau von Ibuprofen (A) und Naproxen (B) nach zehnminütiger Behandlung mit UV-C Strahlung ohne Sauerstoffeintrag.	56
Abb. 30: Abbau von Ibuprofen (A) und Naproxen (B) nach Behandlung mit UV-C Strahlung mit Sauerstoffeintrag.	57

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme.....	17
Tab. 2: Genutzte Chemikalien und deren Hersteller.	18
Tab. 3: Spezifikation der verwendeten Arzneimittel (Fagron Services B.V., 2017; Caelo, 2021; Kim <i>et al.</i> , 2021).	18
Tab. 4: Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung.	19
Tab. 5: Hergestellte Medien und ihre Bestandteile.....	20
Tab. 6: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Bezeichnung und Hersteller.	21
Tab. 7: Kategorisierung von <i>C. elegans</i> zur Beurteilung der Motilität.	29
Tab. 8: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Ibuprofen in NGM _k ohne und mit vorkonditionierten <i>E. coli</i>	38
Tab. 9: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Ibuprofen in NGM _k nach unterschiedlichen UV-C Behandlungen.	39
Tab. 10: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Naproxen in NGM _k ohne und mit vorkonditionierten <i>E. coli</i>	41
Tab. 11: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Ibuprofen in NGM _k nach unterschiedlichen UV-C Behandlungen.	42
Tab. 12: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Ammonium und Nitrat in NGM _k	43

1 Einleitung

1.1 Arzneimittel in der Umwelt

Der Gebrauch von Arzneimitteln ist in der heutigen Gesundheitsversorgung für Mensch und Tier unverzichtbar, um Krankheiten und Beschwerden zu heilen, lindern oder vorzubeugen, physiologische Funktionen zu modulieren oder eine medizinische Diagnose zu stellen (§2 Absatz 1 AMG). Derzeit gibt es 105.067 verkehrsfähige Arzneimittel, die in den Zuständigkeitsbereich des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte fallen. Davon sind ca. ein Drittel freiverkäuflich und nur ca. die Hälfte rezeptpflichtig (BfArM, 2022).

Arzneimittelwirkstoffe zählen zu den am besten am menschlichen Organismus untersuchten Substanzen in Bezug auf ihre Absorption, Distribution, Metabolisierung und ihre biologischen Effekte. Sie können z.B. beabsichtigt die Sekretion oder Exkretion von Drüsen anregen, die Signalübertragung zwischen Nervenzellen modulieren oder den Hormonhaushalt verändern (Lüllmann *et al.*, 2016; Geisslinger *et al.*, 2019). Wissenschaftliche Studien zur Abbildung von biologischen Effekten auf unsere Umwelt und andere Organismen fehlen allerdings für viele unserer seit langem angewendeten Humanarzneimittelwirkstoffe gänzlich (Kümmerer, 2001; SRU, 2007). Diese sind für die Durchführung einer adäquaten Umweltrisikobewertung unabdingbar.

Erst mit der EU-Richtlinie 2004/27/EG sind für alle Neuzulassung von Humanarzneimitteln Prüfungen zu möglichen Auswirkungen auf die Umwelt durchzuführen und eine Umweltrisikobewertung vorzulegen (Salomon, 2005). „Bislang liegen erst für schätzungsweise zehn Prozent der potentiell umweltrelevanten Arzneimittelwirkstoffe aus der Humanmedizin ausreichende Informationen für die Beurteilung des Umwelt-risikos vor“, so die deutsche Umweltbehörde (UBA, 2021a). Dies zeigt eine große Datenlücke im Bereich der Umweltbewertung von in Deutschland verkehrsfähigen Altarzneimitteln auf, die mit Hilfe von ökotoxikologischen Prüfungen geschlossen werden kann.

Aufgrund des kontinuierlichen Gebrauchs von Arzneimitteln zum Erhalt eines hohen Gesundheitsstandards in der Bevölkerung und in der Veterinärmedizin werden die angewendeten Arzneimittel sowie deren Metabolite ungewollt über verschiedene Eintragungspfade in unsere Umwelt eingetragen (SRU, 2007). Dies führt dazu, dass in der Umwelt wirksame Konzentrationen von Wirkstoffen zur Schmerztherapie, Empfängnisverhütung und Antibiose punktuell zustande kommen, die eine schädigende Wirkung auf Ökosysteme besitzen können (LAU, 2006; SRU, 2007; LAU, 2010; UBA, 2018; UBA, 2020b). Um eine adäquate Einschätzung der Umweltfolgewirkung der

Arzneimittelwirkstoffe vornehmen zu können, bedarf es einer differenzierten Bewertung des Gefährdungspotentials und Expositionsabschätzung der untersuchten Substanzen auf die Umwelt. Zwar besitzen manche Wirkstoffe eine hohe Wirkungsspezifität und sind nur in geringen Mengen in der Umwelt nachzuweisen, jedoch lassen sich die toxikologischen Kenntnisse zur Wirkung am Warmblüter nicht oder nur teilweise auf die Umwelt übertragen (SRU, 2007).

Neben dem Potenzial einer Substanz toxische Wirkungen zu entfalten, spielen ihre Persistenz, Bioakkumulation und Mobilität eine entscheidende Rolle (SRU, 2007). Substanzen, die zugleich alle drei Eigenschaften – persistent, bioakkumulierend und toxisch – aufweisen, nennt man PBT-Stoffe (LfU, 2016). Das Verhalten in der Umwelt ist von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Wirkstoffe, wie der Mobilität, Ladung und Löslichkeit, geprägt, da diese die Persistenz, Bioakkumulation und Verbreitung der Substanz in der Umwelt maßgeblich beeinflussen (SRU, 2007; Arp und Hale, 2019).

Stoffe mit einer hohen Persistenz, Mobilität und Toxizität werden als PMT-Stoffe bezeichnet (Arp und Hale, 2019). Die Arzneimittelwirkstoffe können natürlichen Strukturen ähneln, wie z.B. herzwirksame Glykoside oder Coffein, welche sich meist besser abbauen lassen, als synthetische Strukturen, die nicht in der Natur bestehen (Hilp, 2006). Beispielsweise wird der synthetische Wirkstoff Clofibrat (Lipidsenker) schlecht abgebaut und trotz seines seit 2003 bestehenden Einsatzverbots kann sein Metabolit Clofibrinsäure weiterhin im Trinkwasser nachgewiesen werden (LAU, 2006; LAU, 2010; Bergmann *et al.*, 2011). Die naturidentischen Wirkstoffe hingegen kommen meist in geringen Konzentrationen vor, sodass ein Eintrag hochdosierter Mengen bedenklich erscheint.

Die Bindung bzw. Anreicherung von Arzneimittelrückständen in Sedimenten, Böden, Klärschlämmen oder Organismen lässt sich nachweisen, welche zu einem späteren Zeitpunkt freigesetzt werden können (Ebert *et al.*, 2014). Gelangt ein Arzneimittelwirkstoff in die aquatische Umwelt, kommt es kurzzeitig zu hochwirksamen Konzentrationen an der Eintragsstelle. Durch den Verdünnungseffekt, im Abwassersystem und natürlichen Wasserreservoir, wie dem Grundwasser, den Oberflächen- und Küstengewässern, lassen sich die Arzneimittelrückstände jedoch in der Umwelt in nur sehr geringen Konzentrationen nachweisen (Hilp, 2006; LAU, 2006; SRU, 2007; LAU, 2010). Die Nachweisbarkeit von Arzneimittelrückständen und Spurenstoffen wird mit zunehmend besseren technischen Möglichkeiten immer genauer, so liegen die Bestimmungsgrenzen für die nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) Diclofenac und Ibuprofen bereits bei 0,005 und 0,025 µg/l (LAU, 2006). Das Umweltbundesamt (UBA) berichtet im Jahr 2021 über die Detektion von 414 unterschiedlichen

Arzneimittelwirkstoffen in der Umwelt, wovon viele in Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 1 µg/l und nur kaum Wirkstoffe >1 µg/l nachgewiesen werden konnten. Diese Arzneimittelrückstände lassen sich „nahezu flächendeckend und ganzjährig in Fließgewässern“ (UBA, 2021a), sowie im Erdboden und Grundwasser detektieren. Außerdem konnten bereits vereinzelt Spuren von Arzneimitteln im Trinkwasser festgestellt werden, welche jedoch kein Risiko für die humane Gesundheit darstellen (UBA, 2020a; UBA, 2021b). Allerdings ist künftig mit einem Anstieg der Nutzung von Arzneimitteln und somit auch mit der Einbringung dieser Wirkstoffe und deren Metabolite in den Wasserkreislauf zu rechnen. Die Ursachen für diese Annahme liegen zum einen im demographischen Wandel und zum anderen in der rezeptfreien Versorgung mit vielfach genutzten wirkungsspezifischen Arzneimitteln, wie beispielsweise Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen, mit analgetischer und antipyretischer Wirkung (SRU, 2007; Bergmann *et al.*, 2011).

1.2 Eintrag von Arzneimittelwirkstoffen in die Umwelt

Humanarzneimittel werden überwiegend über das kommunale Abwasser und Tierarzneimittel durch die Ausbringung von Mist und Gülle eingetragen. Zu den Rahmenbedingungen, die den Eintrag von Arzneimittelwirkstoffen in die Umwelt regulieren können, gehört das Arzneimittelgesetzes (AMG), dass in § 48 AMG die Bedingungen einer Verschreibung von Arzneimitteln festlegt. Eine große Anzahl an NSAID sind allerdings „*over-the-counter*“ (OTC)-Arzneimittel und können in bestimmten Mengen auch ohne ärztliche Verordnung, in sog. Selbstmedikation, angewendet werden.

Das UBA (2012) gab unter Einbezug der zusammengestellten Verbrauchsdaten von Arzneimitteln der IMS (*Intercontinental Marketing Service*) Health einen Verbrauch von ca. 8.120 t für umweltrelevante Substanzen an. Unter den sechzehn Arzneimittelwirkstoffen mit einem jährlichen Verbrauch von mehr als 80 t, die rund zwei Drittel des gesamten Jahresverbrauch ausmachen, finden sich die fünf NSAID Ibuprofen, Metamizol, Acetylsalicylsäure, Paracetamol und Diclofenac wieder. Hierunter stellte Ibuprofen im Jahr 2012 das zweithäufigste verbrauchte Humanarzneimittel mit Umweltrelevanz nach Metformin dar (Ebert *et al.*, 2014). Sehr problematisch für die Umwelt können Arzneimittel mit topischer Anwendung (Salben, Cremes, Gele, etc.) sein, da die darin enthaltenen Wirkstoffe durch die tägliche Körperhygiene ungehindert und unverändert in das Abwasser gelangen können (DVGW, 2015).

Eine weitere Eintragsquelle stellt eine unsachgemäße Entsorgung von Arzneimitteln über die häuslichen Sanitäreinrichtungen dar (Kümmerer, 2004; Götz und Keil, 2007; Klauer *et al.*, 2019). Ein großer Anteil der nicht verbrauchten oder abgelaufenen Arzneimittel kann und wird über die Restmülltonne oder in Schadstoffmobilen entsorgt.

Der gesammelte Restmüll wird nahezu vollständig in Müllverbrennungsanlagen transportiert und dort verbrannt, sodass keine Arzneimittelrückstände in die Umwelt eingetragen werden (BMG, 2022; BfArM, 2023). Allerdings werden Arzneimittel oftmals über die Toilette oder den Abfluss entsorgt und gelangen daher in den Wasserkreislauf. Für spezielle Arzneimittel, wie z.B. Medikamente zur Krebstherapie, gibt es gesonderte Rückgabemöglichkeiten, die beim behandelnden Arzt bzw. zuständigen Apotheker erfragt werden müssen (UBA, 2015; Schwarz und Leblanc, 2021; BMG, 2022). Andere nicht zu vernachlässigende Eintragsquellen sind die Abwässer von Krankenhäusern, Justizvollzugsanstalten sowie der pharmazeutischen Industrie selbst, welche in das kommunale Abwassersystem eingeleitet werden, da diese deutlich erhöhte Arzneistoffkonzentrationen aufweisen (Aus der Beek *et al.*, 2016). Gómez *et al.* (2006) wiesen diverse Antibiotika, Betarezeptorenblocker und Schmerzmittel mit Konzentrationen von bis zu 150 µg/l in Krankenhausabwässern nach.

Sowohl die landwirtschaftliche Nutzung von Klärschlämmen aus Abwasserbehandlungsanlagen oder Gülle, Jauche und Mist als auch Sickerwässer von Deponien können zur Mobilität von Human- und Tierarzneimitteln in die Umwelt beitragen (Kratz *et al.*, 2000; BLAC, 2003; Schulte-Oehlmann, 2007; SRU, 2007). Für Ibuprofen konnten Gehalte von max. 150 µg/l in Deponiesickerwässern festgestellt werden, die vor allem zu Belastungen des Grundwassers führten, so die Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Chemikaliensicherheit (BLAC) (2003).

Auch in Entwicklungs- und Schwellenländern werden Analgetika (Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen), Antibiotika (Sulfamethoxazol, Trimethoprim) und das Antiepileptikum Carbamazepin im Oberflächenwasser, Grundwasser oder Trinkwasser nachgewiesen (Aus der Beek *et al.*, 2016; Graumnitz und Jungmann, 2021).

Zu ähnlichen Beobachtungen kamen auch Kern und Lorenz (2008) zur regionalen Umweltbelastung ausgewählter Humanarzneimittel in Oberflächengewässern im Raum Halle (Saale). Sie wiesen die höchsten Gehalte an Wirkstoffrückständen, darunter Diclofenac (2.039 ng/l), Ibuprofen (63 ng/l), Naproxen (93 ng/l) und Carbamazepin (2.297 ng/l), im Ablaufwasser der Kläranlage Halle-Nord nach (Kern und Lorenz, 2008). Gegenwärtige Abwasserbehandlungsanlagen filtrieren bzw. entfernen bereits viele der umweltbedenklichen Stoffe aus den eingeleiteten kommunalen Abwässern, jedoch nicht alle. Da Oberflächengewässer in Deutschland teilweise für die Trinkwasseraufbereitung genutzt werden, sind auch geringe Gehalte an Arzneimittelwirkstoffen im Trinkwasser nachweisbar. Zu den sieben im Jahr 2013 meist verbrauchten Arzneimittelwirkstoffen, welche im Trinkwasser nachgewiesen werden konnten, zählten die vier Kontrastmittel Iomeprol (243 t), Iopromid (78 t), Amidotrizoesäure (52 t) und Iopamidol (28 t), die

beiden NSAID Ibuprofen (1.081 t) und Diclofenac (83 t), sowie das Antikonvulsivum Carbamazepin (49 t) (Brendler-Schwaab *et al.*, 2017).

Zu den bedenklichen Arzneimittelrückständen, die man im Wasserkreislauf detektieren kann, zählen somit viele unterschiedliche Substanzgruppen. Jedoch lassen sich die Gruppen anhand ihrer Eigenschaften und bezüglich der Dringlichkeit einer umwelttoxikologischen Prüfung anhand von Abbaubarkeit und Eintragsmenge einstufen (IMS Health, 2013; Brendler-Schwaab *et al.*, 2017). So zeigen vor allem Arzneimittel aus der Gruppe der NSAID eine große Umweltrelevanz, aufgrund ihrer zum Teil schlechten Abbaubarkeit, sehr hohen Eintragsmenge und ihrem toxischen Potential auf Organismen in der aquatischen Umwelt. In die Gruppe der Wirkstoffe mit einer geringen Eintragsmenge, jedoch schlechter Abbaubarkeit kann die Clofibrinsäure, ein Metabolit des Clofibrats (Kapitel 1.1) eingeordnet werden, der noch stets im Trinkwasser nachweisbar ist (SRU, 2007; Bergmann *et al.*, 2011). In der deutschen TrinkwVO (2001) gilt für Stoffe, die das Trinkwasser verunreinigen oder seine Beschaffenheit nachteilig beeinflussen ein Minimierungsgebot.

1.2.1 Nichtsteroidale Antiphlogistika

Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) – auch nichtsteroidale Antirheumatika – sind eine Gruppe von Arzneistoffen, die eine antiphlogistisch, antipyretisch und analgetisch Wirkung besitzen. Sie werden oft der Wirkstoffklasse der Analgetika zugeordnet. Im Gegensatz zu den Opioidanalgetika wirken NSAID beim Menschen nicht an den Opioidrezeptoren, welche vornehmlich im Zentralnervensystem vorzufinden sind, sondern hemmen die Cyclooxygenasen (COX) in therapeutischer Dosierung (Lüllmann *et al.*, 2017; Geisslinger *et al.*, 2019).

Trotz des intensiven Wissens um die Wirkmechanismen der NSAID sind relevante Aspekte insbesondere zur Umweltfolgewirkung nicht bekannt.

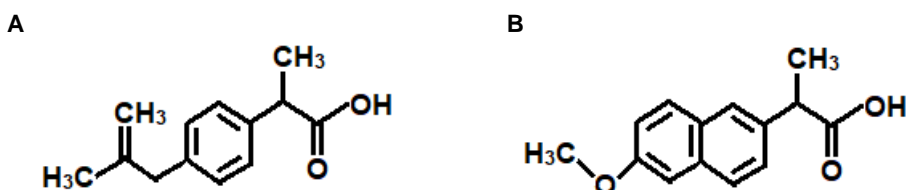


Abb. 1: Strukturformeln von Ibuprofen (A) und Naproxen (B).

In der Gruppe der NSAID sind eine Vielzahl an Wirkstoffen enthalten, darunter einige bekannte Wirkstoffe, wie die Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Paracetamol, Metamizol und Celecoxib, ein selektiver COX-2 Inhibitor. Unter diesen

Wirkstoffen stellt Ibuprofen (Abb. 1 A) die Substanz mit den höchsten Verbrauchszahlen, von 1.188,7 t im Jahr 2017 und 1.211,7 t im Jahr 2020, mit weiter steigender Tendenz dar und ist daher von besonderem Interesse für das bearbeitete Forschungsvorhaben (Bergmann *et al.*, 2011, IQVIA, 2021). Ibuprofen kann in verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen bis hin zu 400 mg Wirkstoff rezeptfrei in deutschen Apotheken erworben werden, wohingegen höhere Dosierungen rezeptpflichtig sind. Für den Wirkstoff wird eine tägliche Höchstdosis von 1.200–2.400 mg für Erwachsene und Jugendliche ab 15 Jahren empfohlen, wobei die maximale Einzeldosis 800 mg nicht überschritten werden sollte. Ibuprofen wird nahezu vollständig metabolisiert und nur zu 1 % der Dosis unverändert ausgeschieden (SRU, 2007; Geisslinger *et al.*, 2019). Zu den Metaboliten von Ibuprofen zählen z.B. 4-Isobutylacetophenon, mit bekannten adversen Effekten auf Blut- und Nervenzellen (Ruggeri *et al.*, 2013), sowie die weniger toxischen Metabolite Carboxyibuprofen und 2-Hydroxyibuprofen (Marco-Urrea *et al.* 2009) mit einer potenziell höheren Umweltbelastung aufgrund ihrer höheren Konzentrationen (Zwiener *et al.*, 2002; Collado *et al.*, 2012). Daher ist es ebenfalls notwendig die Metabolite bei der Abschätzung der Belastung durch gemessene Umweltkonzentrationen eines Arzneimittels zu berücksichtigen (Nurmi *et al.*, 2019). Der Verteilungskoeffizient $\log P_{ow}$ von 3,3 bei einem pH-Wert von 5 (BLAC, 2003) für Ibuprofen weist ebenfalls auf ein moderates Bioakkumulationspotenzial hin. Das Erreichen toxikologisch relevanter Wirkungsschwellen in aquatischen Organismen kann aufgrund der moderaten Bioakkumulationstendenz von Ibuprofen nicht mit hinreichender Sicherheit ausgeschlossen werden (BLAC, 2003). Zwar gilt Ibuprofen als biologisch leicht abbaubar, jedoch wird der Wirkstoff nur zu 58–90 % in Kläranlagen aus dem kommunalen Abwasser eliminiert (Hanisch *et al.*, 2004). Der Wirkstoff Ibuprofen lässt sich daher bereits seit längerem im Oberflächenwasser ($> 1 \mu\text{g/l}$), Grundwasser ($0,1\text{-}1 \mu\text{g/l}$) und Trinkwasser ($< 0,1 \mu\text{g/l}$) nachweisen, sodass Bergmann *et al.* (2011) den Wirkstoff „unter Berücksichtigung des ökotoxikologischen Wirkpotenzials, des Vorkommens in der aquatischen Umwelt [...] und der Entwicklung der Verbrauchsmengen im Zeitraum 2002 bis 2009“ (Bergmann *et al.*, 2011) mit einer mittleren umweltrelevanten Priorität einstuft. Ibuprofen konnte als sehr persistent und sehr mobil, sowie PMT-Stoff klassifiziert werden (Arp und Hale, 2019). Des Weiteren wurde Ibuprofen nach GefStoffV als toxisch für Wasserorganismen eingestuft und kann längerfristig zu schädlichen Wirkungen in Gewässern führen (BLAC, 2003).

Ein dem Ibuprofen strukturell sehr ähnlicher Wirkstoff ist das Naproxen, wie aus der Abb. 1 erkennbar ist. Beide Arzneimittel besitzen den gleichen Wirkmechanismus, jedoch besitzt Naproxen eine länger anhaltende Wirkung, sodass es seltener ein-

genommen werden muss. Aufgrund von unterschiedlichen Verschreibungspflichten in den USA, seit 1994 ein nicht verschreibungspflichtiges Analgetikum, und Deutschland, seit Einführung 1999 rezeptpflichtig, unterscheiden sich die Verbrauchszahlen von Naproxen in den beiden Ländern deutlich (Brune *et al.*, 2002; Herdegen, 2014). Für den Wirkstoff Naproxen sollte eine Tageshöchstdosis von 600 mg eingehalten werden (Geisslinger *et al.*, 2019). Die Verbrauchsmengen sind in Deutschland mit 29,3 t (2017) und 33,8 t (2020) deutlich geringer als die von Ibuprofen, jedoch ist ebenfalls ein Anstieg zu verzeichnen (IQVIA, 2021). Darüber hinaus weist Naproxen im Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser Konzentrationen von 0,1–1,4 µg/l auf. Angesichts eines mittleren *Predicted No Effect Concentration* (PNEC)-Wertes und der steigenden Verbrauchsmengen zwischen den Jahren 2002 und 2009 wurde Naproxen eine hohe umweltrelevante Priorität zugeordnet (BLAC, 2003; Brendler-Schwaab *et al.*, 2011). Der PNEC-Wert gibt die vorausgesagte Konzentration einer umweltbedenklichen Substanz an, unterhalb dieser keine Effekte (adverse Wirkungen) zu erwarten sind. Zur Berechnung des Wertes wird die niedrigste Konzentration bei der kein Effekt erkennbar ist, *No Observed Effect Concentration* (NOEC), aus ökotoxikologischen Untersuchungen benötigt, welche durch einen Sicherheitsfaktor (1–1.000) dividiert wird. Der Sicherheitsfaktor fällt abhängig von der Vollständigkeit der toxikologischen Daten größer (wenig aussagekräftige Daten) oder kleiner (viele aussagekräftige Daten) aus (Bergmann *et al.*, 2011).

1.2.2 Human- und Ökotoxizität von nichtsteroidalen Antiphlogistika

Neben den gewünschten Effekten besitzen NSAID auch Nebenwirkungen auf den Menschen. Je nach Dosis und Dauer der empfohlenen Anwendung mit NSAID sind beim Menschen mit vielfältigen Nebenwirkungen, wie z.B. gastrointestinalen Beschwerden, Magenschleimhautschädigungen und -blutungen, Magen- und Darmulzera, eine Verlängerung der Blutungszeit durch die Hemmung der Thromozytenaggregation (Acetylsalicylsäure), Nierenschäden (bei chronischem Gebrauch) sowie zentralnervöse Störungen, wie Kopfschmerzen, zu rechnen (Geisslinger *et al.*, 2019). Die Wirkkonzentrationen bewegen sich hierbei meist im doppelstelligen mg-Bereich. In einem Tierversuch konnte ein *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL) von 40 mg/kg Körpergewicht bei wiederholter oraler Gabe von Ibuprofen bei Affen beobachtet werden. In dieser Studie induzierte Ibuprofen toxische Wirkungen in der Niere (ECHA, 2023).

Darüber hinaus lassen sich nachweisliche adverse Effekte bei Nichtzielorganismen durch die Anwendung von Antiphlogistika beschreiben, welche entweder direkt oder indirekt durch den Wirkstoff verursacht werden (SRU, 2007; UBA, 2021a). Ferrari *et al.*

(2003) konnten akut toxische Wirkungen für den Wirkstoff Diclofenac in *Daphnia magna*, eine mittlere Effektdosis (EC_{50}) von 22,43 mg/l, beobachten, wohingegen im Leuchtbakterientest bereits eine EC_{50} von mehr als 11,5 mg/l nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus zeigten chronische Toxizitätsstudien gegenüber aquatischen *Crustaceae* und Fischen, (*Danio rerio*: *Low Observed Effect Concentration* (LOEC) von 8 mg/l) eine geringe Toxizität von des Wirkstoffes Diclofenac auf (Ferrari *et al.*, 2003). Hingegen konnten die Untersuchungen von Tribskorn *et al.* (2004) für eine kontinuierliche Exposition von 1,06 µg/l Diclofenac bei Regenbogenforellen deutliche subletale Wirkungen und histologische Veränderungen, wie glomeruläre Schäden in der Niere, beim Modellorganismus darlegen. Auch Schwaiger *et al.* (2004) zeigten, dass eine vierwöchige Exposition von Regenbogenforellen mit 5 µg/l Diclofenac zu bedeutenden pathologischen Veränderungen in den Bereichen der Niere und Kiemen führte. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Höger *et al.* (2005) nach Exposition von Bachforellen mit Diclofenac in Konzentrationen, die in Oberflächengewässern beobachtet werden. Die Exposition im µg/l-Bereich führte „zu einer Verminderung der Hämatokrit-Werte, [...] histopathologischen Veränderungen in Kieme, Restniere und Leber, sowie zu einer Zunahme der Granulozytenzahlen in Niere und Kieme und erhöhter MHC II-Expression in der Niere“ (Höger *et al.*, 2005). Auf dem indischen Subkontinent konnte in den 1990er Jahren ein enormer Rückgang mehrerer Geierpopulationen (*Gyps bengalensis*, *Gyps indicus* und *Gyps tenuirostris*), von mehr als 95 %, beobachtet werden. Der Grund für diese drastische Veränderung lag in der nephrotoxischen Wirkung des Schmerzmittels Diclofenac, welches bereits in niedriger Dosierung zu Nierenversagen bei den beschriebenen Geierarten führte. Die Geier nahmen den Wirkstoff über Rinderkadaver auf, die vor ihrem Ableben mit veterinärmedizinischen Dosen Diclofenac behandelt worden waren (Oaks *et al.*, 2004; Klauer *et al.*, 2019). Auch in weiteren Wildtierarten, wie z.B. Fischottern oder Forellen konnten Rückstände von Diclofenac nachgewiesen werden (UBA, 2020a). Dies zeigt, dass neben der Exposition des Organismus mit einer Substanz ebenfalls die Nahrungskette des Organismus eine entscheidende Rolle in der toxikologischen Bewertung spielen kann. Trotz der geringen Vergleichbarkeit der Beobachtungen mit dem Umweltmedium Wasser, zeigen diese Erkenntnisse, dass unvorhergesehene Expositionswege unter Umständen verheerende toxikologische Wirkungen auf die Umwelt beherbergen können (Klauer *et al.*, 2019).

Untersuchungen mit dem Wirkstoff Ibuprofen zeigten für Bakterien eine akute Toxizität bei einer Konzentration von 12,3 mg/l (Hanisch *et al.*, 2002). Bei der Exposition von Algen und Wasserlinsen gibt es deutliche Unterschiede in der mittleren Effektdosis der Substanz bei verschiedenen Spezies. Cleuvers (2003) gibt eine EC_{50} von 315 mg/l Ibuprofen im Grünalgentest mit *Desmodesmus subspicatus* an. Jedoch sind die

Kieselalge *Skeletonema costatum* und Wasserlinse *Lemna gibba* deutlich empfindlicher gegenüber einer Exposition mit Ibuprofen (im unteren mg-Bereich), so Cleuvers (2003). Eine andere Studie von Brain *et al.* (2004) zeigte hingegen keine toxischen Effekte von Ibuprofen auf die Wasserlinse *Lemna gibba* auf. Ähnlich große Unterschiede lassen sich in den Ergebnissen der akuten Toxizität von Ibuprofen auf den Modellorganismus *Daphnia magna* finden. Die Arbeitsgruppen Halling-Sørensen *et al.* (1998) und Stuer-Lauridsen *et al.* (2000) stellten eine EC₅₀ um 10 mg/l fest, wohingegen Cleuvers (2003) eine ca. elffache höhere EC₅₀ von 108 mg/l beobachtete. Die NOEC für *Lepomis macrochirus* wird von Hanisch *et al.* (2002) mit 10 mg/l Ibuprofen beschrieben. Die langfristigen Auswirkungen von Ibuprofen auf die Umwelt und Nichtzielorganismen sind weitgehend unbekannt (SRU, 2007).

Die Datenlage zur ökotoxikologischen Wirkung des Wirkstoffes Naproxen ist sehr begrenzt. Isodori *et al.* (2005) beobachteten bei drei verschiedenen *Crustacea* akut toxische Werte von EC₅₀ und mittlere akute Letalkonzentration im mg/l-Bereich. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass einige Metabolite von Naproxen bei chronischer Exposition im Niedrigdosisbereich (µg/l) eine Hemmung des Populationswachstums bei *Ceriodaphnia dubia* induzierten (Isodori *et al.*, 2005). Die Arbeitsgruppe um Kwak *et al.* (2018) bestimmte für die chronische Exposition von *Moina macrocopa* eine NOEC von 0,3 mg/l Naproxen.

Im Vergleich zu den Einzelsubstanzen Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Acetylsalicylsäure, beschreibt Cleuvers (2004) eine erhebliche Steigerung der Toxizität bei Mischung der vier Substanzen. Die Untersuchungen mit unterschiedlichen Wirkstoffgemischen von Flaherty und Dodson (2005) zeigten, dass Gemische von Wirkstoffen zu ökotoxikologischen Effekten führen können, die nicht von dem Verhalten der Einzelsubstanz abgeleitet werden kann und oftmals die Wirkung der Substanz überstieg (Bergmann *et al.*, 2011). Es ist daher möglich, dass Substanzen „in einer Konzentration unterhalb ihrer individuellen NOEC in einer Stoffmischung den ökotoxikologischen Effekt steigern“ (Fent *et al.*, 2006).

1.3 Herkömmliche Elimination von Fremdstoffen aus dem Umweltmedium Wasser

Der Wasserverbrauch in Deutschland pro Person und Tag beträgt ca. 120 l. Das Wasser wird unter anderem für die alltägliche Körperhygiene, die Toilettenspülung, zum Waschen und Reinigen von Oberflächen und für die Zubereitung von Lebensmitteln genutzt, wodurch eine große Menge Schmutzwasser aufkommt. Dieses enthält eine Vielzahl an Fremdstoffen, wie organische und chemische Verbindungen, Schwermetalle, Medikamentenrückstände und Feststoffe (Toilettenpapier, Küchenabfälle), die nicht in

die Oberflächengewässer und ins Grundwasser gelangen dürfen (LfU, 2016). Daher wird das Abwasser vor der Einleitung in die aquatische Umwelt in den Abwasserbehandlungsanlagen gereinigt. Die Reinigung, der in die kommunalen Kläranlagen eingeleiteten Wässer, erfolgt in einem dreistufigen Verfahren, welches alle Fremdstoffe entfernen soll (LfU, 2013; BMUV, 2014).

In der ersten Phase, der mechanischen Abwasserreinigung, werden vor allem größere Feststoffe mittels Rechen und Sandfang aus dem Abwasser entfernt. Feinere Feststoffe setzen sich auf dem Vorklärbeckenboden ab, welche den sog. Klärschlamm bilden (LfU, 2013). Im Klärschlamm befinden sich neben Schwermetallen, eine Vielzahl organischer Schadstoffe, wie Arzneimittelrückstände oder Krankheitserreger, Nanomaterialien und Kunststoffreste, weshalb dieser heute zu mehr als der Hälfte thermisch entsorgt wird, statt ihn in der Landwirtschaft als Düngemittel wiederzuverwerten (Roskosch und Heidecke, 2018).

Die zweite Reinigungsstufe, die biologische Abwasserbehandlung, eliminiert lösliche organische Substanzen mithilfe von aeroben und anaeroben Bakterien, der sog. Belebtschlamm. Die Mikroorganismen können neben den organischen Verbindungen auch Schadstoffe, wie Schwermetalle oder Arzneimittelwirkstoffe aufnehmen. Nach der Reinigung kann der Belebtschlamm entweder wiederverwendet werden oder wird dem Klärschlamm zugeführt (LfU, 2013; BMUV, 2014).

In der dritten und letzten Reinigungsstufe, der weitergehenden Abwasserbehandlung für gezielte Nährstoffe, sollen die restlichen organischen Verbindungen, sowie die Phosphor- und Stickstoffverbindungen aus dem vorgeklärten Wasser entfernt werden. Dem Abwasser werden chemische Fällmittel, wie Aluminiumchlorid oder Eisensulfat, zugeführt, wodurch die Phosphate zu wasserunlöslichen Metaboliten reagieren, Ausfällen und sich auf dem Boden absetzen. Die Stickstoffverbindungen werden mittels spezieller Bakterienstämme aus dem Abwasser eliminiert (LfU, 2013; BMUV, 2014; Roskosch und Heidecke, 2018).

Alle bis zu diesem Zeitpunkt nicht aus dem Abwasser eliminierten Substanzen werden in die aquatische Umwelt eingetragen und können dort möglicherweise negative Effekte auf das Ökosystem besitzen. Aus dem Bericht zum Sondermessprogramm 2002–2004 über Arzneistoffe in Zu- und Abläufen von kommunalen Kläranlagen des Landes Sachsen-Anhalt geht die Spitzenkonzentration im Kläranlagenzulauf, aller im Bericht untersuchten Wirkstoffe und Kläranlagen, von 22,8 µg/l Ibuprofen in der Abwasserbehandlungsanlage Freyburg hervor. Nach durchlaufener Abwasserbehandlung fanden sich weiterhin bis zu 9,6 µg/l Ibuprofen im Kläranlagenablauf. In den anderen untersuchten Kläranlagen unterschritten die gemessenen Konzentrationen des Wirkstoffes Ibuprofen im Kläranlagenablauf, die Bestimmungsgrenze von 0,025 µg/l selten. Darüber

hinaus konnte für Ibuprofen die größte Jahresfracht von durchschnittlich 246 µg/l Ibuprofen im Kläranlagenzulauf beobachtet werden. Auffällig war, dass die Kläranlagen den Arzneimittelwirkstoff Ibuprofen im Abwasser unterschiedlich gut zurückhalten konnten. So zeigten die Kläranlagen abhängig der Zulaufkonzentration des Wirkstoffes und Größenklasse (GK) der Abwasserbehandlungsanlage verschiedene Rückhaltevermögen von ca. 81–99,7 % für Ibuprofen auf (LAU, 2006). Dies wird ebenfalls im 3. Bericht zum Messprogramm Arzneistoffe im Grundwasser, in Fließgewässern und in Zu- und Abläufen von kommunalen Kläranlagen des Landes Sachsen-Anhalt (2006 bis 2007) deutlich. Die Kläranlage Oranienbaum wies deutlich erhöhte Frachten an Ibuprofen im Vergleich zur ähnlich ausgestatteten Kläranlage Zörbig auf. Überdies ließ sich ein Anstieg der Ablauffrachten für Ibuprofen in der untersuchten Kläranlage Stendal für das Jahr 2006 zum Vorjahr feststellen (LAU, 2010). Das Rückhaltevermögen von Naproxen in der konventionellen Abwasserreinigung wird von diversen Literaturquellen mit ca. 54 % angegeben (Römer, 2018).

Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Forschungsgruppe Kern und Lorenz (2008), die Rückstände ausgewählter Humanarzneimittel in Oberflächenwasserkörpern im Einzugsgebiet Halle (Saale) untersuchten. Im Kläranlagenablauf der Abwasserbehandlungsanlage Halle-Nord konnten mit Abstand die höchsten Konzentrationen für die untersuchten Arzneimittelwirkstoffe bestimmt werden. Kern & Lorenz (2008) konnten sichtbar erhöhte Konzentrationen für die Schmerzmittel Fenoprofen, Ibuprofen und Naproxen, sowie 2,0 µg/l für Diclofenac und 0,3 µg/l für Paracetamol messen. Trotz des Verdünnungseffektes mit zunehmender Entfernung zur Kläranlage, ließen sich die Wirkstoffe in der Saale an den Probennahmen bei Lettin und Salzmünde (unterhalb des Kläranlagenablaufes), abhängig vom Verteilungs- und Abbauverhalten noch deutlich erkennen (Kern und Lorenz, 2008).

Die vielfältigen Messprogramme zu Vorkommen und Verbleib von Humanarzneimittelwirkstoffen in der Umwelt belegen die unzureichende Elimination von Pharmaka durch die konventionellen Abwasserreinigungsverfahren.

1.3.1 Störgrößen in der Abwasserbehandlung

Zum Schutz von Gewässern vor dem Eintrag von Störgrößen gelten für den Kläranlagenablauf gesetzlich festgeschriebene Grenzwerte für gewisse Fremdstoffe gemäß der Abwasserverordnung (AbWVO) Anhang 1 "Häusliches und kommunales Abwasser", welche anhand der Größenklasse (GK) der Kläranlage gestaffelt sind. Größere Abwasserbehandlungsanlagen unterliegen höheren Ansprüchen bezogen auf ihre Reinigungsleistung. Da die regionale Kläranlage Halle-Nord als Referenzkläranlage im EFRE-Projekt „Verfahren zur kostengünstigen Abtrennung von Problemstoffen am

Beispiel von Arzneimittelrückständen“ (EphaA) herangezogen wurde und es sich hierbei um eine Abwasserbehandlungsanlage der GK 5 handelt, wurden die Grenzwerte für die GK 5 für die wissenschaftlichen Fragestellungen, Untersuchungen und die daraus hervorgehende Diskussion herangezogen. Eine Abwasserbehandlungsanlage der GK 5 unterliegt den gesetzlichen Anforderungen für die Parameter chemischer Sauerstoffbedarf von 75 mg/l, biochemischer Sauerstoffbedarf in fünf Tagen von 15 mg/l, Ammoniumstickstoff (NH₄-N) von 10 mg/l, Gesamt-Stickstoff (Summe von Ammonium-, Nitrit- und Nitratstickstoff) von 13 mg/l und Gesamt-Phosphor von 1 mg/l (LfU, 2013). Darüber hinaus wurde ein Grenzwert für Nitratstickstoff (NO₃-N) max. 20 mg/l von der Halleschen Wasser und Stadtwirtschaft GmbH (HWS) im Abwassermanagement der Kläranlage Halle-Nord angegeben. Die Einhaltung der geforderten Grenzwerte wird im Rahmen der eigenen täglichen Routineuntersuchungen im Kläranlagenbetrieb und durch behördliche Kontrollen geprüft (LfU, 2013). Gelegentlich kommt es jedoch auch hier aufgrund von hohen Fremdstoffkonzentrationen im Zulauf des Abwassers zu Grenzwertüberschreitungen. In der Zusammenarbeit im Projekt „EphaA“ mit der GMBU e.V. und HWS zeigten die Messgrößen NH₄-N und NO₃-N das höchste Potential einer gesetzlichen Grenzwertüberschreitung, weshalb diese beiden Substanzen als mögliche zusätzliche Störfaktoren auf den Modellorganismus *C. elegans* neben den Arzneimittelwirkstoffen Ibuprofen und Naproxen in den experimentellen Fragestellungen untersucht wurden.

Kontinuierlich erhöhte Stickstoffkonzentrationen können die Biozönose in normalerweise niedrig konzentrierten Ökosystemen gefährden, da diese von weit robusteren Arten verdrängt werden können. Zettler und Jueg (2001) zeigten in ihrer Studie, dass einige Gewässerorganismen, wie die Bachmuschel (*Unio crassus*), aufgrund erhöhter Stickstoffkonzentrationen in Gewässern nicht mehr vorkommen. Die unter anderem durch den vermehrten Eintrag von Stickstoffverbindungen verursachte Übersäuerung von Gewässern führt dazu, dass Fische und andere Lebewesen der Fließgewässer ihre natürlichen Habitate verlieren und dadurch aussterben können. „In Nordeuropa war in den letzten Jahrzehnten die Säurebelastung in vielen Flüssen und Seen so hoch, dass es kaum noch Fische gab.“, so das UBA (2011). Darüber hinaus können erhöhte Phosphor- und Nitratgehalte in Gewässern das Pflanzenwachstum erhöhen und somit zu einer Eutrophierung des Gewässers führen (UBA, 2011).

Weitergehend gelten für die Einleitung der Kläranlagenabläufe in Oberflächengewässer keine zusätzlichen chemischen Parameter, die z.B. den Eintrag von Arzneimittelwirkstoffen oder sonstigen umweltrelevanten Fremdstoffen regulieren und kontrollieren (Kern und Lorenz, 2008). Somit können diese Substanzen ungehindert in den Wasserkreislauf eingetragen werden. Dies wird besonders relevant, wenn die Substanzen in

Grund- oder Oberflächengewässer gelangen, die für die Trinkwassergewinnung genutzt werden. Die deutsche TrinkwV setzt die Rahmenlinien für die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. Demnach darf das Trinkwasser keine chemischen Stoffe in Konzentrationen enthalten, welche zur Beeinträchtigung der menschlichen Gesundheit führen können. Die Konzentrationen der unerwünschten chemischen Substanzen sollen im Trinkwasser entsprechend dem Stand der Technik so gering wie möglich gehalten werden. Die Anlage 2 der TrinkwV gibt darüber hinaus gesetzlich festgeschriebene Grenzwerte für einige Parameter wie z.B. Blei oder Nitrat an, die nicht überschritten werden dürfen.

1.3.2 Die vierte Reinigungsstufe

Um mögliche umweltrelevante Mikroverunreinigungen, wie Arzneimittelrückstände, aus dem Abwasser vor der Einleitung in die aquatische Umwelt zu eliminieren, wäre eine vierte erweiterte Abwasserreinigungsstufe in Kläranlagen und bei Einleitern mit hohen Konzentrationen vorzuschlagen. Entscheidend für das Eliminationsverhalten dieser Spurenstoffe sind insbesondere die Molekülstruktur, die Polarität, das Sorptionsverhalten der Substanzen (Kaub und Biebersdorf, 2014). Es bestehen inzwischen verschiedene wirksame Technologien, wie die Ozonung und Aktivkohlefiltration, die eine verbesserte Reinigungseffizienz für anthropogene Substanzen bieten. Beide Verfahren entfernen bis hin zu 80 %, der im kommunalen Abwasser enthaltenen Spurenstoffe (Günthert und Rödel, 2013). Auch der Einsatz von Membrantechnologien, wie die Nano- und Umkehrosmosefiltration, zeigt eine hohe Effizienz, mit Eliminationsraten von über 97 %, bei der Minderung von Arzneimittelrückständen in Kläranlagen (SRU, 2004; Herberer und Feldmann, 2004). Letztlich würde eine Installation und der kontinuierliche Betrieb dieser Technologien die Abwasserreinigungskosten um schätzungsweise 0,01-0,05 €/m³ für eine Ozonungsanlage, ca. 0,20 €/m³ für eine Aktivkohlebeimengung und ca. 0,19 bzw. 0,30–0,50 €/m³ für eine Membrantechnologie anheben. Die hierbei aufkommenden Kosten können jedoch je nach bestehender Kläranlagenkonzeption, Abwasserzusammensetzung und den Reinigungszielen stark davon abweichen (Ternes *et al.*, 2004; Liebig, 2005; Bahr *et al.*, 2007). Die Kosten für eine flächendeckende Einführung einer vierten Reinigungsstufe in Deutschland werden auf bis zu 1,2 Mrd. €/Jahr geschätzt, was im Umlageverfahren über die Abwassergebühren einer durchschnittlichen Gebührenerhöhung von ungefähr 15,20 €/Jahr/Person entsprechen würde (Civity, 2018). Darüber hinaus sind die derzeitigen Filtersysteme, wie die Aktivkohle, aus ökologischen Gesichtspunkten bedenklich, da die Herstellungs- und Recyclingverfahren energetisch ungünstig sind und einen hohen CO₂-Eintrag verursachen (Civity, 2018). Das Verfahren der Ozonung erzeugt hohe Betriebs- und

Personalkosten, bedarf hoher Sicherheitsanforderungen und einer ganzjährig funktionierenden Belebungsanlage, weil eine hohe gelöste Kohlenstofffracht den Ozonbedarf erfahrungsgemäß steigert (Sistig, 2016). Entsprechend ist die Erforschung neuer kostengünstiger und nachhaltiger Verfahren notwendig.

Eine neuartige, nachhaltige und kostengünstige Filtrationsmethode für wasserlösliche Spurenstoffe, der GMBU eV, die aus dem Kooperationsprojekt „EphaA“ hervorging, beruht auf einem Filtersystem mit einer Membranoberfläche aus der Silikatverbindung *Santa-Barbara-Amorphous Type 15* (SBA-15). Das SBA-15 reichert die Problemstoffe an, welche anschließend mittels UV-C Strahlung mit und ohne Sauerstoffzufuhr wieder abgetrennt werden sollen, sodass der Filter regeneriert und wiederverwendet werden kann. Die nach der Oxidation des Filtersystems möglicherweise entstandenen aktiven Metabolite sollen daher in dieser wissenschaftlichen Arbeit auf ihre umwelttoxikologische Unbedenklichkeit geprüft werden.

1.4 Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) ist ein ca. 1 mm großer Invertebrat und gehört zum Stamm der Fadenwürmer (Nematoden), die mit ca. 20.000 beschriebenen Arten zu den artenreichsten vielzelligen Tiergruppen zählen. Der Nematode lebt nicht parasitär in nahezu jedem Biotop (Boden, Salz- und Süßwasser) und ist nicht humanpathogen. Seit den Arbeiten von Sydney Brenner 1965 wurde *C. elegans* zu einem der intensivsten untersuchten Organismen und stellt heute neben *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Mus musculus* und dem Menschen einen bedeutenden Modellorganismus dar. Der erste multizelluläre Organismus, dessen Genom vollständig entschlüsselt wurde, war der Fadenwurm *C. elegans* (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Zwischen 60 und 80 % der menschlichen Gene besitzen ein Ortholog im Modellorganismus *C. elegans*. Für *C. elegans* wurden hunderte genetisch unterschiedliche Stämme beschrieben, darunter isolierte Wildtypen (WT) und Mutanten (Corsi *et al.*, 2015). Der Organismus wird unter anderem als *in-vivo* Modell für Zell-Zyklus-Kontrolle, Apoptose und Alterungsprozesse, in der Genetik, Biochemie, Zell-, Entwicklungs- und Neurobiologie verwendet. Darüber hinaus findet *C. elegans* bereits Beachtung als Modellsystem in der Umwelttoxikologie und Pharmakologie, um z.B. Wirkpotenziale ermitteln zu können. Somit stellt der Fadenwurm *C. elegans* ein Brückenorganismus in der Toxikologie dar, da er die Lücke zwischen der Übertragbarkeit der Human- und Ökotoxikologie schließen kann (Brenner, 1973; Dengg und van Meel, 2004; Artal-Sanz *et al.*, 2006).

Aufgrund seiner geringen Ansprüche an seine Umgebung lässt sich *C. elegans* kostengünstig und einfach unter Laborbedingungen kultivieren. Zum Kulturerhalt benötigt der Nematode ein humides Milieu, moderate Temperaturen zwischen 12 °C und 25 °C,

Sauerstoff und Bakterien wie *E. coli* als Nahrungsquelle. Der adulte Nematode lässt sich aufgrund seiner geringen Größe von 1 mm und seiner hohen Reproduktionsrate auf geringem Raum (40x10 mm Petrischalen) in großer Anzahl kultivieren. Der selbstbefruchtende Hermaphrodit produziert innerhalb seines Lebenszyklus bis zu 300 Nachkommen, welche er nahezu alle innerhalb von drei bis fünf Tagen hervorbringt. Diese Eigenschaften ermöglichen umfassende Untersuchungen zur Reproduktion und Lebensspanne der Fadenwürmer. Bei den toxikologischen Untersuchungen sind unterschiedliche Parameter wie z.B. Temperatur und Nahrungsverfügbarkeit stets zu beobachten, da sowohl die Ausbildung der verschiedenen Larvenstadien als auch die Reproduktion von *C. elegans* von diesen abhängig sind. Bei ungünstigen Umweltbedingungen, wie z.B. Nährstoffunterversorgung bilden die Larven ein Dauerstadium aus, welches mehrere Monate überleben kann. Der Lebenszyklus kann durch höhere Temperaturen beschleunigt oder niedrigere Temperaturen verlangsamt werden. Der Nematode besitzt eine hohe Anpassungsfähigkeit bezüglich seines Habitats, weshalb er sich sowohl in terrestrischen als auch aquatischen Biotopen finden lässt. *C. elegans* ist für die Untersuchungen der aquatischen Umwelt geeignet und stellt somit einen adäquaten Modellorganismus für die der Dissertation zugrundeliegenden Fragestellungen.

2 Zielstellung

Die hohen Verbrauchsmengen an Humanarzneimitteln, die dem Erhalt der menschlichen Gesundheit dienen, führen zu einem stetigen und ungewollten Eintrag von Arzneimittelwirkstoffen in die Umwelt. In den komplexen und vielschichtigen Ökosystemen können diese am Menschen gut beschriebenen Wirkstoffe auf Nichtzielorganismen einwirken und adverse Effekte hervorrufen.

Die Brücke zwischen der Wirkung am Menschen und in der Umwelt kann mit Hilfe der Nematode *C. elegans* geschlagen werden. Der Organismus ist hinsichtlich seiner Physiologie und Stoffwechsellleistungen gut beschrieben. Zudem ist auch der gesamte Lebenszyklus methodisch gut zu beurteilen.

Die Verbrauchsmenge der nichtsteroidalen Antiphlogistika Ibuprofen und Naproxen sind hoch und aufgrund der schlechten Abbaubarkeit werden sie in die aquatische Umwelt eingetragen. Überdies ist die Langzeitwirkung dieser Wirkstoffe auf ökotoxikologische Endpunkte weitgehend unbekannt.

Die wissenschaftliche Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, die fehlenden Daten zur chronischen Wirkung der Arzneimittel in der Umwelt zu erschließen und eine effiziente und nachhaltige Methode zur Elimination von Arzneimittelwirkstoffe auf ihre ökotoxikologische Unbedenklichkeit zu prüfen.

Um sich einer Exposition im Ökosystem weiter anzunähern, wurden die Bakterien *E. coli*, die den Nematoden als Nahrung dienen, mit den Wirkstoffen vorkonditioniert, wodurch eine Vorbelastung des Modellorganismus über die Nahrung untersucht werden sollte.

Die Ziele dieser Arbeit sind daher die Beschreibung der Sensitivität von *C. elegans* bezüglich der:

- akuten Wirkung nach Einmaldosis
 - Letalität von *C. elegans* im Hochdosisbereich
- chronischen Endpunkte nach wiederholter Gabe
 - Erfassen der Überlebenszeit von *C. elegans*
 - Veränderung der Beweglichkeit mittels Lokomotionsassay
 - Stabilität der Reproduktion mittels Nachkommenschaftstest
- Störgrößen von Seiten der kommunalen Abwasserreinigung
 - Ammonium und Nitrat
 - UV-Bestrahlung

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 *Caenorhabditis elegans*

Für die einzelnen Experimente wurde jeweils der Stamm N2 mit dem Genotyp Wild-Typ (WT) der Nematode *Caenorhabditis elegans* verwendet. Der Organismus Stamm VC2010 wurde im Jahr 2012 vom *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) bezogen und seitdem am Institut für Umwelttoxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg kultiviert (CGC, 2008). Die Verwendung von transgenen Würmern wurde aufgrund der hohen Sicherheitsanforderungen, die aus dem GenTG im Umgang mit gentechnisch veränderten Organismus hervorgehen, und der damit schlechten Umsetzbarkeit in einer kommunalen Kläranlage für die wissenschaftlichen Untersuchungen ausgeschlossen.

3.1.2 Bakterienstämme

Für die Kultivierung von *C. elegans* wurden die Enterobakterien *Escherichia coli* (*E. coli*), welche ebenfalls 2012 vom CGC bezogen wurden, verwendet (CGC, 2020). In Vorversuchen wurde der *E. coli* Bakterienstamm OP50-1, welcher eine Streptomycinresistenz besitzt, genutzt. Die Arbeitsprozesse im Labor wurden so optimiert, dass in den anschließenden toxikologischen Untersuchungen der Bakterienstamm OP50 verwendet werden konnte.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme.

Genotyp	Stamm	Beschreibung	Herkunft
<i>E. coli</i>	OP50	Uracil auxotroph	CGC, University of Minnesota (MN)
<i>E. coli</i>	OP50-1	Uracil auxotroph, Streptomycinresistenz	CGC, University of Minnesota (MN)

3.1.3 Chemikalien

Tab. 2: Genutzte Chemikalien und deren Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
Agar-Agar, bakteriologisch	Carl-Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumchlorid	Carl-Roth, Karlsruhe, DE
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cholesterol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol absolut 99 %	Merck, Darmstadt, DE
Ibuprofen	Caesar & Loretz, Hilden, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, DE
LB-Agar (Lennox)	Carl-Roth, Karlsruhe, DE
LB-Medium (Lennox)	Carl-Roth, Karlsruhe, DE
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, DE
Naproxen	Divi's Laboratories (unit II), IN
Natriumchlorid (NaCl)	Carl-Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl-Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhypochloritlösung 13 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Natriumnitrat (NaNO ₃)	Carl-Roth, Karlsruhe, DE
Pepton aus Fleisch	Carl-Roth, Karlsruhe, DE

Tab. 3: Spezifikation der verwendeten Arzneimittel (Fagron Services B.V., 2017; Caelo, 2021; Kim *et al.*, 2021).

Spezifikation	Ibuprofen	Naproxen
CAS-Nummer	15687-27-1	22204-53-1
Molekulargewicht (MG)	206,28 g/mol	230,26 g/mol
Löslichkeit in Wasser bei 25 °C	0,021 g/l	0,0159 g/l

3.1.4 Lösungen

Für jeden Versuchsdurchlauf wurden die verwendeten Lösungen frisch zubereitet, um die eingestellte Konzentration bzw. Wirksamkeit der Lösung über den gesamten Beobachtungszeitraum zu gewährleisten. Die Stammlösungen wurden mit Hilfe eines Membranfilters sterilfiltriert.

Tab. 4: Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung.

Lösung	Zusammensetzung
Ammonium-Stammlösung (42,9 mM)	2,295 g NH ₄ Cl ad 1 l dH ₂ O
Bleichelösung (500 µl)	250 µl Natriumhydroxidlösung 5 mol/l 250 µl Natriumhypochloritlösung 13 %
Ibuprofen-Stammlösung (50 µM)	10,31 mg Ibuprofen ad 1 l dH ₂ O
Lösung A	0,5 g Cholesterol ad 100 ml Ethanol (99 %, absolut, unvergällt)
Lösung B (1 M CaCl ₂)	36,8 g CaCl ₂ ad 250 ml dH ₂ O autoklaviert
Lösung C (1 M MgSO ₄)	61,6 g MgSO ₄ ad 250 ml dH ₂ O autoklaviert
Lösung D (1 M KPO ₄ Puffer)	108,3 g KH ₂ PO ₄ 35,6 g K ₂ HPO ₄ ad 1 l dH ₂ O; pH 6 einstellen autoklaviert
Naproxen-Stammlösung (50 µM)	11,51 mg Naproxen ad 1 l dH ₂ O
Natriumhydroxidlösung 5 M	MG: 39,997 g/mol Einwaage: 1 g ad 5 ml dH ₂ O
Nitrat-Stammlösung (85,8 mM)	7,287 g NaNO ₃ ad 1 l dH ₂ O

3.1.5 Medien

Tab. 5: Hergestellte Medien und ihre Bestandteile.

Medium	Bestandteile
LB-Agar	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto <i>Yeast Extract</i> 5 g Natriumchlorid 20 g Bacto Agar ad 1 l H ₂ O autoklaviert
LB-Medium	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto <i>Yeast Extract</i> 5 g Natriumchlorid ad 1 l d H ₂ O autoklaviert
NGM _k -Agar	3 g Natriumchlorid 2,5 g Bacto Pepton 20 g Bacto Agar ad 975 ml dH ₂ O autoklaviert nach dem Abkühlen (< 60 °C) zugegeben 1 ml Lösung A 0,5 ml Lösung B 1 ml Lösung C 25 ml Lösung D ad 1 l dH ₂ O

Medium	Bestandteile
NGM _K -Medium	3 g Natriumchlorid 2,5 g Bacto Pepton <i>ad</i> 975 ml dH ₂ O autoklaviert nach dem Abkühlen zugegeben 1 ml Lösung A 0,5 ml Lösung B 1 ml Lösung C 25 ml Lösung D <i>ad</i> 1 l dH ₂ O

3.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 6: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Bezeichnung und Hersteller.

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Mettler AE 240	Mettler Instrumente, CH
Autoklav	Varioclav Dampfsterilisator Typ 500 EV-Z	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, DE
Drigalskispatel	Petrischalenspatel Drigalski Glas	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Handschuhe Nitril	Nitra-Tex	Ansell, BE
Impföse	Impföse Spezial-Edelstahl, Ösen-Ø 5 mm	WLD-TEC, Arenshausen, DE
Impfösenhalter		WLD-TEC, Arenshausen, DE
Inkubator 37 °C	BB 16	Heraus Instruments, Hanau, DE
Kühlschrank		Kyrosafe, Hans-S. Schröder, Hamburg, DE
Stereomikroskop	Stemi 2000-C KL 300 LED	Carl Zeiss, Göttingen, DE Schott, Mainz, DE

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Pasteurpipetten		Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Peleusball	ROTILABO® Universalmodell	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Petrischalen	94x16 mm 40x10 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE TPP, Trasadingen, CH
Pipetten	2,5–1.000 µl	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1.000 µl	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Platindraht	≥99,9 %, Ø 0,3 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Präzisionswaage	PLJ 3000-2CM	Kern, Balingen, DE
Reinstwasser-Anlage		Werner Barnstead
Reaktionsgefäß	2 ml	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Schüttelinkubator	Innova 4230	New Brunswick Scientific, US
Sicherheitswerkbank	HERAsafe HS 12/2	Heraeus Instruments, Hanau, DE
Spektralphotometer	DU 730 Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckman Coulter, US
Sterilfilter	Millex GP 0,22 µm	Merck Millipore, IE
Thermoschrank 20 °C	9020-0397	Binder, Tuttlingen, DE
Vortex-Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, US
Wurmpicker		eigene Herstellung
Zentrifugen	Megafuge 1.0R Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Osterode, DE
Zentrifugenröhrchen	15ml PP 17x120mm, konisch, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

3.2 Methoden

Im Folgenden werden alle zugrundeliegenden Methoden aufgeführt und beschrieben, die zur Untersuchung der Wirkungen der verschiedenen Arzneimittelwirkstoffe und Störgrößen angewendet wurden. Alle Verfahren orientieren sich an den etablierten Methoden von Stiernagle (2006). Erforderliche Anpassungen wurden aufgrund der Laborexpertise am Institut für Umwelttoxikologie und Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Professur für Biofunktionalität sekundärer Pflanzenstoffe unter Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wim Wätjen, der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg oder für die der Experimente zugrundeliegenden Fragestellungen vorgenommen. Alle Arbeitsschritte wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, um einer Kontamination der verwendeten Materialien vorzubeugen. Des Weiteren diente Parafilm stets als Verdunstungsschutz. Um sicherzustellen, dass keine Zufallsbefunde festgestellt und diese als allgemein gültig betrachtet wurden, wurden alle Experimente dreimal repliziert.

3.2.1 Kultivierung, Aufkonzentrierung und Konzentrationsbestimmung von *Escherichia coli* OP50

Für die Kultivierung von *E. coli* OP50 wurde eine Einzelkolonie eines Bakterienausstriches, von der LB-Agarplatte mit einer 10 µl Pipettenspitze in einen mit 200 ml LB-Medium vorbereiteten Erlenmeyerkolben überführt. Zur Vorkonditionierung des Bakterienstammes mit den verwendeten Substanzen wurde das LB-Medium zu Beginn der Kultivierung lediglich mit der gewünschten Substanzkonzentration eingestellt. Daraufhin inkubierte die Bakteriensuspension im Schüttelinkubator bei 200 U/min und 37 °C für maximal 18 h. Nach Entnahme aus dem Schüttelinkubator wurde die Bakteriensuspension aufkonzentriert, fraktioniert, auf Kontamination geprüft und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die Suspension wurde nach der Inkubation für die Aufkonzentrierung bei 40.000 U/min für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf ca. 10 ml verworfen. Nachfolgend wurden die Bakterienpellets mit dem zurückgehaltenen Überstand resuspendiert und auf 2 ml Reaktionsgefäße fraktioniert. Bei den konditionierten Proben wurden die Bakterienpellets nach Verwerfen des Überstandes mit 190 ml LB-Medium resuspendiert und erneut bei 40.000 U/min für 15 min zentrifugiert, um Substanzrückstände aus dem Überstand zu entfernen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurden die Bakterienpellets wie oben beschrieben fraktioniert.

Die Konzentrationsbestimmung der Bakteriensuspension beruht auf der Lichtstreuung der Lösung. Diese kann mithilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 600 nm als Extinktion bzw. optische Dichte (OD_{600}) ermittelt werden (Beal *et al.*, 2020).

Hierzu wurde das Bakterienkonzentrat zweimal in einer 1:200 Verdünnung mit LB-Medium verdünnt. Das Gesamtvolumen der Verdünnung betrug 1 ml, welches nach Vermischen in eine Küvette überführt und anschließend im Spektralphotometer gemessen wurde. Der Leerwert ergab sich aus der OD₆₀₀-Messung von LB-Medium. Die Extinktion der Bakterienverdünnung sollte zwischen 0,1 und 0,8 liegen, ansonsten ist eine andere Verdünnung zu wählen. Für die toxikologischen Untersuchungen wurde eine Bakterienkonzentration von 10⁹ KBE/ml im Medium benötigt. Diese Konzentration konnte rechnerisch ermittelt werden.

Vor Anwendung der hergestellten Bakteriensuspensionen wurde ein Kontaminationsausstrich mittels Dreiösenausstrich auf einer LB-Agarplatte vorgenommen. Anschließend wurde der Ausstrich bei 37 °C für mindestens 12 h inkubiert. Sofern kontaminationsfreie Einzelkolonien gebildet wurden, konnten die Bakterien für die toxikologischen Untersuchungen verwendet werden.

3.2.2 Kultivierung von *Caenorhabditis elegans*

Die Kultivierung von *C. elegans* erfolgte auf dem festem Nährmedium NGM_K bei 20 °C im Thermoschrank. Hierzu wurden NGM_K-Agarplatten hergestellt, mit 80 µl Bakterien suspension beimpft und bei 37 °C für maximal 18 h inkubiert. *E. coli* Bakterien dienen den Fadenwürmern als Nahrungsquelle. Es mussten stets ausreichend Bakterien vorhanden sein, da Hunger oder Überpopulation Stress bei den Nematoden induziert und dies die Ergebnisse in den toxikologischen Untersuchungen verfälschen kann. Infolgedessen wurden ca. zehn gravide Adulte zweimal wöchentlich auf frisch beimpfte NGM_K-Agarplatten umgesetzt. Diese Vorgehensweise wurde zum Kulturerhalt der Population angewendet.

Weiterhin gibt es die Möglichkeit der Kultivierung von *C. elegans* im flüssigen Nährmedium NGM_K. Diese Methode wurde für die toxikologischen Untersuchungen herangezogen, da eine Belastung der Testsubstanzen im aquatischen Raum gegeben ist und dies das reale Expositionsszenario am besten widerspiegelt. Somit kann der Nematode die Testsubstanzen über das vorkonditionierte Futter, die topische Exposition und den Einstrom des Mediums in den Pharynx aufnehmen. Die Kultivierung im flüssigen Nährmedium NGM_K erfolgte, wie auch bei den NGM_K-Agarplatten, bei 20 °C im Thermoschrank. Hierzu wurde eine Bakterienkonzentration von 10⁹ KBE/ml im Medium eingestellt.

3.2.3 Synchronisation von *Caenorhabditis elegans*

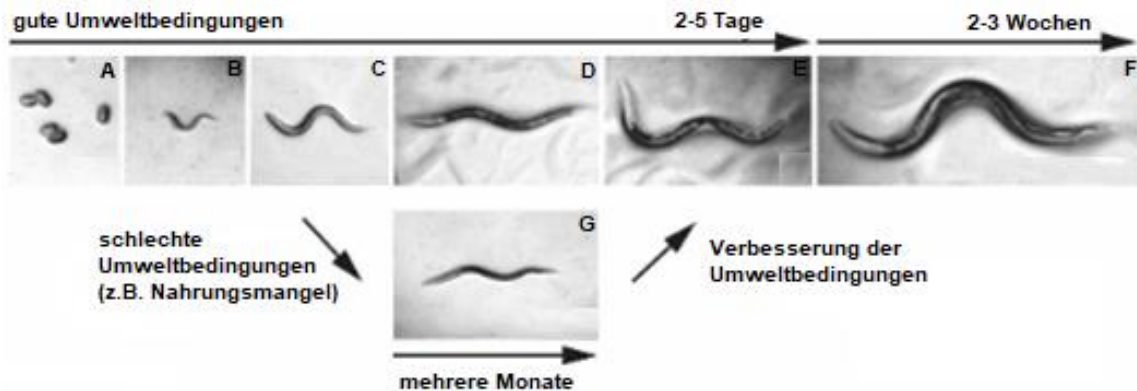


Abb. 2: Entwicklungsstadien von *C. elegans* (modifiziert nach Fielenbach und Antebi (2008)).

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Entwicklungsstadien der Nematode *C. elegans* von den Embryonen (A) über die Larvenstadien L1 (B), L2 (C) und L3 (D) bis hin zum L4-Stadium (E), die unter guten Umweltbedingungen bei 15-25 °C durchlaufen werden. Bei schlechten Umweltbedingungen können die Larven in ein sog. Dauerstadium (G) übergehen und so mehrere Monate überleben. Bei einer Verbesserung der Umweltbedingungen können sich die Dauerstadien ins L4-Stadium weiterentwickeln. Die L4-Larven werden abschließend zu adulten Nematoden (F), die eine Lebenszeit von zwei bis drei Wochen besitzen.

Die Grundlage für die toxikologischen Untersuchungen bildeten alterssynchronisierte Nematoden, die durch Bleichesynchronisation gewonnen wurden. Dabei wurden sämtliche Larvenstadien und adulte Würmer durch die Inkubation mit einer hergestellten Bleichlösung abgetötet und aufgelöst, sodass nur die durch ihre dicke Eischale geschützten Embryonen überleben. Das Alter der Eier variierte nur gering, weshalb die sich daraus entwickelnden Larven in etwa dasselbe Alter aufwiesen. Eine hohe Ausbeute bei der Synchronisation wurde erzielt, wenn ca. drei bis vier Tage alte *C. elegans* NGM_K-Agarplatten genutzt wurden, da zu diesem Zeitpunkt viele jungadulte Tiere, die viele Eier in sich tragen, vorhanden sind. Die Würmer wurden mittels 2,5 ml NGM_K von der NGM_K-Agarplatte durch mehrmaliges Pipettieren gelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach ca. zwei Minuten hatten sich die Nematoden und Eier am Boden abgesetzt und der Überstand wurde bis auf 500 µl verworfen. Anschließend erfolgte die Auflösung der Somata durch Zugabe von 500 µl Bleichlösung. Die Suspension wurde mit dem Vortexer gemischt, für 90 s inkubiert, um daraufhin für eine Minute bei 7.000 U/min zentrifugiert zu werden. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes auf 500 µl, wurde das Reaktion mit NGM_K auf 2 ml ergänzt, das Pellet darin resuspendiert und erneut für eine Minute zentrifugiert. Dieser Vorgang diente der Entfernung der Bleichlösung und schloss sich insgesamt dreimal an. Abschließend wurde das Pellet, bestehend aus Eiern und Bruchstücken von adulten Würmern, im Überstand von 500 µl resuspendiert und gleichmäßig auf neue mit *E. coli* beimpfte NGM_K-Agarplatten ausgebracht. Die Kultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 20 °C für etwa 42 h, bis die aus den Eiern geschlüpften Nematoden zu L4-Larven herangewachsen waren (Abb. 2).

3.2.4 Substanzkonzentrationen in den verschiedenen Expositionsgruppen

In den zugrundeliegenden Experimenten wurden unterschiedliche Kombinationen der im flüssigen NGM_k und Kultivierungsmedium von *E. coli* eingesetzten Konzentrationen an Wirkstoffen, Störgrößen (NH₄ und NO₃) und mit UV-C behandelte Wirkstofflösungen verwendet. Die Konzentration der Stammlösungen der beiden Arzneimittelwirkstoffe wurde anhand derer maximalen Löslichkeit in Wasser (siehe Tab. 3) festgelegt, die Konzentrationen von NH₄ und NO₃ anhand der gesetzlichen Grenzwerte für NH₄-N und NO₃-N in Abwasserbehandlungsanlagen der GK 5. Die GK 5 einer Abwasserbehandlungsanlagen entspricht laut Anhang 1 Absatz 1 AbwV einer Größe mit einem biochemischen Sauerstoffbedarf nach 5 Tagen von mehr als 6.000 kg/d (roh) bzw. einem Abwasserzulauf von >100.000 Einwohnern.

Demnach wurden die Konzentrationen für die Exposition mit Ibuprofen und Naproxen im LB-Medium bzw. NGM_k gleichermaßen auf 25 µM, 10 µM, 2,5 µM und 0 µM festgelegt, damit die Wirkstoffe miteinander verglichen werden konnten. Für die Darstellung der biologischen Wirksamkeit von Ibuprofen und Naproxen wurden neben den Nematoden auch die Bakterien im LB-Medium mit 25 µM, 10 µM, 2,5 µM und 0 µM der Wirkstoffe kultiviert, sodass sich daraus 16 verschiedene Expositionsgruppen je Wirkstoff ergaben. Für die Behandlung der Wirkstofflösungen mit UV-C Strahlung und UV-C Strahlung unter Sauerstoffeintrag wurden die gleichen Konzentrationen für die Stammlösungen von je 50 µM Wirkstoff verwendet. Nach Behandlung der Stammlösungen wurden die Konzentrationen für die Exposition gemäß der Verdünnung der normalen Wirkstofflösung (25 µM, 10 µM, 2,5 µM und 0 µM) eingestellt. Auf eine Vorkonditionierung der Bakterien mit behandelten Wirkstofflösungen wurde verzichtet und eine Kontrollgruppe, ohne Wirkstoff, wurde mitgeführt. Aufgrund der zwei untersuchten Wirkstoffe ergaben sich sieben verschiedene Expositionsgruppen je angewendeter Behandlungsform.

Die Bestimmung der zu untersuchenden Konzentrationen für die Störgrößen Ammonium und Nitrat gingen auf eine Analyse einer Ablaufwasserprobe Probennummer 3424/20 der HWS vom 04.08.2020 und die in der HWS gesammelten Erfahrungswerte zurück. Hier zeigten sich die beiden Substanzen als größte Problemstoffe bei der Elimination aus dem Abwasser. Des Weiteren erreichen Ammonium und Nitrat aufgrund ihrer hohen Eintragsmengen ins Abwasser, durch menschliche Körperausscheidungen, am ehesten die gesetzlichen Grenzwerte und überschritten diese auch in seltenen Fällen (UBA, 2011, UBA 2022). Daher wurde als niedrigste Konzentrationen der jeweilige gesetzliche Grenzwert (GW) und eine 15-fache bzw. 30-fache Überschreitung des Grenzwertes (GWx15 bzw. GWx30) als weitere Konzentrationen festgelegt. Für die Testsubstanz Ammonium ergaben sich folglich die Konzentrationen von

0,715 mM NH₄ (GW), 10,725 mM NH₄ (GWx15) und 21,45 mM NH₄ (GWx30) und 1,43 mM NO₃ (GW), 21,45 mM NO₃ (GWx15) und 42,9 mM NO₃ (GWx30) für Nitrat im NGM_k. Eine Kontrollgruppe, ohne den Zusatz einer Substanz, wurde mitgeführt und auf eine Vorkonditionierung der Bakterien mit den untersuchten Störgrößen wurde ebenfalls verzichtet. Hieraus resultierten sieben Expositionsgruppen für die beiden Störgrößen.

3.2.5 Abbau der Arzneimittelrückstände mittels UV-C Strahlung mit und ohne Sauerstoffzufuhr



Abb. 3: UV-C Bestrahlungssystem (GMBU e.V.).

Die Abbildung zeigt, dass von der GMBU e.V. entwickelte UV-C Bestrahlungssystem bestehend aus einem zylindrischen Reaktor und einen darin einführbaren UV-C Strahler. Das System diente der Elimination von Arzneimittelrückständen in wässrigen Lösungen.

Die Untersuchungen zum Abbau von Ibuprofen und Naproxen in wässriger Lösung durch UV-C Strahlung wurden von der GMBU e.V. durchgeführt. In Abb. 3 ist das UV-C Bestrahlungssystem dargestellt, welches zur Anwendung kam. Die Laborversuchsanlage besteht aus einem zylindrischen Reaktorgefäß, in dessen Inneren ein UV-C Strahler eingeführt werden kann. Verbaut wurde ein Mitteldruckstrahler mit einer maximalen Leistung von 400 W, dessen Spektrum sich durch eine höhere Bandbreite und höherer Energiedichte im Vergleich zu einem Niederdruckstrahler auszeichnet. Zwar benötigen Mitteldruckstrahler für ihren Betrieb eine hohe elektrische Leistung, sie können jedoch stufenlos geregelt werden, sodass eine energieeffiziente Regulierung möglich ist. Der Reaktor bietet mehrere Anschlüsse zur Einleitung der zu behandelnden Wässer, als auch zur eventuellen Zugabe weiterer Hilfsmittel, wie Oxidationsmittel oder zur Installation erforderlicher Messtechniken. Das behandelte Wasser wird entweder

durch einen Auslass am Reaktorboden oder seitlich im unteren Bereich ausgeleitet. Innerhalb des Reaktors können relevante Parameter, wie Bestrahlungsdauer, -leistung, Wassertemperatur und die Einleitung von Gasen gesteuert werden, die verschiedene Expositionsszenarien ermöglichen. Für die Untersuchungen zur Stabilität der Arzneimittelwirkstoffe während der UV-C Behandlung wurden ca. 1 mg/l der Ausgangssubstanz für bis zu 10 min bei unterschiedlichen Bestrahlungsstärken von 23,7 W/m² bis 250 W/m², sowie mit und ohne Sauerstoffzufuhr bestrahlt. Der Abbau wurde über die Konzentrationsbestimmung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie minütlich ermittelt. Die Rohdaten wurden dem Institut für Umwelttoxikologie von der GMBU e.V. zur Verfügung gestellt. Aus den Ergebnissen zum Abbau der Arzneimittel und der Gebrauchstauglichkeit in Kläranlagen zeigten sich die verschiedenen Behandlungen für den Einsatz von UV-C ohne und mit Sauerstoffzufuhr.

Die mittels UV-C Strahlung behandelten Proben, welche für die toxikologischen Untersuchungen genutzt wurden, sind im Institut der GMBU e.V. je an Tag 0 des Experiments hergestellt worden. Nach UV-C Bestrahlung wurden die behandelten Lösungen lichtgeschützt bei Raumtemperatur vom Labor der GMBU e.V. zum Institut für Umwelttoxikologie transportiert und standen ca. eine Stunde nach Behandlung den Experimenten zur Verfügung. Im Institut für Umwelttoxikologie wurden die behandelten Lösungen über den gesamten Beobachtungszeitraum lichtgeschützt bei einer Temperatur von 20 °C gelagert.

3.2.6 Akuter Toxizitätstest

In Folge eines Vorversuches wurde die bisherige Versuchsdurchführung zur Untersuchung der akuten Toxizität angepasst, wodurch die Nematoden nicht in den zu verwendenden 96er-Well-Platten, sondern in 40x10 mm Petrischalen exponiert wurden.

Zur Untersuchung der akuten Toxizität wurden je Expositionsgruppe zehn alters-synchrone L4-Larven in eine vorbereitete Petrischale überführt und für 48 h bei 20 °C inkubiert. Die einzelnen Petrischalen bereitet man zuvor mit NGM_K, der entsprechenden Testsubstanz- und *E. coli*-Konzentration vor. Nach jeweils 24 und 48 h erfolgte die Überprüfung des Vitalitätsstatus der Nematoden mit Hilfe des selbst hergestellten Wurmpickers, nach der „*Touch-provoked-movement*“ (TPM)-Methode. Hierzu wurden die Würmer in die drei Kategorien tot, lebend oder zensiert eingestuft. Als zensierte Würmer zählen Nematoden, bei denen die Nachkommenschaft in den Gonaden schlüpfen, die Organe herausgetreten oder die nicht auffindbar sind und alle untrennbar zusammenhängenden Würmer. Die Gruppe der lebenden Würmer beschreibt alle sich eigenständig oder nach Berührung fortbewegenden Würmer, einschließlich derer deren

Kopf, Schwanz oder Pharynx sich lediglich bewegt. Alle regungslosen Nematoden werden als tot klassifiziert.

Nach 24 h wurden alle zensierten und toten Würmer aus dem Testmedium entfernt.

3.2.7 Lebensspannentest

Die Ermittlung der chronischen Toxizität erfolgte über die Analyse der Lebensspanne. Hierzu wurden je Expositionsgruppe zehn alterssynchrone L4-Larven bei 20 °C in mit NGM_k, der entsprechenden Testsubstanz- und *E. coli*-Konzentration vorbereitete Petrischalen überführt und inkubiert. Der Expositionsbeginn startet mit Tag 0. Der Vitalitätsstatus wurde täglich mittels TPM-Methode erfasst und die Würmer wurden, wie unter 3.2.6 Akuter Toxizitätstest beschrieben, kategorisiert. Die als lebend bewerteten Nematoden wurden während ihrer Reproduktionsphase (die ersten 14 Tage) täglich in frisches Testmedium überführt, um eine Vermischung und Verwechslung der Generationen zu vermeiden. Anschließend genügte ein Umsetzen an jedem zweiten Tag, um eine kontinuierliche Konzentration der Testsubstanz und *E. coli* zu gewährleisten.

3.2.8 Lokomotionstest

Tab. 7: Kategorisierung von *C. elegans* zur Beurteilung der Motilität.

Kategorie	Beurteilung der Motilität
A	Der Nematode bewegt sich eigenständig.
B	Der gesamte Körper der Nematode bewegt sich nach TPM-Methode.
C	Es bewegt sich Kopf, Schwanz oder Pharynx der Nematode nach TPM-Methode.
D	Der Nematode ist tot und bewegt sich nicht.
zensiert	Durch internen Schlupf, heraushängende Organe, dem untrennbaren Zusammenhängen oder Nichtauffinden der Nematoden kann die Motilität nicht bestimmt werden.

Für die Bewertung der chronischen Toxizität lässt sich ein weiterer Test anwenden, der die Motilität von *C. elegans* beurteilt. Diese Untersuchung lässt sich in die Analyse zur Lebensspanne integrieren, sodass die Versuchsdurchführung dem Kapitel 3.2.7 Lebensspannentest zu entnehmen ist. Nach dreimaligen vorsichtigen Schwenken der Petrischale mit den zu untersuchenden Nematoden, wurden die Würmer aufgrund ihrer

Motilität und Pumpbewegung ihres Pharynx kategorisiert und von den toten sowie zensierten Würmern unterschieden, wie in Tab. 7 dargestellt.

In die Kategorie A waren alle Nematoden einzuordnen, die sich ohne externes Zutun bewegten. Hiervon abzugrenzen sind alle Würmer die sich erst nach TPM-Methode bewegten. Bewegte sich nach Berührung des Wurms der gesamte Körper wurde er in Kategorie B, bei einer Bewegung von lediglich dem Kopf, Schwanz oder der Pumpbewegung des Pharynx in Kategorie C eingeordnet. Die Eingruppierung der zensierten und toten Nematoden erfolgte gemäß der Beschreibung im Kapitel 3.2.6 Akuter Toxizitätstest. Die Gruppe der toten Würmer wurden als Kategorie D bezeichnet. Als Untersuchungszeitpunkte für die Erhebung der Motilität von *C. elegans* wurden der 4., 7., 14. und 21.Tag nach Inkubationsstart festgelegt.

3.2.9 Nachkommenschaftstest

Zur Untersuchung der Reproduktionstoxizität der verwendeten Substanzen wurde die Anzahl der Nachkommen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden je Expositionsgruppe zehn alterssynchrone L4-Larven bei 20 °C inkubiert. Durch tägliches Umsetzen der zehn Nematoden in neues Testmedium, konnten die abgelegten Eier in den Petrischalen für weitere 24 h bei 20 °C inkubiert werden, bis sich aus den Embryonen zum Auszählen ausreichend große Larven entwickelt hatten. Die Nachkommen wurden mit Hilfe einer ausgezogenen Glaspipette und Peleusball aufgesaugt und gezählt. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über die gesamte reproduktive Phase der zehn alterssynchrone L4-Larven, der bei ca. zehn Tagen lag. Außerdem musste die Gesamtanzahl der lebenden adulten Würmer täglich notiert werden, um abschließend die durchschnittliche Gesamtanzahl an Nachkommen pro adulter Nematode und die durchschnittliche Anzahl an Nachkommen pro adulter Nematode an den verschiedenen Beobachtungstagen zu berechnen.

3.2.10 Auswertung und Statistik

Im Jahr 2021 wurde vom Institut für Umwelttoxikologie bei dem Dienstleister IQVIA Commercial GmbH & Co. eine Sonderstudie für ausgewählte Analgetika in Auftrag gegeben und ausgewertet, da für die untersuchten Arzneimittelwirkstoffe keine Gesamtstoffbilanzen verfügbar waren (IQVIA, 2021).

Die Erfassung und Aufbereitung der Daten erfolgten in Tabellen mit MS Office Excel 2007. Für die grafische Darstellung und statistische Analyse der erhobenen Daten wurde die Statistiksoftware GraphPad Prism 9 verwendet.

Die 16 Expositionsgruppen zur biologischen Wirksamkeit je Wirkstoff, die Untersuchungen der zwei verschiedenen Behandlungsformen sowie zu den Störgrößen wurden jeweils parallel geführt, sodass die Ergebnisse innerhalb der Untersuchungseinheiten miteinander verglichen werden können. In der graphischen Darstellung der Daten wurde sich jedoch aufgrund der Vielzahl der erhobenen Daten auf die Darstellung der Ergebnisse mit identisch vorkonditionierten *E. coli* und den einzelnen Substanzen beschränkt. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden anlässlich des explorativen Studiendesigns vor allem erkennbare Muster dargestellt und diskutiert. Lediglich bei der Beschreibung der akuten Toxizität wurde die Darstellung der zensierten Individuen als eigene Kategorie angewendet, um mögliche akute Effekte zu erfassen. Für die Auswertung aller anderen Methoden wurde die Gruppe der zensierten Würmer aus den Daten zensiert.

Im Rahmen einer statistischen Beratung wurde am Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durch Herrn apl. Prof. Dr. Andreas Wienke die statistische Auswertung der Ergebnisse abgestimmt. Um die aktuellen wissenschaftlichen Ansichten zur Interpretation von Ergebnissen zu berücksichtigen, wurde bei der Auswertung der zugrundeliegenden Daten bewusst auf die Verwendung des Begriffes „signifikant“ verzichtet (Amrhein *et al.*, 2019; Wasserstein *et al.*, 2019).

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur akuten Toxizität

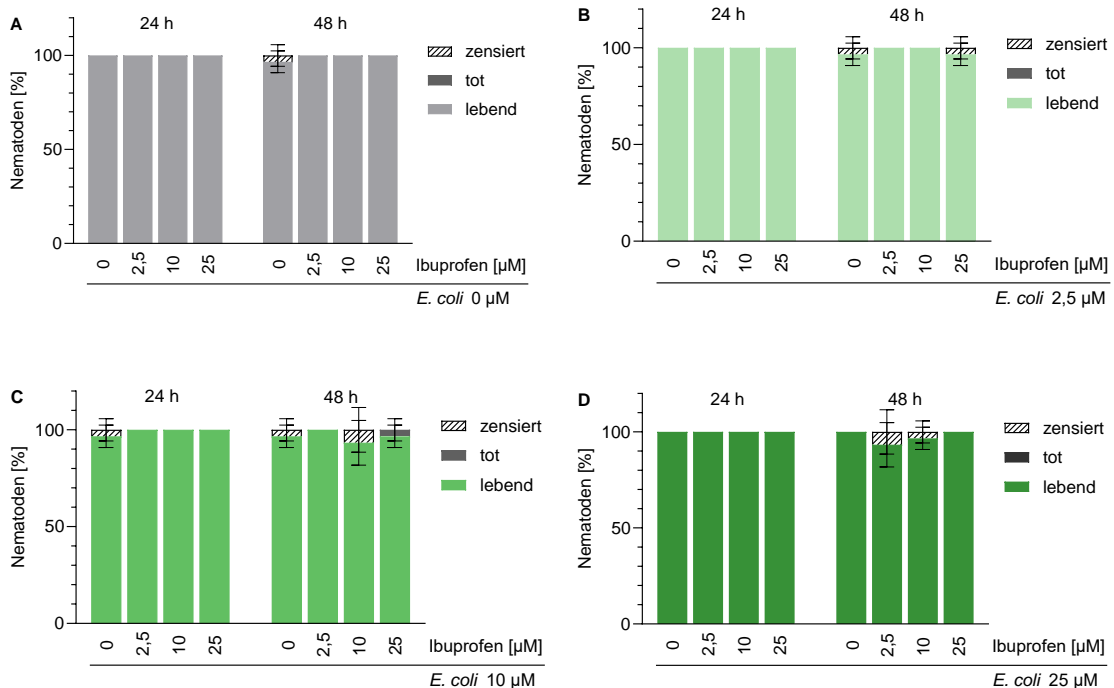


Abb. 4: Akut toxische Effekte von Ibuprofen in NGM_K ohne vorkonditionierte *E. coli* 0 µM (A) und mit vorkonditionierten *E. coli* 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Ibuprofen auf *C. elegans* nach 24 und 48 h.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 µM; 2,5 µM; 10 µM; 25 µM) an Ibuprofen in NGM_K und *E. coli* für 48 h bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden als tot, lebend oder zensiert kategorisiert. Gezeigt sind die gemittelten prozentualen Anteile [%] mit Standardabweichung (SD) (N=3, n=10).

Bei den Untersuchungen zur akuten Toxizität von Ibuprofen lebten nach 24 h Inkubation alle Nematoden in den verschiedenen Expositionsgruppen (Abb. 4 A-D). Nach 48 h starb lediglich in der Expositionsgruppe mit NGM_K 25 µM und *E. coli* 10 µM Ibuprofen ein Individuum. Ebenfalls wurden einige wenige Nematoden nach 48 h aufgrund von internem Schlupf als zensiert kategorisiert. Die zensierten Würmer in den Kontrollgruppen NGM_K 0 µM Ibuprofen (Abb. 4 B und C) gehen auf das Nichtauffinden der Nematoden zurück.

Innerhalb der Beobachtungszeit lassen sich keine akut toxischen Effekte von Ibuprofen in NGM_K mit oder ohne Vorkonditionierung von *E. coli* mit Ibuprofen erkennen.

Nach der Inkubation mit der mit 125 W/m² UV-C bestrahlten Ibuprofen-Lösung für 10 min (Abb. 5 A) starb bereits nach 24 h je ein Individuum in der Expositionsgruppe 2,5 µM und 25 µM Ibuprofen. Die unter Sauerstoffzufuhr behandelte Ibuprofen-Lösung (Abb. 5 B) führte nur in der höchsten Dosisgruppe zum Tod einer Nematode nach 48 h. Auffällig

war der erhöhte Anteil (ca. 14 %) an zensierten Nematoden in der Expositionsgruppe 10 μM Ibuprofen (Abb. 5 B).

Es zeigten sich keine akut toxischen Effekte von Ibuprofen in NGM_k , wenn die Substanz mit UV-C Strahlung (125 W/m^2) oder mit UV-C Strahlung ($48,4 \text{ W/m}^2$) unter Sauerstoffzufuhr behandelt wurde.

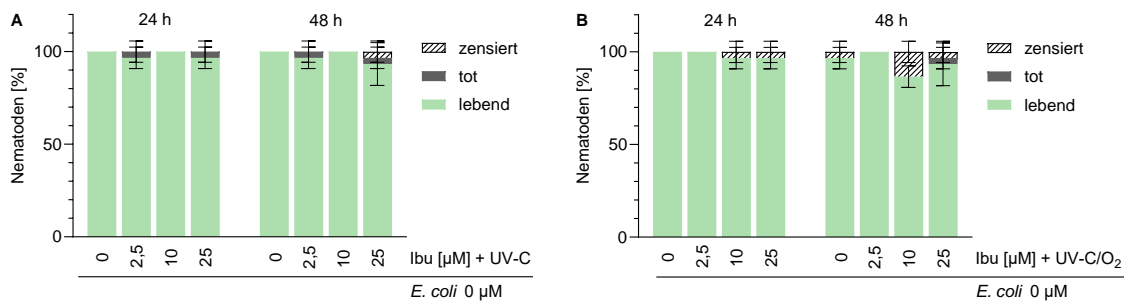


Abb. 5: Akut toxische Effekte von Ibuprofen in NGM_k nach zehnminütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m^2 (A) und bei $48,4 \text{ W/m}^2$ unter Sauerstoffzufuhr (B) auf *C. elegans* nach 24 und 48 h.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM ; 2,5 μM ; 10 μM ; 25 μM) behandelter Ibuprofen-Lösung für 48 h bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden als tot, lebend oder zensiert kategorisiert. Gezeigt sind die gemittelten prozentualen Anteile [%] mit SD (N=3, n=10).

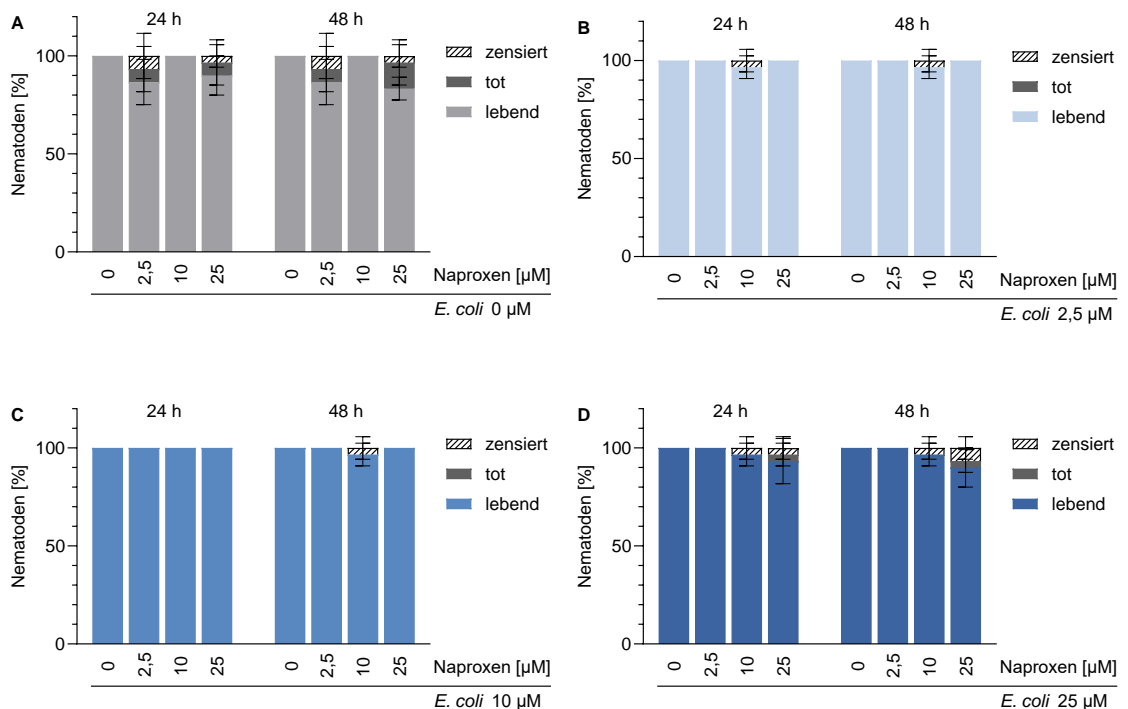


Abb. 6: Akut toxische Effekte von Naproxen in NGM_k ohne vorkonditionierte *E. coli* 0 μM (A) und mit vorkonditionierten *E. coli* 2,5 μM (B), 10 μM (C) und 25 μM (D) Naproxen auf *C. elegans* nach 24 und 48 h.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM ; 2,5 μM ; 10 μM ; 25 μM) an Naproxen in NGM_k und *E. coli* für 48 h bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden als tot, lebend oder zensiert kategorisiert. Gezeigt sind die gemittelten prozentualen Anteile [%] mit SD (N=3, n=10).

Bei den Untersuchungen zur akuten Toxizität von Naproxen starben nach 24 h Inkubation in den Dosisgruppen NGM_K 2,5 µM und 25 µM Naproxen ohne konditionierte *E. coli* (Abb. 6 A) je zwei Nematoden. Am zweiten Tag starben weitere zwei Individuen in der höchsten Konzentrationsgruppe. Demnach wurden dort nach 48 h ca. 14 % der Nematoden als tot bewertet. Des Weiteren zeigte nach 24 h ein Wurm in der Expositionsgruppe NGM_K 25 µM und *E. coli* 25 µM Naproxen (Abb. 6 D) keine Vitalfunktion, sodass dieser als tot kategorisiert wurde. Bei den beiden Gruppen mit vorkonditionierten *E. coli* 2,5 µM und 10 µM Naproxen konnte kein toter Fadenwurm beobachtet werden, jedoch zensierte Nematoden in der Konzentrationsgruppe NGM_K 10 µM Naproxen. Grund für die Kategorisierung war in allen Fällen das nicht Auffinden der Würmer. Innerhalb der Beobachtungszeit ließen sich keine eindeutig akut toxischen Effekte von Naproxen erkennen.

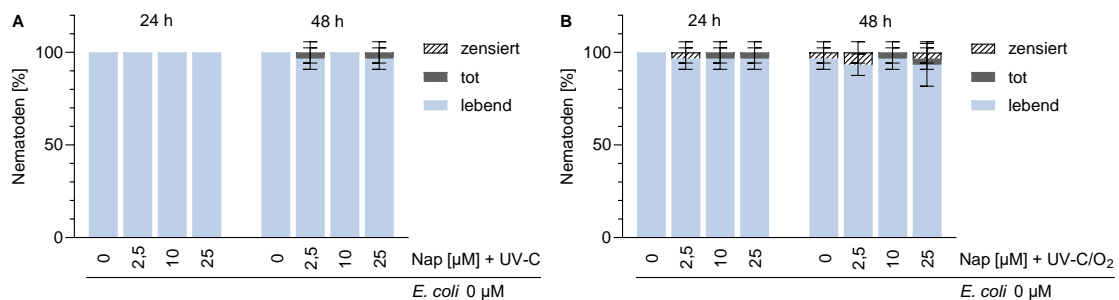


Abb. 7: Akut toxische Effekte von Naproxen in NGM_K nach zehnminütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m² (A) und bei 48,4 W/m² unter Sauerstoffzufuhr (B) auf *C. elegans* nach 24 und 48 h.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 µM; 2,5 µM; 10 µM; 25 µM) behandelter Naproxen-Lösung für 48 h bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden als tot, lebend oder zensiert kategorisiert. Gezeigt sind die gemittelten prozentualen Anteile [%] mit SD (N=3, n=10).

Nach der Exposition mit der UV-C (125 W/m², 10 min) behandelten Naproxen-Lösung (Abb. 7 A) starb je ein Wurm nach 48 h in den Konzentrationsgruppen 2,5 µM und 25 µM. Es wurden keine zensierten Nematoden festgestellt. Hingegen führten in der unter Sauerstoffzufuhr behandelten Naproxen-Lösung (Abb. 7 B) die Konzentrationen 10 µM und 25 µM bereits nach einem Tag zum Tod einer Nematode.

Zusammenfassend ließen sich nach der Exposition mit den unterschiedlich behandelten Naproxen-Lösungen sich keine akut toxischen Effekte beobachten.

Nach Inkubation von *C. elegans* mit Ammonium (Abb. 8 A) zeigten sich erst nach 48 h Effekte auf den Modellorganismus. In den Dosisgruppen NH₄ GWx15 (10,725 mM) und GWx30 (21,45 mM) starb je ein Nematode und in der Kontrollgruppe wurden ca. 14 % der Nematoden als zensiert kategorisiert. Grund für die Einteilung war ein vermehrtes Auftreten des internen Schlupfs im Testorganismus. Bei der Einwirkung von Nitrat

(Abb. 8 B) konnten bereits nach 24 h zwei tote Würmer in der Dosisgruppe NO₃ GWx15 (21,45 mM) sowie ein Wurm in NO₃ GWx30 (42,9 mM) beobachtet werden. Nach zwei Tagen starben 10 % der Nematoden in der Expositionsgruppe NO₃ GW (1,43 mM). Dies stellt die höchste beobachtete Anzahl an verstorbenen Nematoden nach 48 h dar. Weiterhin wiesen alle Gruppen zwischen ein (NO₃ GWx30) und drei (NO₃ GW) zensierte Nematoden nach zwei Tagen Inkubation auf. Grund für die Kategorisierung war in allen Fällen das nicht Auffinden der Würmer. Es konnten somit keine aussagekräftigen akut toxischen Effekte für die Störgrößen Ammonium und Nitrat in den untersuchten Dosisgruppen festgestellt werden.

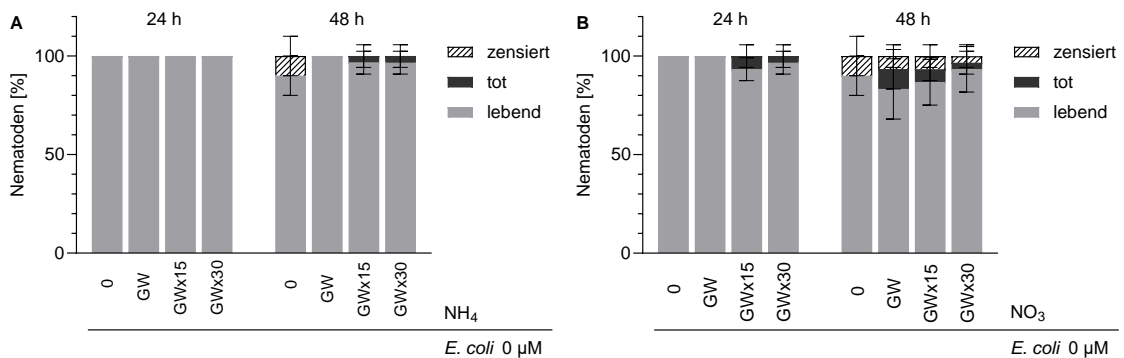


Abb. 8: Akut toxische Effekte von Ammonium (A) und Nitrat (B) in NGM_K auf *C. elegans* nach 24 und 48 h.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen an NH₄ oder NO₃ (Grenzwert (GW) - NH₄=0,715 mM, NO₃=1,43 mM, sowie den 15- und 30-fachen GW) für 48 h bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden als tot, lebend oder zensiert kategorisiert. Gezeigt sind die gemittelten prozentualen Anteile [%] mit SD (N=3, n=10).

4.2 Untersuchungen zur chronischen Toxizität

4.2.1 Analyse der Lebensspanne

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Untersuchung der verschiedenen Testsubstanzen auf die Überlebenszeit von *C. elegans* nach Kaplan-Meier dargestellt. Für die Auswertung und Bewertung der Kaplan-Meier-Kurven ist zu beachten, dass die Aussagekraft eines beobachteten Effektes mit abnehmender Anzahl lebender Nematoden ebenfalls abnimmt. Dies liegt darin begründet, dass durch jedes Ausscheiden (Tod oder Zensur) der relative Einfluss jedes nachfolgenden Ereignisses mehr ins Gewicht fällt und somit zu einem deutlich stärkeren Abfall der Überlebenskurve führt. Daher wurden für die Auswertung Parameter, wie die mediane Lebensspanne, das Verhältnis der medianen Lebensspanne der Expositionsgruppe zur Kontrollgruppe, das 95 % Konfidenzintervall dieses Verhältnisses und der p-Wert mittels Log-Rank-Test (MantelCox), bezogen auf die jeweilige Gruppenkontrolle, ermittelt.

Über alle Expositionsszenarien hinweg konnte festgestellt werden, dass eine Zensur der Nematoden vornehmlich in den ersten zwei Wochen beobachtet werden kann. Grund für eine Zensur in den ersten sieben Tagen war fast ausschließlich interner Schlupf im Testorganismus. Traten Zensuren in der zweiten Woche der Beobachtungszeit auf, so waren sie überwiegend auf das Austreten der Organe der Nematoden zurückzuführen. Nur einige wenige Fadenwürmer wurden zensiert, weil sie untrennbar Zusammenhängen oder nicht auffindbar waren. Die niedrigste beobachtete maximale Lebensspanne mit 22 Tagen konnte in der Expositionsgruppe *E. coli* 2,5 μM und NGM_K 25 μM Naproxen (Abb. 11 B) festgestellt werden. Die höchste maximale Lebensspanne wurde mit 42 Tagen in der Dosisgruppe *E. coli* 0 μM und NGM_K 2,5 μM Naproxen (Abb. 11 A) sowie in zwei Kontrollen *E. coli* 0 μM (Abb. 10 A, Abb. 11 A) beobachtet. Demnach lebten einzelne Individuen fast doppelt so lang wie andere.

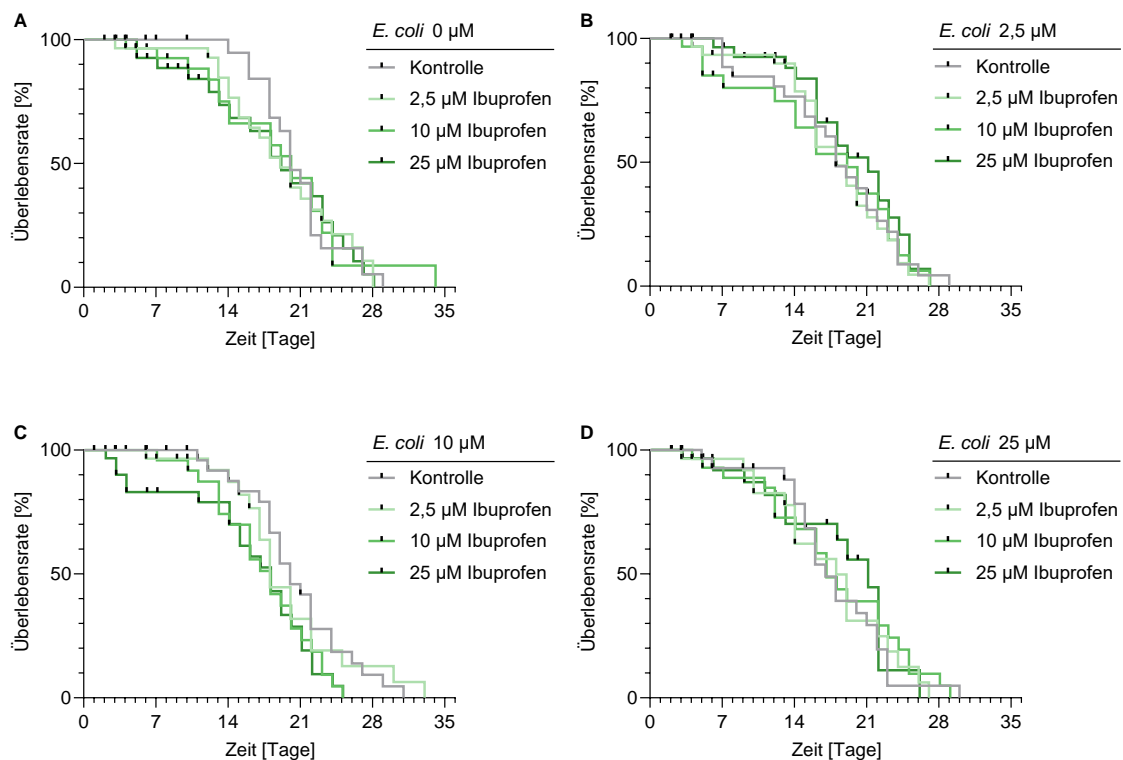


Abb. 9: Toxische Effekte von Ibuprofen in NGM_K ohne vorkonditionierte *E. coli* 0 μM (A) und mit vorkonditionierten *E. coli* 2,5 μM (B), 10 μM (C) und 25 μM (D) Ibuprofen auf die Lebensspanne von *C. elegans*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM ; 2,5 μM ; 10 μM ; 25 μM) an Ibuprofen in NGM_K und *E. coli* bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden als tot, lebend oder zensiert kategorisiert und mittels Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (N=3, n=10).

In Abb. 9 sind die Kaplan-Meier-Kurven mit unterschiedlicher Konzentration der Testsubstanz Ibuprofen dargestellt. In allen Expositionsgruppen lässt sich eine Plateauphase innerhalb der ersten 14 Tage feststellen, sodass sich die Überlebensraten nur um maximal 20 % nach zwei Wochen reduziert haben. Einzig bei der Kontrollgruppe *E. coli*

0 μM Ibuprofen (Abb. 9 A) beträgt die Überlebensrate nach zwei Wochen immer noch 100 %. Nach den ersten zwei Wochen fallen die Überlebensraten in den verschiedenen Expositionsgruppen kontinuierlich ab. Eine Ausnahme stellt jedoch die Dosisgruppe *E. coli* 25 μM und NGM_K 25 μM Ibuprofen (Abb. 9 D) dar, bei der ein starker Einbruch der Überlebensrate an Tag 22 von ca. 45 % auf ca. 10 % zu verzeichnen ist. Des Weiteren weist die Kurve der Expositionsgruppe *E. coli* 10 μM und NGM_K 25 μM Ibuprofen (Abb. 9 C) eine deutliche Abweichung zur Kontrollgruppe ($p=0,015$) auf. Nach dem Abfall der Überlebensrate innerhalb der ersten vier Tage auf 80 % verläuft die Überlebenskurve nahezu parallel zur Überlebenskurve der Kontrollgruppe. Die medianen Lebensspannen liegen mit 17 bis 21 Tagen (Tab. 8) relativ nah zusammen, sodass die höchste Differenz der medianen Lebensspanne von vier Tagen in der Dosisgruppe *E. coli* 25 μM Ibuprofen zwischen der Kontrollgruppe (17 Tage) und NGM_K 25 μM Ibuprofen (21 Tage) festzustellen ist. Die niedrigste mediane Lebensspanne liegt in der Expositionsgruppe *E. coli* 25 μM und NGM_K 10 μM Ibuprofen sowie der dazugehörigen Kontrolle vor. Die höchste mediane Lebensspanne weisen zwei Gruppen mit einer Konzentration von 25 μM Ibuprofen im NGM_K vor (Tab. 8).

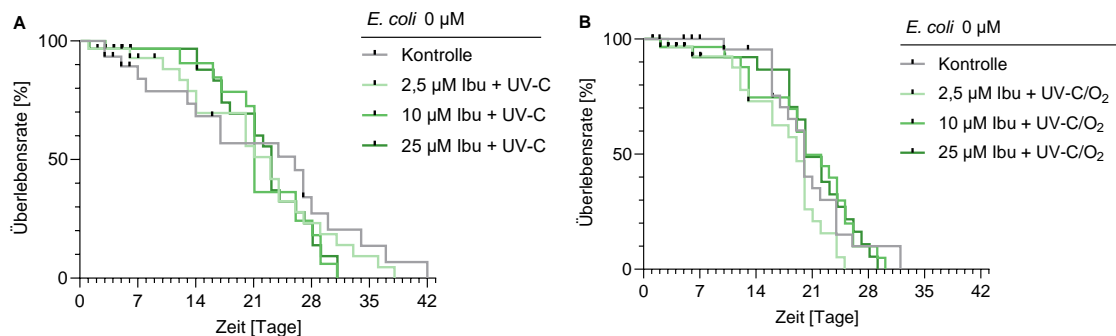


Abb. 10: Toxische Effekte von Ibuprofen in NGM_K nach zehnmütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m² (A) und bei 48,4 W/m² unter Sauerstoffzufuhr (B) auf die Lebensspanne von *C. elegans*. Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM ; 2,5 μM ; 10 μM ; 25 μM) an behandelter Ibuprofen-Lösung bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden als tot, lebend oder zensiert kategorisiert und mittels Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (N=3, n=10).

Die Überlebenskurven der Expositionsgruppen der Ibuprofen-Lösungen, welche mit UV-C Strahlung unterschiedlich behandelt wurden (Abb. 10 A, B), wiesen ebenfalls Plateauphasen innerhalb der ersten 14 Tage auf, sodass sich die Überlebensraten nur um maximal 20 % nach zwei Wochen reduziert haben. Bei den Expositionsgruppen unter 125 W/m² UV-C (Abb. 10 A) besitzt die Kontrollgruppe bis Tag 21 die niedrigste Überlebensrate. Allerdings überleben einige Nematoden bis zu sechs Wochen in dieser Gruppe. Dies führt zu einer medianen Lebensspanne von rund 26 Tagen für die Kontrollgruppe (Tab. 9), wohingegen die medianen Lebensspannen der anderen Dosisgruppe

drei bis fünf Tage geringer sind. In den Expositionsgruppen mit 48,4 W/m² UV-C unter Sauerstoffzufuhr (Abb. 10 B) sind keine Auffälligkeiten zu beobachten. Die Überlebenskurven verlaufen nahezu identisch, mit medianen Lebensspannen von 19 und 20 Tagen (Tab. 9) und einer maximalen beobachteten Lebensspanne von 32 Tagen in der Kontrollgruppe.

Tab. 8: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Ibuprofen in NGM_k ohne und mit vorkonditionierten *E. coli*.

Ibuprofen [µM] Konditionierung <i>E. coli</i>	Ibuprofen [µM] in NGM _k	mediane Lebens- spanne [Tage]	Verhältnis mediane Lebensspanne zur Kontrolle	95% Konfidenz- intervall des Verhältnisses	p-Wert Log- Rank-Test (Mantel-Cox)
0	0	20	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	20	1,00	0,54-1,84	0,985
	10	20	1,00	0,54-1,84	0,795
	25	19	0,95	0,51-1,78	0,963
2,5	0	19	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	18	0,95	0,54-1,65	0,490
	10	19	1,00	0,55-1,82	0,486
	25	21	1,11	0,61-2,01	0,796
10	0	20	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	18	0,90	0,48-1,69	0,802
	10	18	0,90	0,50-1,60	0,135
	25	18	0,90	0,50-1,60	0,015
25	0	17	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	18	1,06	0,56-1,99	0,982
	10	17	1,00	0,55-1,82	0,804
	25	21	1,24	0,62-2,47	0,711

Tab. 9: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Ibuprofen in NGM_k nach unterschiedlichen UV-C Behandlungen.

Behandlung mit UV-C Strahlung	Ibuprofen [μM] in NGM _k	mediane Lebensspanne [Tage]	Verhältnis mediane Lebensspanne zur Kontrolle	95% Konfidenzintervall des Verhältnisses	p-Wert Log-Rank-Test (Mantel-Cox)
bei 125 W/m ² für 10 min	0	26	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	23	0,88	0,47-1,65	0,515
	10	21	0,81	0,42-1,57	0,429
	25	23	0,88	0,47-1,65	0,332
bei 48,4 W/m ² für 10 min unter Sauerstoffzufuhr	0	20	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	19	0,95	0,51-1,77	0,090
	10	20	1	0,54-1,85	0,877
	25	20	1	0,53-1,87	0,943

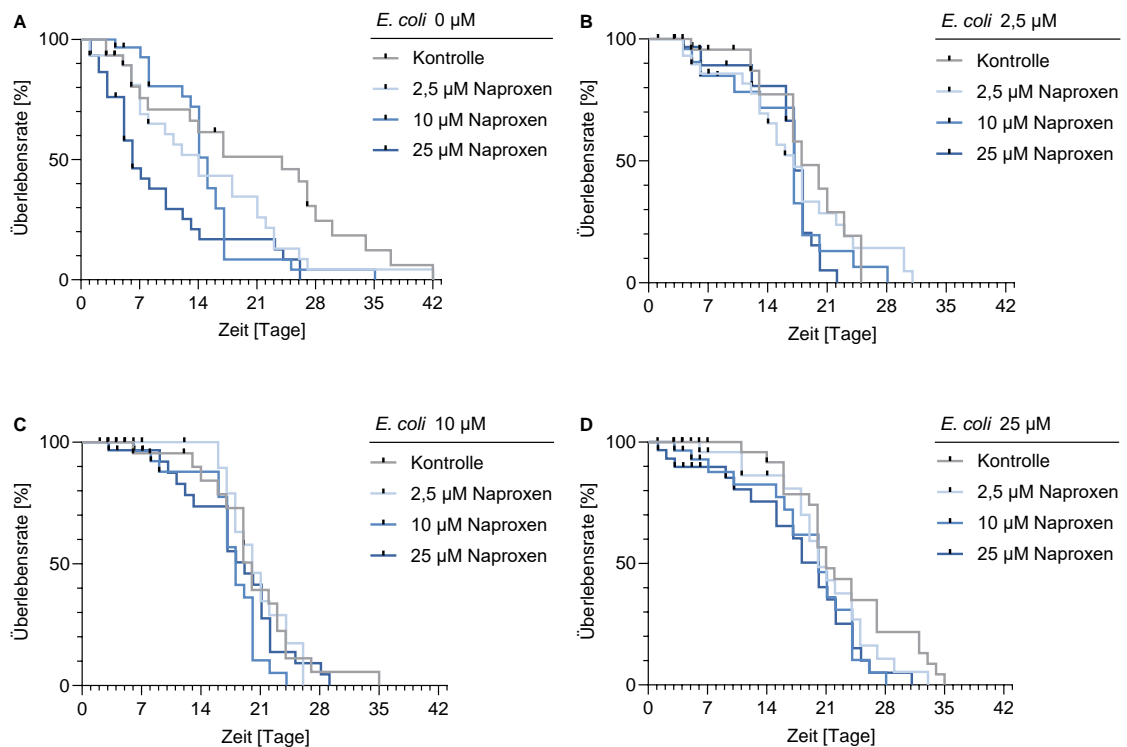


Abb. 11: Toxische Effekte von Naproxen in NGM_k ohne vorkonditionierte *E. coli* 0 μM (A) und mit vorkonditionierten *E. coli* 2,5 μM (B), 10 μM (C) und 25 μM (D) Naproxen auf die Lebensspanne von *C. elegans*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM ; 2,5 μM ; 10 μM ; 25 μM) an Naproxen in NGM_k und *E. coli* bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden als tot, lebend oder zensiert kategorisiert und mittels Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (N=3, n=10).

Im Vergleich zum Wirkstoff Ibuprofen konnten beim untersuchten Wirkstoff Naproxen, trotz gleicher Wirkstoffkonzentrationen, deutlich mehr Effekte beobachtet werden. In

allen Expositionsgruppen bei denen vorkonditionierte *E. coli* verwendet wurden (Abb. 11 B-D), lassen sich Plateauphasen von sieben bis hin zu 14 Tagen innerhalb der ersten zwei Wochen feststellen. Insgesamt zeigte sich eine Reduktion der Überlebensrate in einzelnen Dosisgruppen (*E. coli* 2,5 μM und NGM_K 2,5 μM ; *E. coli* 10 μM bzw. 25 μM und NGM_K 25 μM) um maximal 30 % nach den ersten beiden Wochen Beobachtungszeit. Die medianen Lebensspannen innerhalb der einzelnen Expositionsgruppen *E. coli* 2,5 μM , 10 μM und 25 μM Naproxen wichen nur ein bis zwei Tage von der jeweiligen Kontrollgruppe ab (Tab. 10). Nach den ersten beiden Wochen reduziert sich die Überlebensrate dieser Expositionsgruppen kontinuierlich nahezu simultan (Abb. 11 B-D).

In den Dosisgruppen ohne Vorkonditionierung der *E. coli* (Abb. 11 A) zeigte sich hingegen bereits nach wenigen Tagen ein starker Abfall der Überlebensraten um ca. 20 % für NGM_K 2,5 μM und 10 μM Naproxen, sowie bis zu ca. 50 % in der höchsten Dosisgruppe. Dieser erhebliche Unterschied spiegelt sich auch in den erhobenen medianen Lebensspannen wider. Die Kontrollgruppe besitzt eine mediane Lebensspanne von 24 Tagen, während sich die medianen Lebensspannen in den Dosisgruppen NGM_K 2,5 μM und 10 μM um 9 bzw. 10 Tage gegenüber der Kontrolle reduziert haben. Bei der maximalen Dosis von NGM_K 25 μM Naproxen verringert sich die mediane Lebensspanne auf nur noch 6 Tage. Dies stellt eine Reduktion der medianen Lebensspanne zur Kontrollgruppe von rund 75 % dar. Betrachtet man die Abweichung der Überlebenskurven in den Expositionsszenarien *E. coli* 0 μM zur Kontrollgruppe, lassen sich Abweichungen für NGM_K 2,5 μM Naproxen ($p=0,074$) und NGM_K 10 μM Naproxen ($p=0,040$) und sogar eine äußerst deutliche Abweichung für NGM_K 25 μM ($p=0,00008$) zur Kontrolle beobachten. Darüber hinaus lässt sich in den Gruppen mit konditionierten *E. coli* eine deutliche Abweichung für *E. coli* 2,5 μM und NGM_K 25 μM zur Gruppenkontrolle ($p=0,044$) erkennen, aufgrund des abrupten Abfalls der Überlebensrate an den Tagen 17 und 18 um ca. 50 % (Abb. 11 B). Des Weiteren weichen die Überlebenskurven der Dosisgruppen *E. coli* 25 μM und NGM_K 10 μM ($p=0,034$) und NGM_K 25 μM ($p=0,012$) deutlich von der Gruppenkontrolle ab. Beide Überlebenskurven verlaufen nach 7 Tagen nahezu parallel zur Überlebenskurve der Kontrolle (Abb. 11 D). In der Expositionsgruppe *E. coli* 10 μM (Abb. 11 C) ließen sich keine Abweichungen zur Kontrollgruppe erkennen.

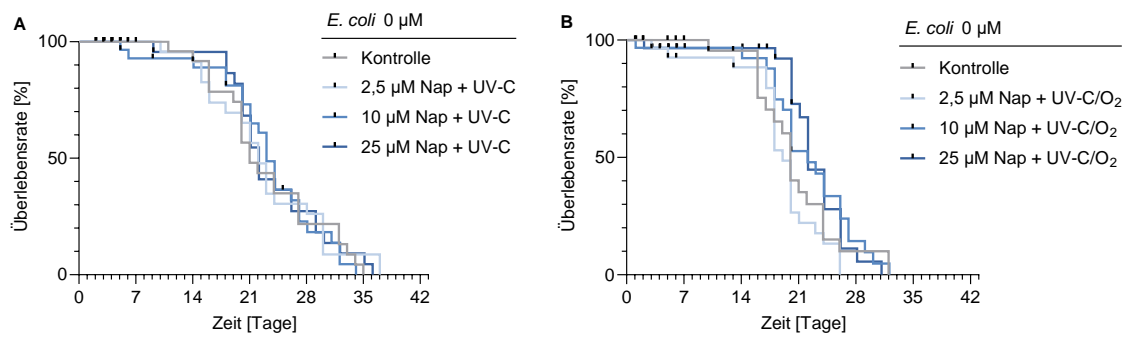


Abb. 12: Toxische Effekte von Naproxen in NGM_K nach zehnmündiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m² (A) und bei 48,4 W/m² unter Sauerstoffzufuhr (B) auf die Lebensspanne von *C. elegans*. Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 µM; 2,5 µM; 10 µM; 25 µM) an behandelter Naproxen-Lösung bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden als tot, lebend oder zensiert kategorisiert und mittels Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (N=3, n=10).

Tab. 10: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Naproxen in NGM_K ohne und mit vorkonditionierten *E. coli*.

Naproxen [µM] Konditionierung <i>E. coli</i>	Naproxen [µM] in NGM _K	mediane Lebens- spanne [Tage]	Verhältnis mediane Lebensspanne zur Kontrolle	95% Konfidenz- intervall des Verhältnisses	p-Wert Log- Rank-Test (Mantel-Cox)
0	0	24	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	14	0,58	0,32-1,06	0,074
	10	15	0,63	0,35-1,13	0,040
	25	6	0,25	0,14-0,45	0,00008
2,5	0	18	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	17	0,94	0,46-1,94	0,712
	10	17	0,94	0,44-2,04	0,297
	25	17	0,94	0,46-1,96	0,044
10	0	20	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	20	1,00	0,52-1,92	0,990
	10	18	0,90	0,48-1,70	0,055
	25	19	0,95	0,51-1,77	0,377
25	0	21	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	20	0,95	0,52-1,75	0,179
	10	20	0,95	0,52-1,73	0,034
	25	20	0,95	0,53-1,72	0,012

Die Exposition mit den unterschiedlich behandelten Naproxen-Lösungen (Abb. 12 A, B) wies kaum Unterschiede zwischen den Überlebenskurven der verschiedenen Dosisgruppen zur jeweiligen Kontrollgruppe auf. Ebenfalls wiesen sie lange Plateauphasen innerhalb der ersten vierzehn Tage auf, sodass sich die Überlebensraten auf max. 90% nach zwei Wochen reduziert hatten. Bei den Expositionsguppen mit den Naproxen-Lösungen die mit 125 W/m² (Abb. 12 A) behandelt wurden, lagen die medianen Lebensspannen zwischen 21 und 23 Tagen. Die medianen Lebensspannen des anderen Expositionsszenarios, bei dem die Naproxen-Lösungen unter Sauerstoffzufuhr behandelt wurden, lagen zwischen 19 und 22 Tage. Die maximalen Lebensspannen in den beiden Expositionsszenarios unterschieden sich nur gering um wenige Tage, mit Ausnahme der Gruppe 2,5 µM Naproxen 48,4 W/m², deren Nematoden bereits an Tag 26 vollständig verstorben sind.

Tab. 11: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Ibuprofen in NGM_k nach unterschiedlichen UV-C Behandlungen.

Behandlung mit UV-C Strahlung	Naproxen [µM] in NGM _k	mediane Lebensspanne [Tage]	Verhältnis mediane Lebensspanne zur Kontrolle	95% Konfidenzintervall des Verhältnisses	p-Wert Log-Rank-Test (Mantel-Cox)
bei 125 W/m ² für 10 min	0	21	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	22	1,05	0,59-1,87	0,830
	10	23	1,10	0,62-1,94	0,796
	25	22	1,05	0,58-1,88	0,744
bei 48,4 W/m ² für 10 min unter Sauerstoffzufuhr	0	20	n. a.	n. a.	n. a.
	2,5	19	0,95	0,52-1,73	0,332
	10	22	1,10	0,60-2,02	0,500
	25	22	1,10	0,59-2,06	0,303

Abschließend wurden die Effekte von den beiden in Abwasser enthaltenen Störgrößen Ammonium und Nitrat auf die Lebensspanne von *C. elegans* (Abb. 13) untersucht. Hierbei ließen sich kaum Unterschiede zwischen den Überlebenskurven der mit Ammonium exponierten Dosisgruppen und der Kontrollgruppe erkennen. Innerhalb der ersten zwei Wochen sind, ähnlich der zuvor beschriebenen Expositionsszenarios, Plateauphasen bei den beiden Störgrößen (Abb. 13) zu beobachten, sodass sich die Überlebensraten in dieser Zeit um 10 bis 20 % reduzierten. Einzige Ausnahme stellte die Gruppe NO₃ GW (Abb. 13 B) dar, deren Überlebensrate zu diesem Zeitpunkt bereits auf ca. 60 % gefallen war. Die Kaplan-Meier-Kurve dieser Dosisgruppe wies daher eine

deutliche Abweichung ($p=0,041$) im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Bei der Kontrollgruppe und den Dosisgruppen NO_3 GWx15 und GWx30 ließen sich mediane Lebensspannen von 20 Tagen beobachten, wohingegen die Dosisgruppe NO_3 GW eine mediane Lebensspanne von lediglich 16 Tagen aufzeigte. Die maximalen Lebensspannen in den beiden Expositionsszenarien lagen zwischen 25 und 35 (NH_4) bzw. 36 (NO_3).

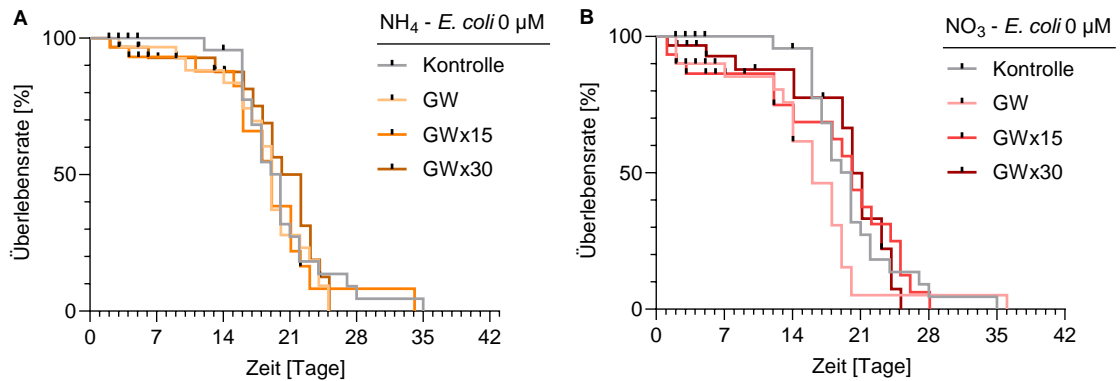


Abb. 13: Toxische Effekte von Ammonium (A) und Nitrat (B) in NGM_K auf die Lebensspanne von *C. elegans*.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen an NH_4 oder NO_3 (Grenzwert (GW) - $\text{NH}_4=0,715 \text{ mM}$, $\text{NO}_3=1,43 \text{ mM}$, sowie den 15- und 30-fachen GW) bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden als tot, lebend oder zensiert kategorisiert und mittels Kaplan-Meier-Kurve dargestellt ($N=3$, $n=10$).

Tab. 12: Analyseergebnisse der Lebensspanne mit Ammonium und Nitrat in NGM_K .

Substanz	Konzentration in NGM_K	mediane Lebensspanne [Tage]	Verhältnis mediane Lebensspanne zur Kontrolle	95% Konfidenzintervall des Verhältnisses	p-Wert Log-Rank-Test (Mantel-Cox)
NH_4	0	20	n. a.	n. a.	n. a.
	GW	19	0,95	0,53-1,72	0,418
	GWx15	19	0,95	0,51-1,77	0,591
	GWx30	22	1,10	0,58-2,10	0,918
NO_3	0	20	n. a.	n. a.	n. a.
	GW	16	0,80	0,44-1,46	0,041
	GWx15	20	1,00	0,54-1,86	0,735
	GWx30	20	1,00	0,54-1,86	0,984

4.2.2 Lokomotionsassay

Neben den Beobachtungen zur Überlebenszeit der Nematoden wurde ein weiterer toxikologischer Endpunkt bzgl. der chronischen Toxizität der zu untersuchenden Substanzen beurteilt, der Verlust der Beweglichkeit. Hierzu wurden die Nematoden nach Exposition an Tag 4, 7, 14 und 21 mikroskopisch untersucht und in vier verschiedene Kategorien (siehe Tab. 7) eingeordnet.

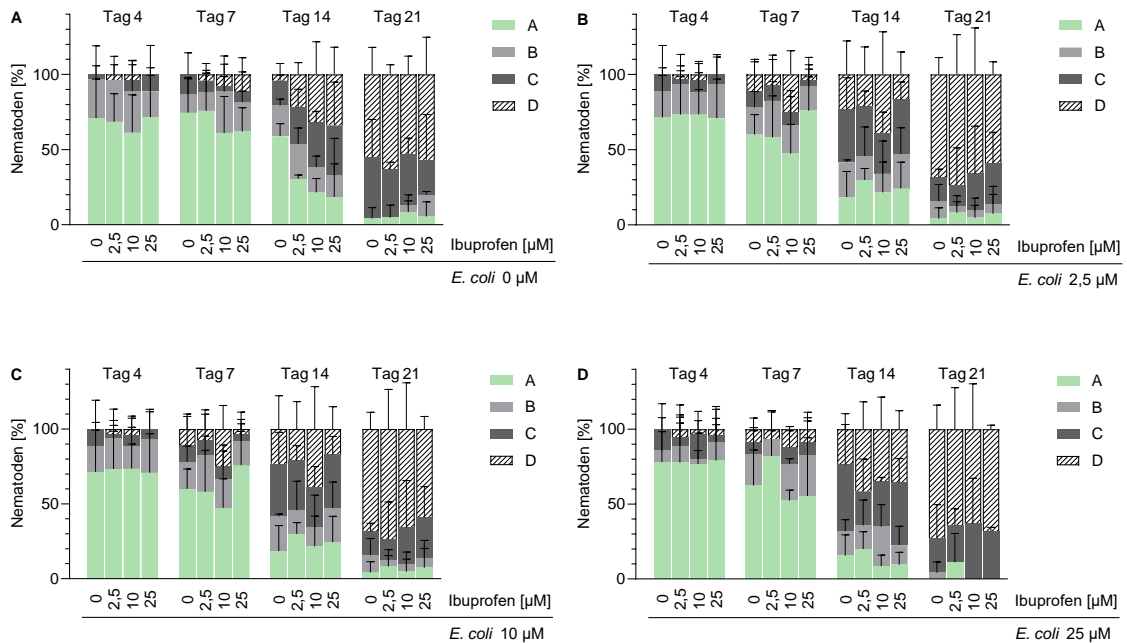


Abb. 14: Effekte von Ibuprofen in NGM_K ohne vorkonditionierte *E. coli* 0 µM (A) und mit vorkonditionierten *E. coli* 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Ibuprofen auf die Motilität von *C. elegans* nach 4, 7, 14 und 21 Tagen.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 µM; 2,5 µM; 10 µM; 25 µM) an Ibuprofen in NGM_K und *E. coli* bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden an den Tagen 4, 7, 14 und 21 nach 3.2.8 Lokomotion Tab. 7 kategorisiert. Kategorisierung: A - Spontanbewegung; B - Bewegung des ganzen Körpers nach TPM-Methode; C - Bewegung nur von Kopf, Schwanz oder Pharynx nach TPM-Methode; D - tot. Gezeigt sind die gemittelten prozentualen Anteile [%] mit SD (N=3, n=10).

Die Ergebnisse zur Beweglichkeit nach Exposition mit Ibuprofen sind in Abb. 14 dargestellt. An Tag 4 waren überwiegend Würmer mit Spontanbewegung (ca. 70 %), ca. 25 % der Kategorie B und ca. 5 % der Kategorie C in fast allen Dosisgruppen zu beobachten. Abweichend hiervon sind die Expositionsgruppen mit maximaler *E. coli*-Konzentration (25 µM), bei denen bereits ein größerer Anteil an unbeweglicheren Nematoden der Kategorie C (ca. 15%) in den Gruppen NGM_K 0 µM und 10 µM Ibuprofen vorlagen. Über den Beobachtungszeitraum konnte eine Abnahme der in Kategorie A eingruppierten Nematoden in allen Dosisgruppen von ca. 75 % an Tag 4, über ca. 60% an Tag 7 und ca. 20-30 % an Tag 14, auf ca. 0-5 % an Tag 21 festgestellt werden. Die Anzahl an in Kategorie B eingeordnete Würmer änderte sich kaum und liegt für alle

Dosisgruppen bei ca. 20-30 % für die ersten drei Beobachtungszeitpunkte. An Tag 21 ließen sich nahezu keine Nematoden (ca. 0-5%) in die Kategorie B einordnen. Die Kontrollgruppe und die beiden höchsten Dosisgruppen mit *E. coli* 25 µM Ibuprofen sind die einzigen Gruppen bei denen nach 21 Tagen keine Nematoden mit eigenständiger Spontanbewegung vorlagen. Auch für die Kategorie C lassen sich dosisübergreifende Effekte erkennen. So nahm die Anzahl derer in Kategorie C einzuordnenden Würmer über den Beobachtungszeitraum, von ca. 5 % an Tag 4 auf ca. 20-40% an Tag 21, zu. Eine Besonderheit lässt sich an Tag 7 in den Gruppen *E. coli* 0 µM und NGM_K 0 µM und 2,5 µM, *E. coli* 2,5 µM und NGM_K 25 µM, *E. coli* 10 µM und NGM_K 25 µM sowie *E. coli* 25 µM und NGM_K 2,5 µM Ibuprofen (Abb. 14) feststellen. In diesen Expositionsgruppen stieg die Anzahl der Nematoden mit Spontanbewegung im Vergleich zum vorherigen Beobachtungszeitpunkt leicht an. Des Weiteren ließ sich lediglich im Expositions-szenario *E. coli* 0 µM an Tag 14 ein dosisabhängiger Effekt in den Kategorien A und C erkennen. Je höher die Konzentration im NGM_K war desto weniger Nematoden wurden in Kategorie A und desto mehr wurden in Kategorie C eingruppiert.

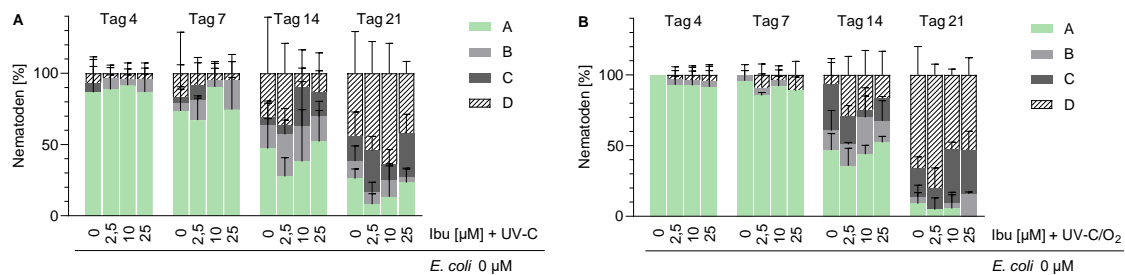


Abb. 15: Effekte von Ibuprofen in NGM_K nach zehnminütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m² (A) und bei 48,4 W/m² unter Sauerstoffzufuhr (B) auf die Motilität von *C. elegans* nach 4, 7, 14 und 21 Tagen. Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 µM; 2,5 µM; 10 µM; 25 µM) behandelter Ibuprofen-Lösung bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden an den Tagen 4, 7, 14 und 21 nach 3.2.8 Lokomotion Tab. 7 kategorisiert. Kategorisierung: A - Spontanbewegung; B: Bewegung des ganzen Körpers nach TPM-Methode; C - Bewegung nur von Kopf, Schwanz oder Pharynx nach TPM-Methode; D - tot. Gezeigt sind die gemittelten prozentualen Anteile [%] mit SD (N=3, n=10).

Die Exposition mit den unterschiedlich behandelten Ibuprofen-Lösungen (Abb. 15 A, B) wies leichte Unterschiede in der Eingruppierung der Nematoden bzgl. ihrer Beweglichkeit der verschiedenen Dosisgruppen auf. An den ersten Untersuchungszeitpunkten ließen sich zunächst ähnliche Beobachtungen machen wie bereits bei den Untersuchungen zu Ibuprofen ohne UV-C Behandlung. Mit zunehmender Expositionszeit sank die Beweglichkeit der lebenden *C. elegans* dosisübergreifend von zu Beginn ca. 90-100 % in der Kategorie A auf 0-25 %. Die Untersuchungen mit der UV-C bestrahlten Probe (Abb. 15 A) zeigten an Tag 14 leichte Unterschiede in der Einteilung bzgl. der Beweglichkeit. Die beiden höchsten Konzentrationen wiesen eine insgesamt höhere Überlebensrate auf, jedoch besaßen die Würmer zur Hälfte (30-50 %) eine

geringere Beweglichkeit (Kategorie B und C). Die Würmer der Kontrollgruppe bewegten sich nahezu alle selbstständig und die Würmer der Dosisgruppe 2,5 μM wies den geringsten Anteil an Würmern mit Eigenbewegung auf. Bei der unter Sauerstoffzufuhr behandelten Ibuprofen-Lösung (Abb. 15 B) zeigten sich teilweise andere Auswirkungen auf den Modellorganismus. So ließen sich an Tag 14 die meisten lebenden Nematoden in der Kontrollgruppe finden, wobei auch in dieser Gruppe der Anteil an Würmern, die nur ihren Kopf, Schwanz oder Pharynx bewegen konnten, mit ca. 30 %, am größten ist. An Tag 21 änderten sich die Verhältnisse innerhalb der Dosisgruppen und die beiden höchsten Dosisgruppen wiesen den höchsten Anteil (20-30%) in Kategorie C ein-
 gruppiertes Würmern auf. Die höchste Dosisgruppe stellt die einzige Gruppe dar, bei der sich nach 21 Tagen keine Nematode eigenständig bewegte.

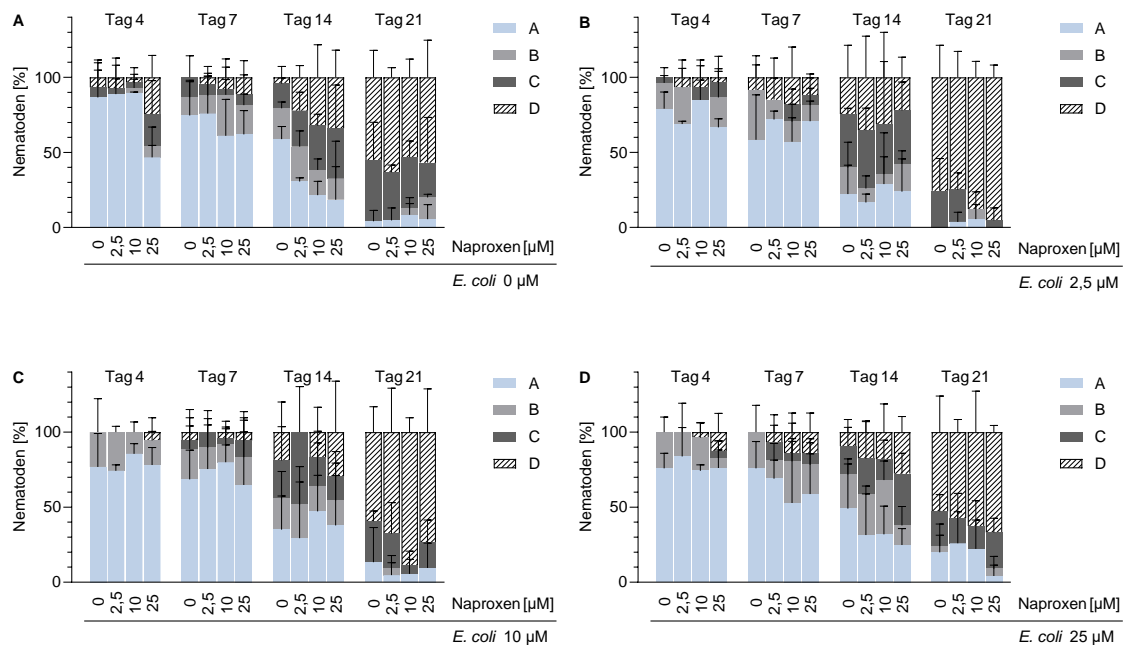


Abb. 16: Effekte von Naproxen in NGM_K ohne vorkonditionierte *E. coli* 0 μM (A) und mit vorkonditionierten *E. coli* 2,5 μM (B), 10 μM (C) und 25 μM (D) Naproxen auf die Motilität von *C. elegans* nach 4, 7, 14 und 21 Tagen.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM ; 2,5 μM ; 10 μM ; 25 μM) an Naproxen in NGM_K und *E. coli* bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden an den Tagen 4, 7, 14 und 21 nach 3.2.8 Lokomotion Tab. 7 kategorisiert. Kategorisierung: A - Spontanbewegung; B - Bewegung des ganzen Körpers nach TPM-Methode; C - Bewegung nur von Kopf, Schwanz oder Pharynx nach TPM-Methode; D - tot. Gezeigt sind die gemittelten prozentualen Anteile [%] mit SD (N=3, n=10).

Im Lokomotionsassay der Exposition mit Naproxen konnte mit fortschreitender Beobachtungszeit eine Abnahme der Beweglichkeit beobachtet werden (Abb. 16). Ähnlich wie in den zuvor beschriebenen Untersuchungen zu Ibuprofen reduzierte sich der Anteil der in Kategorie A und es erhöhte sich der Anteil der in Kategorie C einzugruppierten Nematoden über den Zeitraum von drei Wochen. Leichte Effekte der Vorkonditionierung von *E. coli* ließen sich nur an Tag 4 erkennen. Es konnten sich

durch die Konditionierung dosisunabhängig mehr Würmer der Kategorie B in den verschiedenen Kontrollgruppen (Abb. 16 B-D) beobachten lassen im Vergleich zur Kontrollgruppe *E. coli* 0 μM NGM_K 0 μM Naproxen (Abb. 16 A). Nach 21 Tagen verzeichnete die Expositionsgruppe *E. coli* 2,5 μM NGM_K 25 μM Naproxen, die wenigsten lebenden Nematoden (ca. 5 %), welche alle eine Bewegung des Kopfes, Schwanzes oder Pharynx nach TPM-Methode aufwiesen (Abb. 16 B). Hingegen wies die Kontrollgruppe *E. coli* 2,5 μM Naproxen (Abb. 16 D) noch rund 20 % lebende Nematoden auf. Bei den Expositionsgruppen *E. coli* 25 μM Naproxen ließen sich für die höchste Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe stets höhere Anteile an toten und in Kategorie C eingruppierten Nematoden beobachten. Eine weitere Abweichung lässt sich in der Expositionsgruppe *E. coli* 0 μM NGM_K 25 μM Naproxen (Abb. 16 A) an Tag 7 feststellen. Hier scheint es als wären Nematoden wieder aktiver als an Tag 4.

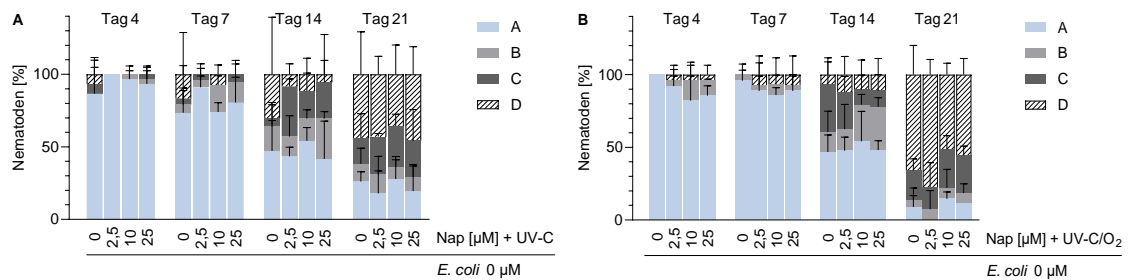


Abb. 17: Effekte von Naproxen in NGM_K nach zehnminütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m^2 (A) und bei 48,4 W/m^2 unter Sauerstoffzufuhr (B) auf die Motilität von *C. elegans* nach 4, 7, 14 und 21 Tagen. Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM ; 2,5 μM ; 10 μM ; 25 μM) behandelte Naproxen-Lösung bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden an den Tagen 4, 7, 14 und 21 nach 3.2.8 Lokomotion Tab. 7 kategorisiert. Kategorisierung: A - Spontanbewegung; B - Bewegung des ganzen Körpers nach TPM-Methode; C - Bewegung nur von Kopf, Schwanz oder Pharynx nach TPM-Methode; D - tot. Gezeigt sind die gemittelten prozentualen Anteile [%] mit SD (N=3, n=10).

Die Beobachtungen zur Exposition mit unterschiedlich behandelten Naproxen-Lösungen in NGM_K zeigten eine Abnahme der Beweglichkeit über die Zeit von 21 Tagen (Abb. 17). An den Tagen 4 und 7 waren keine Unterschiede erkennbar. An Tag 14 schienen die Nematoden aus den Gruppen, die mit 10 μM und 25 μM unter Sauerstoffzufuhr behandelte Naproxen-Lösung (Abb. 17 A, B) exponiert wurden, eine höhere Beweglichkeit als die jeweilige Kontrollgruppe zu besitzen. Der Anteil an Nematoden mit Spontanbewegung war zwar ähnlich der Kontrollgruppe, jedoch besaßen die beiden mit 48,4 W/m^2 behandelte Expositionsgruppen (Abb. 17 B) einen höheren Anteil in Kategorie B eingruppierte Würmer. Bei der mit UV-C behandelte Probe ohne Sauerstoffzufuhr (Abb. 17 A) zeigte sich an Tag 14 eine höhere Lebensrate in allen drei Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Unterschied ließ sich an Tag 21 nicht mehr erkennen.

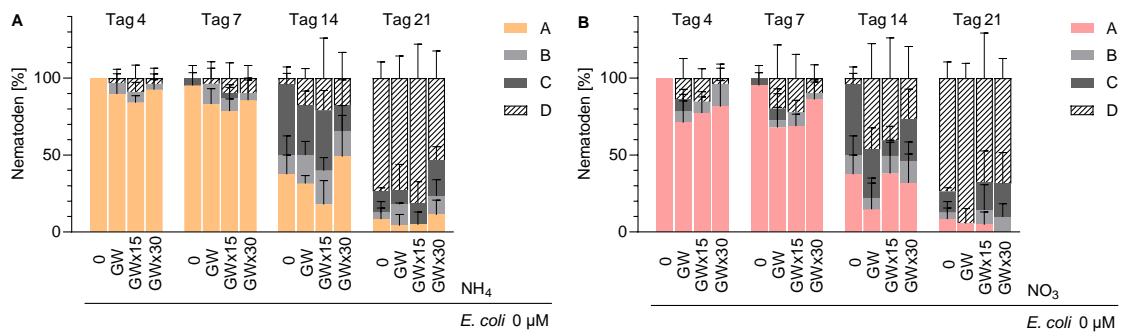


Abb. 18: Effekte von Ammonium (A) und Nitrat (B) in NGM_k auf die Motilität von *C. elegans* nach 4, 7, 14 und 21 Tagen.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen an NH₄ oder NO₃ (Grenzwert (GW) - NH₄=0,715 mM, NO₃=1,43 mM, sowie den 15- und 30-fachen GW) bei 20°C inkubiert. Die Nematoden wurden an den Tagen 4, 7, 14 und 21 nach 3.2.8 Lokomotion Tab. 7 kategorisiert. Kategorisierung: A - Spontanbewegung; B: Bewegung des ganzen Körpers nach TPM-Methode; C - Bewegung nur von Kopf, Schwanz oder Pharynx nach TPM-Methode; D - tot. Gezeigt sind die gemittelten prozentualen Anteile [%] mit SD (N=3, n=10).

Abschließend wurde der Einfluss der Störgrößen Ammonium und Nitrat auf die Beweglichkeit der Nematoden untersucht (Abb. 18). Nach vier Tagen konnten bei allen Expositionsgruppen wenige Nematoden mit Bewegung des ganzen Körpers nach TPM-Methode beobachtet werden im Vergleich zur Kontrollgruppe, deren Nematoden alle eine Spontanbewegung aufwiesen. Der größte Unterschied zeigte sich bei der Expositionsgruppe NO₃ GWx30 zur Kontrolle, bei der ca. 20 % der Nematoden der Kategorie B zugeordnet wurden (Abb. 18 B). An Tag 7 ließen sich kaum Veränderungen der Beweglichkeit feststellen. Nach zwei Wochen waren in der Kontrollgruppe nahezu alle Nematoden lebendig (ca. 95 %). Alle anderen Expositionsgruppen wiesen eine erkennbar niedrigere Lebensrate nach zwei Wochen auf. Von den Nematoden der Kontrollgruppe besaß der größte Anteil (ca. 45 %) eine Beweglichkeit der Kategorie C, ca. 40 % eine Spontanbewegung und ca. 15 % bewegten sich nach TPM-Methode vollständig. Einzig die höchste Dosisgruppe von NH₄ GWx30 zeigte einen höheren Anteil an Nematoden mit Spontanbewegung von ca. 50 % im Vergleich zur Kontrolle nach 14 Tagen. Dementgegen ließ sich bei den niedrigeren NH₄-Konzentrationen eine dosisabhängige Reduktion der Beweglichkeit an Tag 14 beobachten. Für NO₃ zeigte sich an Tag 14 ebenfalls eine Reduktion der Beweglichkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die niedrigste Beweglichkeit besaß die Gruppe mit der geringsten NO₃-Konzentration und stieg dann mit zunehmender Konzentration wieder an. An Tag 21 ließen sich bei NH₄ keine Unterschiede in der Beweglichkeit beobachten. Hingegen bei der Exposition mit NO₃ konnten zwei Besonderheiten festgestellt werden. Die Nematoden der Dosisgruppe NO₃ GW, mit der geringsten Anzahl lebender Würmer (ca. 5 %), haben sich alle eigenständig fortbewegt. Andererseits zeigte die höchste Dosis keine Nematoden mit

Spontanbewegung, jedoch war sie zusammen mit der Konzentration NO₃ GWx15, die Gruppe mit den meisten lebenden Würmern (ca. 30 %).

4.3 Untersuchungen zur Reproduktionstoxizität

Um einen weitergehenden toxikologischen Einfluss der zu untersuchenden Substanzen abbilden zu können, ist es notwendig neben den direkten Effekten auf die Nematoden, wie die Letalität und die Beweglichkeit, auch die Fortpflanzung des Modellorganismus und Entwicklung der Nachkommen zu betrachten. Zu diesem Zweck wurde mittels Nachkommenschaftstest die Nachkommenanzahl pro Nematode und Tag sowie die relative Nachkommenanzahl pro Nematode während der reproduktiven Phase von *C. elegans* untersucht (Abb. 19-28).

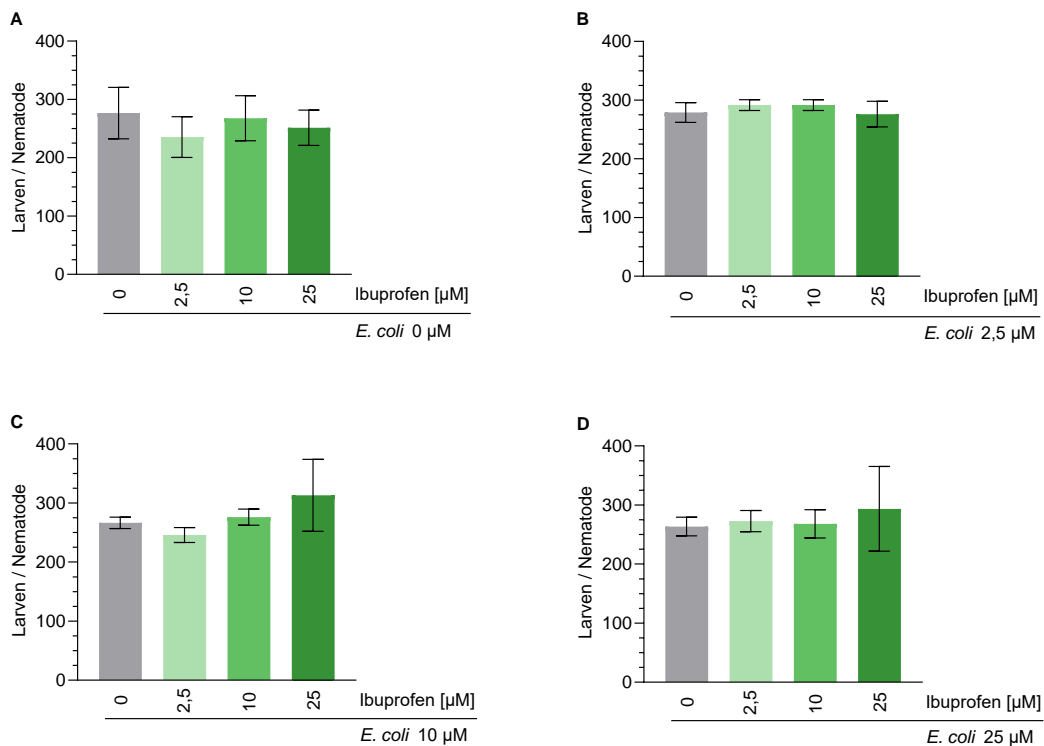


Abb. 19: Relative Anzahl an Nachkommen pro Nematode nach Inkubation mit Ibuprofen in NGM_K ohne vorkonditionierte *E. coli* 0 µM (A) und mit vorkonditionierten *E. coli* 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Ibuprofen.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 µM; 2,5 µM; 10 µM; 25 µM) an Ibuprofen in NGM_K und *E. coli* bei 20°C inkubiert und täglich in neue Kulturschalen umgesetzt. Die abgelegten Embryonen wurden bebrütet und ausgezählt. Gezeigt ist die gemittelte relative Nachkommenanzahl/Nematode mit SD (N=3, n=10).

Bei der Betrachtung der relativen Nachkommenanzahl/Nematode nach Exposition mit Ibuprofen (Abb. 19) zeigte nur die höchste Dosisgruppe der mit 10 µM vorkonditionierten *E. coli* einen leichten Anstieg um ca. 50 Larven/Nematode im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. In den verschiedenen Expositionsgruppen lag die relative Anzahl an

Nachkommen/Nematode zwischen 230 (*E. coli* 0 μM und NGM_K 2,5 μM Ibuprofen) und 310 (*E. coli* 25 μM und NGM_K 10 μM Ibuprofen) Larven/Nematode. Die Vorkonditionierung von *E. coli* und der Einsatz von Ibuprofen im NGM_K besaß keinen Einfluss auf die relative Nachkommenanzahl/Nematode.

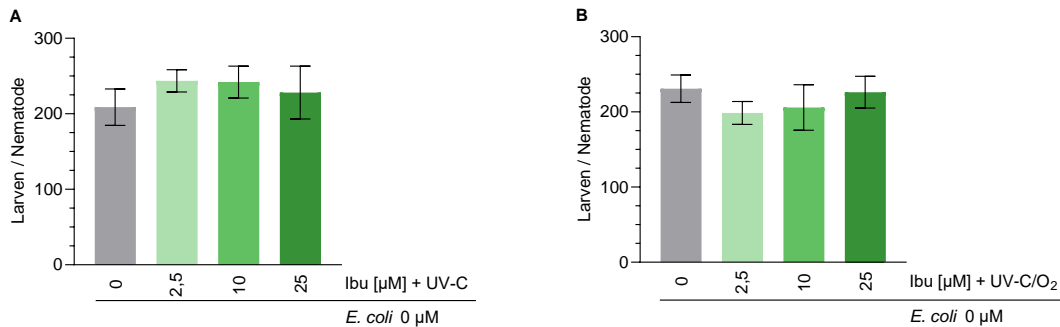


Abb. 20: Relative Anzahl an Nachkommen pro Nematode nach Inkubation mit Ibuprofen in NGM_K nach zehnmütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m² (A) und bei 48,4 W/m² unter Sauerstoffzufuhr (B).

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM ; 2,5 μM ; 10 μM ; 25 μM) behandelter Ibuprofen-Lösung bei 20°C inkubiert und täglich in neue Kulturschalen umgesetzt. Die abgelegten Embryonen wurden bebrütet und ausgezählt. Gezeigt ist die gemittelte relative Nachkommenanzahl/Nematode mit SD (N=3, n=10).

Nach der Exposition gegenüber mit UV-C Strahlung und unter Sauerstoffzufuhr behandelter Ibuprofen-Lösung ließen sich für die Dosisgruppen 2,5 μM und 10 μM Ibuprofen ca. 200 Larven/Nematode beobachten (Abb. 20 B). Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten somit ca. 30 Larven/Nematode weniger identifiziert werden. Bei der höchsten Konzentration konnte kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Die Expositionen der mit UV-C Strahlung behandelten Lösungen (Abb. 20 A) zeigten eine leicht erhöhte relative Nachkommenanzahl/Nematode für alle untersuchten Dosisgruppen, um ca. 40 Larven/Nematode, gegenüber der Kontrolle. Die mit UV-C Strahlung behandelten Ibuprofen-Proben ließen keinen Effekt auf die relative Nachkommenanzahl/Nematode erkennen.

Ebenso wurden die reproduktionstoxikologischen Untersuchungen für Naproxen mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt (Abb. 21). Hier ließen sich Unterschiede in den Expositionsgruppen *E. coli* 0 μM (Abb. 21 A) und 2,5 μM (Abb. 21 B) feststellen. Einzig der Einsatz der maximalen Dosis von 25 μM Naproxen in NGM_K führte in der Expositionsgruppe mit unbehandeltem *E. coli* zu einer deutlichen Reduktion der relativen Nachkommenanzahl/Nematode um ca. 25% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 21 A). Auch in den Expositionsgruppen *E. coli* 2,5 μM konnte eine Reduktion der Nachkommenanzahl/Nematode, von ca. 30-40 Larven/Nematode im Vergleich zur Kontrollgruppe, in allen Dosisgruppen beobachtet werden. Insgesamt konnten für alle

mit Naproxen vorkonditionierten *E. coli* Kontrollgruppen (Abb. 21 B-D) zwischen 50 und 75 Larven/Nematode mehr beobachtet werden, verglichen mit der unkonditionierten Kontrollgruppe, welche ca. 200 Larven/Nematode aufwies (Abb. 21 A).

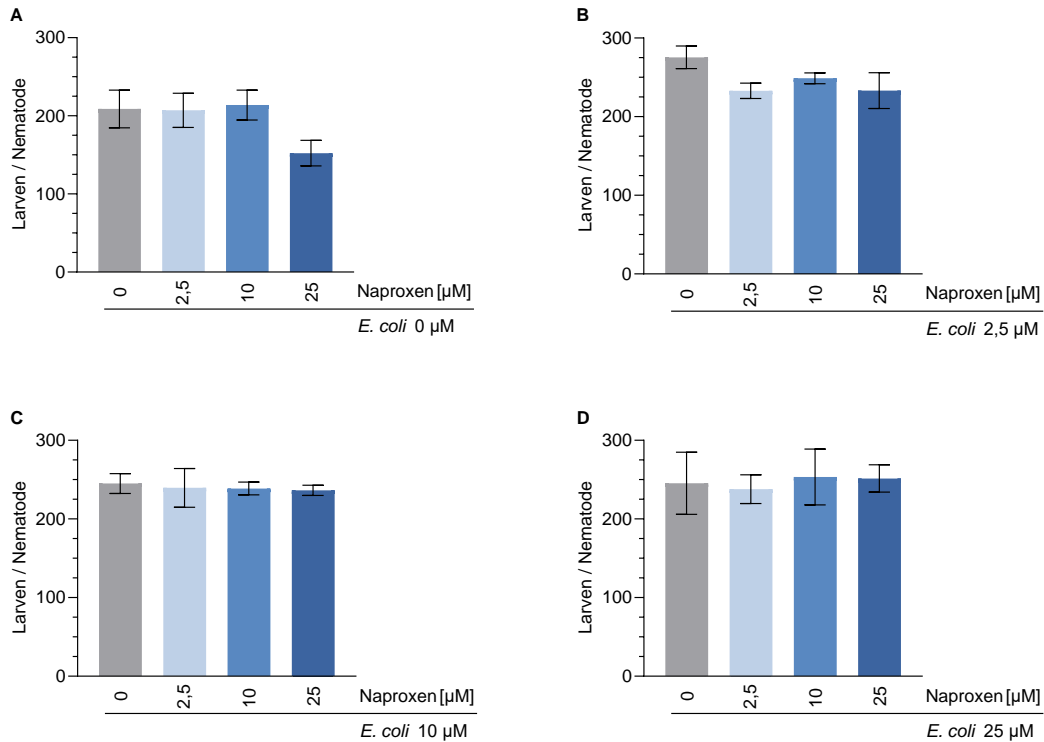


Abb. 21: Relative Anzahl an Nachkommen pro Nematode nach Inkubation mit Naproxen in NGM_K ohne vorkonditionierte *E. coli* 0 µM (A) und mit vorkonditionierten *E. coli* 2,5 µM (B), 10 µM (C) und 25 µM (D) Naproxen.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 µM; 2,5 µM; 10 µM; 25 µM) an Naproxen in NGM_K und *E. coli* bei 20°C inkubiert und täglich in neue Kulturschalen umgesetzt. Die abgelegten Embryonen wurden bebrütet und ausgezählt. Gezeigt ist die gemittelte relative Nachkommenanzahl/Nematode mit SD (N=3, n=10).

Die Ergebnisse zur Exposition mit unterschiedlich behandelten Naproxen-Lösungen in NGM_K nach UV-C Behandlung mit und ohne Sauerstoffzufuhr sind in Abb. 22 dargestellt. Die ohne Sauerstoffzufuhr behandelte Lösung führte in allen verabreichten Konzentrationen zu einer geringfügigen Erhöhung der relativen Nachkommenanzahl/Nematode, um ca. 20 Larven/Nematode, im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 22 A). Für die unter Sauerstoff behandelte Naproxen-Lösung ist ein umgekehrtes Muster zu erkennen (Abb. 22 B). Hier schlüpfen in allen Expositionsgruppen durchschnittlich 15 Larven/Nematode weniger als in der Kontrollgruppe.

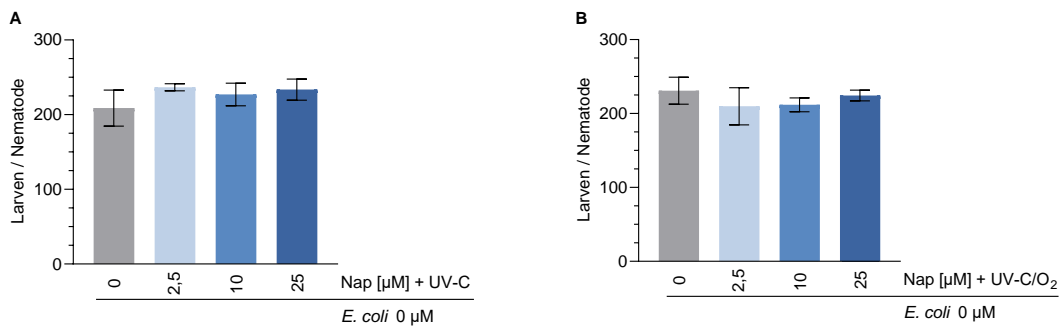


Abb. 22: Relative Anzahl an Nachkommen pro Nematode nach Inkubation mit Naproxen in NGM_K nach zehnmütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m² (A) und bei 48,4 W/m² unter Sauerstoffzufuhr (B).

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM; 2,5 μM; 10 μM; 25 μM) behandelter Naproxen-Lösung bei 20°C inkubiert und täglich in neue Kulturschalen umgesetzt. Die abgelegten Embryonen wurden bebrütet und ausgezählt. Gezeigt ist die gemittelte relative Nachkommenanzahl/Nematode mit SD (N=3, n=10).

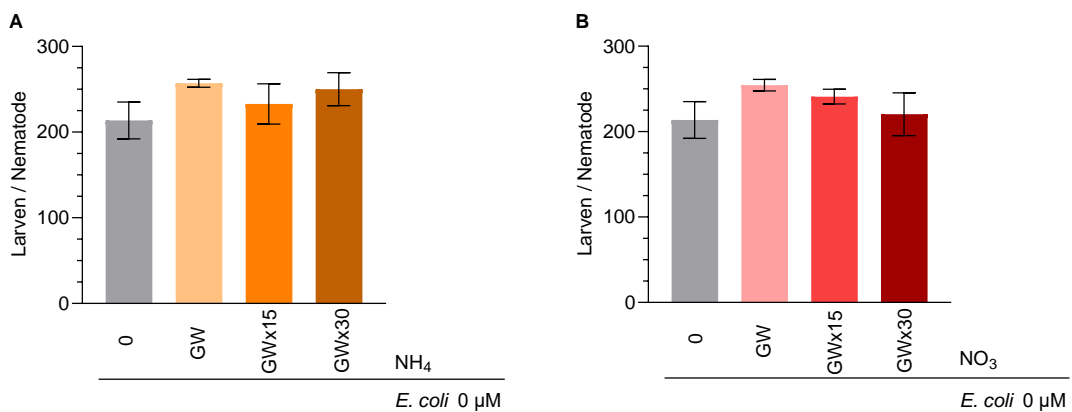


Abb. 23: Relative Anzahl an Nachkommen pro Nematode nach Inkubation mit Ammonium (A) und Nitrat (B).

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen an NH₄ und NO₃ (Grenzwert (GW) - NH₄=0,715 mM, NO₃=1,43 mM, sowie den 15- und 30-fachen GW) bei 20°C inkubiert und täglich in neue Kulturschalen umgesetzt. Die abgelegten Embryonen wurden bebrütet und ausgezählt. Gezeigt ist die gemittelte relative Nachkommenanzahl/Nematode mit SD (N=3, n=10).

Für die untersuchten Störgrößen NH₄ und NO₃ konnte ein Anstieg der relativen Anzahl an Nachkommen pro Nematode im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 23 A, B). Ein erkennbarer Anstieg um ca. 40 Larven/Nematode zeigte sich in den Expositionsgruppen NH₄ GW, NH₄ GWx30 und NO₃ GW. Bei NH₄ schwankte die relative Nachkommenanzahl/Nematode in den höheren Dosisgruppen, wohingegen sie bei NO₃ mit zunehmender Konzentration abnimmt, jedoch nicht unterhalb des Wertes der Kontrollgruppe gelangt.

Über alle Untersuchungen hinweg ließen sich Schwankungen der beobachteten relativen Nachkommenanzahl/Nematode unterhalb der Kontrollgruppen beobachtet.

Die Nachkommenanzahl/Nematode schwankten in diesen Gruppen von 200 bis 300 Larven/Nematode.

Um ein differenziertes Bild über den reproduktionstoxischen Effekt auf die Nematoden zu erhalten, wurde neben der relativen Anzahl an Nachkommen/Nematode ebenso eine Aufschlüsselung pro Tag vorgenommen. In nahezu allen Expositionsszenarien traten an Tag 3 die meisten Nachkommen/Nematode auf. Ausnahmen bildeten die Expositionsszenarien *E. coli* 0 μM und NGM_K 2,5 μM Ibuprofen + UV-C/O₂ (Abb. 25 B) bzw. NGM_K 10 μM Naproxen (Abb. 26 A), die ihren Maximalwert bereits an Tag 2 erreichten. Die Expositionssgruppe *E. coli* 2,5 μM und NGM_K 2,5 μM Naproxen (Abb. 26 B) zeigten an Tag 2 und Tag 3 ihre Maxima auf. Die beobachtete Reproduktionsphase von *C. elegans* lag zwischen fünf und maximal zehn Tagen, wobei nach ca. fünf bis sechs Tage annähernd keine Nachkommen identifiziert werden konnten, da es nur noch vereinzelt zur Eiablage kam.

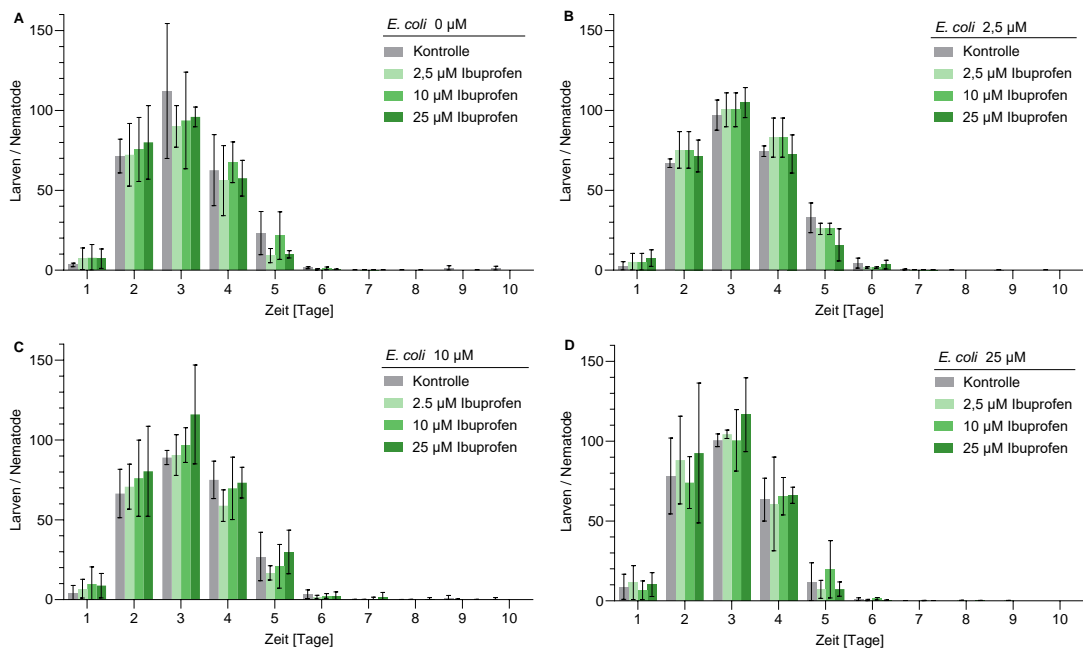


Abb. 24: Anzahl an Nachkommen pro Nematode und Tag nach Inkubation mit Ibuprofen in NGM_K ohne vorkonditionierte *E. coli* 0 μM (A) und mit vorkonditionierten *E. coli* 2,5 μM (B), 10 μM (C) und 25 μM (D) Ibuprofen.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen an (0 μM ; 2,5 μM ; 10 μM ; 25 μM) Ibuprofen in NGM_K und *E. coli* bei 20°C inkubiert und täglich in neue Kulturschalen umgesetzt. Die abgelegten Embryonen wurden bebrütet und ausgezählt. Gezeigt ist die gemittelte Nachkommenanzahl/Nematode und Tag mit SD (N=3, n=10).

Die Vorkonditionierung von *E. coli* mit Ibuprofen ließ eine verlängerte Ablage von einzelnen Eiern und damit das Auftreten von Nachkommen nach Tag 6 erkennen (Abb. 24 B-D). Bereits bei der Betrachtung der relativen Nachkommenanzahl/Nematode ließ sich ein leichter dosisabhängiger Effekt für die Dosisgruppen der Exposition mit

E. coli 10 μM Ibuprofen feststellen (Abb. 19). Dies ist in der nach Tagen aufgetragenen Darstellung (Abb. 24 C) nun deutlicher an den Tagen 2 bis 5 erkennbar.

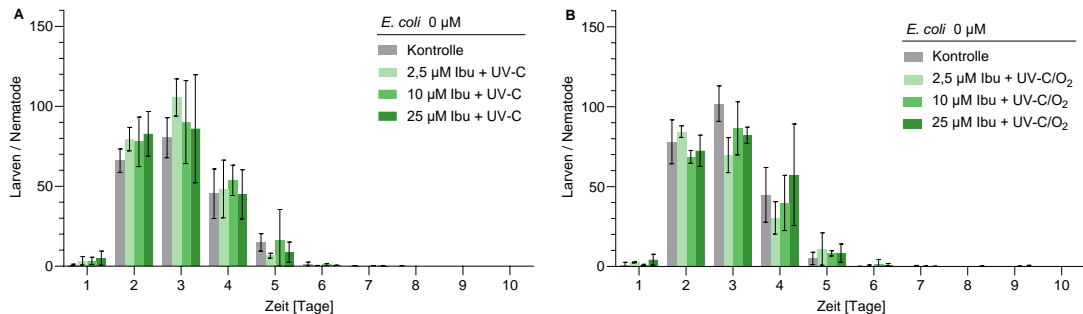


Abb. 25: Anzahl an Nachkommen pro Nematode und Tag nach Inkubation mit Ibuprofen in NGM_K nach zehnminütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m² (A) und bei 48,4 W/m² unter Sauerstoffzufuhr (B).

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM ; 2,5 μM ; 10 μM ; 25 μM) behandelter Ibuprofen-Lösung bei 20°C inkubiert und täglich in neue Kulturschalen umgesetzt. Die abgelegten Embryonen wurden bebrütet und ausgezählt. Gezeigt ist die gemittelte Nachkommenanzahl/Nematode und Tag mit SD (N=3, n=10).

Bei der Exposition mit den unterschiedlich behandelten Ibuprofen-Lösungen (Abb. 25 A, B) ließen sich geringe Unterschiede feststellen. Zum einen zeigte die Gruppe 2,5 μM Ibuprofen + UV-C (Abb. 25 A) an Tag 3 das höchste Maximum unter den Expositionsgruppen auf, welches sich von der Kontrolle unterschied, zum anderen wies die Gruppe 2,5 μM Ibuprofen + UV-C/O₂ (Abb. 25 B) bereits ihr Maximum an Tag 2 auf.

Ähnlich der Vorkonditionierung von *E. coli* mit Ibuprofen zeigte auch die Vorkonditionierung mit Naproxen eine Verlängerung der Reproduktionsphase von sechs auf sieben Tage für alle Gruppen mit *E. coli* 2,5 μM Naproxen (Abb. 26 B) bzw. acht Tage für *E. coli* 10 μM bzw. 25 μM und NGM_K 0 μM bzw. 25 μM Naproxen (Abb. 26 C, D). Des Weiteren wies die Dosisgruppe *E. coli* 0 μM und NGM_K 25 μM Naproxen an Tag 6 erkennbar mehr Nachkommen/Nematode auf als die Kontrollgruppe. Ein umgekehrtes Bild ließ sich für die Expositionsgruppen der *E. coli* 2,5 μM Naproxen beobachten, bei der die Kontrolle ca. 20 Larven/Nematode mehr aufwies im Vergleich zu den Dosisgruppen.

Für die Expositionen gegenüber mit UV-C Strahlung und UV-C Strahlung unter Sauerstoffzufuhr behandelte Naproxen-Lösung lassen sich, abgesehen von der leicht höheren Anzahl an Nachkommen/Nematode je Tag für die ohne Sauerstoffzufuhr behandelten Dosisgruppen, keine Unterschiede feststellen (Abb. 27).

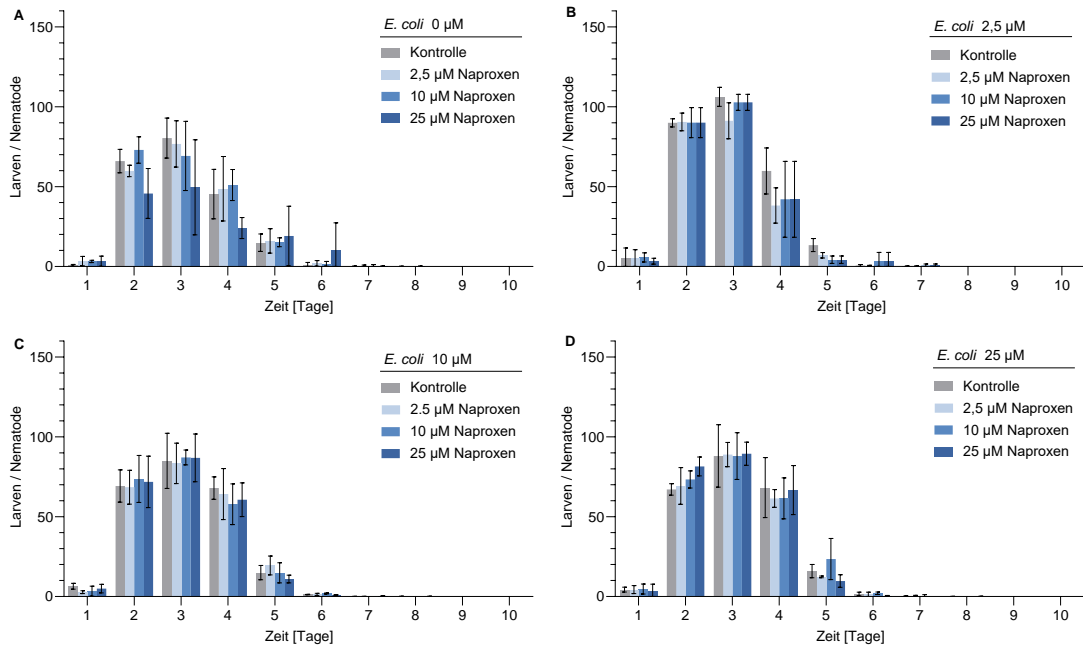


Abb. 26: Anzahl an Nachkommen pro Nematode und Tag nach Inkubation mit Naproxen in NGM_K ohne vorkonditionierte *E. coli* 0 μM (A) und mit vorkonditionierten *E. coli* 2,5 μM (B), 10 μM (C) und 25 μM (D) Ibuprofen.

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM; 2,5 μM; 10 μM; 25 μM) an Naproxen in NGM_K und *E. coli* bei 20°C inkubiert und täglich in neue Kulturschalen umgesetzt. Die abgelegten Embryonen wurden bebrütet und ausgezählt. Gezeigt ist die gemittelte Nachkommenanzahl/Nematode und Tag mit SD (N=3, n=10).

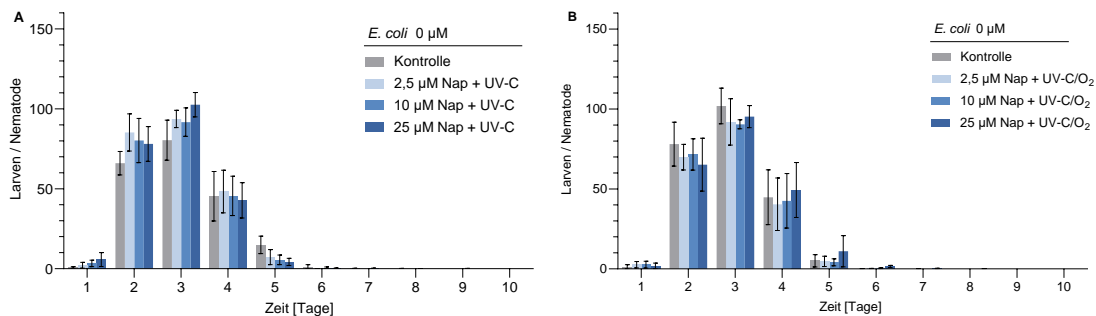


Abb. 27: Anzahl an Nachkommen pro Nematode und Tag nach Inkubation mit Naproxen in NGM_K nach zehnminütiger UV-C Bestrahlung bei 125 W/m² (A) und bei 48,4 W/m² unter Sauerstoffzufuhr (B).

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 μM; 2,5 μM; 10 μM; 25 μM) behandelter Naproxen-Lösung bei 20°C inkubiert und täglich in neue Kulturschalen umgesetzt. Die abgelegten Embryonen wurden bebrütet und ausgezählt. Gezeigt ist die gemittelte Nachkommenanzahl/Nematode und Tag mit SD (N=3, n=10).

Die Beobachtungen zur Exposition mit den beiden Störgrößen in NGM_K ließ zwei Trends substanzübergreifend erkennen. An Tag 2 und Tag 3 reduzierte sich die Anzahl der geschlüpften Nachkommen pro Nematode mit steigender Konzentration der jeweiligen Störgröße (Abb. 28). An Tag 4 und Tag 5 war ein inverser Effekt für NH₄ und kein dosisabhängiger Unterschied für NO₃ sichtbar. Wie bereits erwähnt zeigten die mit NH₄

und NO_3 exponierten Nematoden eine leicht erhöhte Nachkommenanzahl, welche hier nochmals erkennbar wird (Abb. 23).

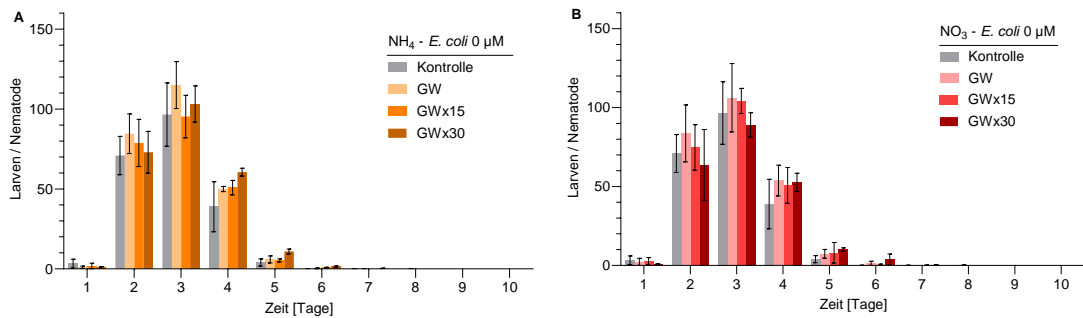


Abb. 28: Anzahl an Nachkommen pro Nematode und Tag nach Inkubation mit Ammonium (A) und Nitrat (B).

Alterssynchrone L4-Larven wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0 µM; 2,5 µM; 10 µM; 25 µM) behandelter Naproxen-Lösung (Grenzwert (GW) - $\text{NH}_4=0,715$ mM, $\text{NO}_3=1,43$ mM, sowie den 15- und 30-fachen GW) bei 20°C inkubiert und täglich in neue Kulturschalen umgesetzt. Die abgelegten Embryonen wurden bebrütet und ausgezählt. Gezeigt ist die gemittelte Nachkommenanzahl/Nematode und Tag mit SD (N=3, n=10).

4.4 Abbau von Ibuprofen und Naproxen mittels UV-C Bestrahlung

Die Untersuchungen zum Abbau von Ibuprofen und Naproxen in wässriger Lösung durch UV-C Strahlung wurden von der GMBU e.V. mit Hilfe eines analytischen Verfahrens durchgeführt. Die Rohdaten aus der Messung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung wurden zur weiteren Auswertung an das Institut für Umwelttoxikologie übermittelt.

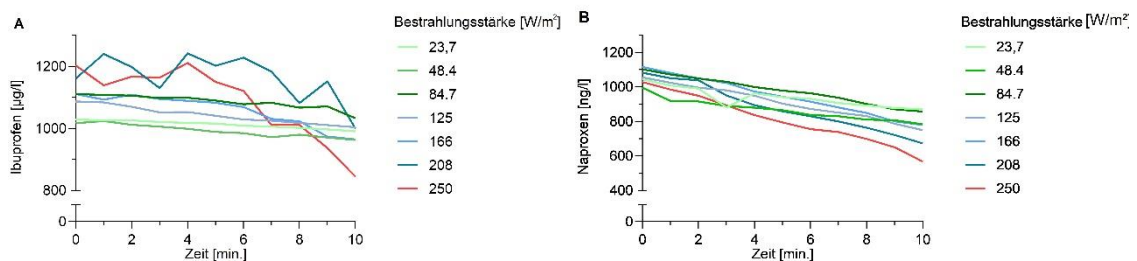


Abb. 29: Abbau von Ibuprofen (A) und Naproxen (B) nach zehnminütiger Behandlung mit UV-C Strahlung ohne Sauerstoffeintrag.

Die Ibuprofen- und Naproxen-Lösungen wurden von der GMBU e.V. mit UV-C Strahlung unterschiedlicher Bestrahlungsstärke (23,7; 48,4; 84,7; 125; 166; 208 und 250 W/m^2) ohne Sauerstoffeintrag für 10 min behandelt. Zur Beobachtung des Abbaus von Ibuprofen und Naproxen erfolgte minütlich eine Bestimmung der Konzentration in der Lösung.

Der Abbau von Ibuprofen in wässriger Lösung nach einer zehnminütigen Behandlung mit UV-C Strahlung ohne Sauerstoffeintrag (Abb. 29 A) sowie des Wirkstoffes Naproxen (Abb. 29 B) unterschied sich bei nahezu allen Bestrahlungsstärken kaum zum Ausgangswert, am Zeitpunkt 0 min. Lediglich die Untersuchungen bei den beiden höchsten Bestrahlungsstärken 208 und 250 W/m^2 zeigten nach ca. 10 min eine

sichtbare Reduktion der Ibuprofen-Konzentration mit Abbauraten von 13,9 % und 29,8 %, für Naproxen mit Abbauraten von 37,8 % und 44,7 % auf. Aufgrund der Kostenintensität durch eine Bestrahlung mit 208 und 250 W/m² wurde sich für die toxikologischen Untersuchungen auf eine geringere Bestrahlungsstärke mit annehmbaren Abbauraten gestützt. Hierzu wurde die Abbaurate nach der Hälfte der Bestrahlungsdauer betrachtet, wobei der Einsatz von 125 W/m² die besten Abbauraten erzielte. Die Experimente zur toxikologischen Untersuchung der Effekte von UV-C behandelten Arzneimittellösungen ohne Sauerstoffzufuhr, wurden daher mit einer Bestrahlungsstärke von 125 W/m² durchgeführt.

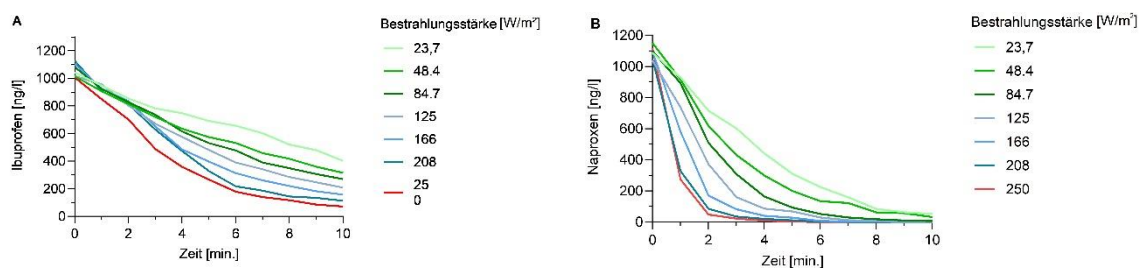


Abb. 30: Abbau von Ibuprofen (A) und Naproxen (B) nach Behandlung mit UV-C Strahlung mit Sauerstoffeintrag.

Die Ibuprofen- und Naproxen-Lösungen wurden von der GMBU e.V. mit UV-C Strahlung unterschiedlicher Bestrahlungsstärke (23,7; 48,4; 84,7; 125; 166; 208 und 250 W/m²) mit Sauerstoffeintrag für 10 min behandelt. Zur Beobachtung des Abbaus von Ibuprofen und Naproxen erfolgte minütlich eine Bestimmung der Konzentration in der Lösung.

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurde während der zehnmütigen UV-C Behandlung der Arzneimittellösungen Sauerstoff zugeführt. Durch die UV-C Strahlung mit Eintrag von Sauerstoff ließ sich der Gehalt an Ibuprofen (Abb. 30 A) deutlich reduzieren. Je höher die Bestrahlungsstärke, desto höher sind die Abbauraten nach zehnmütiger Bestrahlungsdauer. Die Abbauraten für Ibuprofen liegen zwischen 61,4 % (23,7 W/m²) und 92,8 % (250 W/m²). Für den Wirkstoff Naproxen zeigten sich mit steigender Bestrahlungsstärke nach 10 min Abbauraten von 95,1 % (23,7 W/m²), 97,2 % (48,4 W/m²) und bis zu 100 % (84,7 bis 250 W/m²) des Wirkstoffes. Da eine Abbaurate von 100 % nicht energieeffizient ist und die Ergebnisse der beiden Wirkstoffe vergleichbar bleiben sollten, wurde somit eine Bestrahlungsstärke von 48,5 W/m² bei gleichzeitigem Eintrag von Sauerstoff für die toxikologischen Untersuchungen festgelegt.

5 Diskussion

Der Eintrag von Arzneimittelwirkstoffen in die Umwelt wurde erstmals in den 1970er Jahren näher untersucht, obgleich Humanarzneimittel bezüglich ihrer Pharmakokinetik und -dynamik zu den im Warmblüter am besten untersuchten und charakterisierten Stoffen zählen (BLAC, 2003; Stock und Reupert, 2006). Die aus einer chronischen Exposition gegenüber geringen Konzentrationen an Arzneimittelwirkstoffen möglichen Wirkungen (Kapitel 1.1 und 1.2) sind ökotoxikologisch weitgehend unerforscht, müssen aber für eine differenzierte Analyse und Risikobewertung untersucht werden. Für die nichtsteroidalen Antiphlogistika Ibuprofen und Naproxen, deren Entwicklung und Einführung in späten 1960er und 1970er Jahren lagen, fehlen Langzeitstudien bzgl. ihrer Umweltfolgewirkungen gänzlich (SRU, 2007; Klauer, 2019). Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen Beitrag zur Schließung dieser Datenlücke. Für die NSAID Ibuprofen und Naproxen ist bisweilen der Wirkmechanismus über die Hemmung der Cyclooxygenasen 1 und 2 im menschlichen Organismus bekannt (Geisslinger *et al.*, 2019). Ob die Wirkstoffe Einflüsse auf andere Mechanismen oder Signalkaskaden besitzen, kann zum derzeitigen wissenschaftlichen Stand nicht vollständig ausgeschlossen werden. Viele Arzneimittelwirkstoffe führten selbst im Menschen zu unvorhersagbaren oder unerwarteten Wirkungen. So zeigte beispielsweise das in den 1950er Jahren vertriebene Hypnotikum, Thalidomid, zunächst eine geringe akute Toxizität und keine Nebenwirkungen im Tierversuch. Da der Wirkstoff neben seiner hypnotischen Wirkung auch gegen die Übelkeit im ersten Trimenon der Schwangerschaft wirkt, wurde es gezielt als Beruhigungs- und Schlafmittel für Schwangere empfohlen. Ende der 1950er Jahren konnten vermehrt Missbildung von Neugeborenen beobachtet werden. Der Zusammenhang zwischen dem Wirkstoff und den Fehlbildungen wurde kurze Zeit später wissenschaftlich belegt und der Wirkstoff Thalidomid wurde im Jahr 1961 vom Markt genommen (Marquardt und Schäfer, 2004; Geisslinger *et al.*, 2019). Daher ist davon auszugehen, dass die beiden untersuchten Wirkstoffe mit spezifischer Wirkung, wie auch Sexualhormone und Antibiotika, weitere Mechanismen in Nichtzielorganismen ansprechen können und stellen ein potenzielles Risiko für die Umwelt dar. Darüber hinaus ist aufgrund der großen Anzahl an unterschiedlichen Spezies in der Umwelt mit wesentlich mehr unerwarteten biologischen Effekten bei den Organismen zu rechnen, sodass nicht nur die vorsehbaren Wirkungen einer Substanz berücksichtigt werden müssen (Daughton und Ternes, 1999; BLAC, 2003). Die Untersuchung möglicher ökotoxikologischer Effekte ist insbesondere „aufgrund der Komplexität natürlicher Ökosysteme, der individuellen Empfindlichkeit verschiedener Spezies und Lebensstadien“ (BLAC, 2003) besonders herausfordernd und vielschichtig. Bei einer vollumfassenden

Umweltprüfung von potentiell umweltrelevanten Substanzen müssen daher stets mehrere Trophiestufen betrachtet werden, um die Komplexität des natürlichen Ökosystems abzubilden. In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wurden daher zwei Trophiestufen, der Modellorganismus *C. elegans* und seine Nahrungsquelle *E. coli*, bei den Untersuchungen zur biologischen Wirkung der Wirkstoffe Ibuprofen und Naproxen beobachtet. Eine adverse Wirkung auf das Wachstum der Population von *E. coli* hätte indirekte Auswirkungen auf den Fadenwurm. Beispielsweise bei einer Nahrungsunterversorgung würden die Larven zunächst in das deutlich widerstandsfähigere Dauerstadium übergehen (Kapitel 1.4), in dem sie mehrere Monate ausharren können. Eine länger anhaltende Nahrungsunterversorgung kann zu einer Reduktion bzw. Verdrängung der Population in ihrem natürlichen Habitat führen. Dies kann wiederum Einfluss auf andere Organismen haben, die in Wechselwirkung (Nahrungsquelle, Symbiose, Parasitismus) mit *C. elegans* zusammenleben. Neben der direkten Wirkung der Arzneimittelwirkstoffe auf *E. coli* sollte eine Vorkonditionierung die bessere Aufnahme der Wirkstoffe in den Wurm ermöglichen. Das Bakterium könnte die Substanzen über Endozytose aufnehmen und im Anschluss metabolisieren, abbauen oder im Zytosol anreichern. Der Nematode ist somit über die Exposition im Nährmedium NGM_k hinaus, auch über sein Futter gegenüber den untersuchten Substanzen bzw. möglichen Metaboliten exponiert, was eine Annäherung an eine Exposition in der Umwelt darstellt.

In der ersten Phase der toxikologischen Untersuchungen wurde die akute Toxizität der verschiedenen Testsubstanzen nach 24- und 48-stündiger Exposition ermittelt. Für keine der untersuchten Expositionsszenarien konnte eine eindeutige akut toxische Wirkung beobachtet werden. Wenige tote Nematoden konnten nach 48 h in den Expositionsgruppen *E. coli* 0 µM NGM_k 25 µM Naproxen (Abb. 6 A) beobachtet werden, wohingegen in den vorkonditionierten Gruppen *E. coli* 2,5 µM und 10 µM Naproxen (Abb. 6 B, C) mit gleicher Konzentration im Medium keine Effekte erkennbar waren. Betrachtet man die Vorkonditionierung der *E. coli*, so besitzt diese keinen Einfluss auf die akut toxischen Wirkungen auf den Modellorganismus. Auffällig zeigte sich, dass die wenigen als „tot“ kategorisierten Würmer nahezu ausschließlich in den Expositionsgruppen mit der höchsten Wirkstoffkonzentration von 25 µM Ibuprofen oder Naproxen im Medium auftraten. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Modellorganismus die Wirkstoffe über die Umgebung oder die Nahrungsquelle aufnimmt, die verwendeten Konzentrationen jedoch nicht ausreichend hoch sind, um bei *C. elegans* akut letale Effekte hervorzurufen. Daher sind Untersuchungen zur chronischen und reproduktionstoxischen Wirkung der Testsubstanzen erforderlich gewesen, um sensitivere Endpunkte,

wie Effekte auf das Wachstum, das Bewegungsverhalten und die Nachkommenschaft, der Nematoden zu prüfen.

Grundsätzlich kann die Alterung und die damit verbundene Lebensdauer von *C. elegans* über verschiedene Stoffwechselwege beeinflusst werden. Die Lebensdauer von *C. elegans* unterliegt der Regulierung durch mehrere Signalwege und Transkriptionsfaktoren, welche durch die Induktion von Stress und die Nährstoffverfügbarkeit moduliert werden können (Vijg und Campisi, 2008; Kenyon, 2010). Hierbei gehören die Hemmung der insulinähnlichen Signalübertragung und Störung des mitochondrialen Stoffwechsels zu den am besten untersuchten Signalkaskaden, die die Lebensspanne der Nematode beeinflussen (Lakowski und Hekimi, 1996; Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Kenyon, 2010). DAF-16 ist ein Transkriptionsfaktor der Nematode *C. elegans* (Homolog im Säuger: *Forkhead-Box-Protein* O3), der für lebensverlängernde Effekte über den insulinähnlichen Signalweg benötigt wird (Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Kenyon, 2010). Es ist denkbar, dass die beiden untersuchten Wirkstoffe und Störgrößen diese Stoffwechselwege modulieren und somit zu einer Verkürzung oder Ausdehnung der Lebenszeit des Modellorganismus führen können. Eine Vielzahl an Wirkstoffen und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen greifen nachweislich in diesen Signalweg ein, was im Falle des Wurzelextraktes von *Scutellaria baicalensis* zu einer deutlichen Erhöhung der Lebensspanne führt (Havermann *et al.*, 2016). Ching *et al.* (2011) konnten zeigen, dass Celecoxib, ein selektiver COX-2 Hemmer, die Lebensdauer von *C. elegans* verlängert und altersbedingte physiologische Veränderungen, wie den Rückgang der motorischen Aktivität verzögert. Weiterhin verzögerte Celecoxib das Fortschreiten der altersbedingten Proteotoxizität sowie das Tumorwachstum in der Nematode. Die lebensverlängernden Effekte wurden unabhängig von der COX-2-Hemmaktivität des Wirkstoffes beobachtet und ließen sich auf eine direkte Wirkung auf die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1, einem Bestandteil der insulinähnlichen Signalkaskade zur Verlängerung der Lebenszeit, zurückführen (Ching *et al.*, 2011). Es ist denkbar, dass Substanzen mit ähnlicher Struktur oder Wirkweise, ähnliche Effekte beim gleichen Modellorganismus hervorrufen. Für die Identifizierung des genauen Wirkmechanismus der Wirkstoffe sind daher vertiefende Untersuchungen mit transgenen Nematoden dieser wissenschaftlichen Arbeit anzuschließen.

Aus der chronischen Exposition gegenüber den verschiedenen Testsubstanzen resultierten unterschiedliche Ergebnisse auf die Lebensspanne des Modellorganismus *C. elegans*. Für alle Expositionsgruppen bis auf die Expositionsgruppe *E. coli* 0 μM NGM_K 25 μM Naproxen (Abb. 11 A) konnten Plateauphasen in den ersten vierzehn Tagen der Überlebenszeitkurven beobachtet werden, woraus mediane Lebenszeitspannen von 14 bis maximal 26 Tagen resultieren. Indessen wies die Expositionsgruppe

E. coli 0 μM NGM_K 25 μM Naproxen lediglich eine mediane Lebenszeitspanne von 6 Tagen auf. Dies zeigte eine deutliche Reduktion der medianen Lebensspanne auf nur noch 25 % (95 % KI; 0,14-0,45) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 10) auf. Daraus lässt sich schließen, dass die Exposition der Nematoden gegenüber mit Naproxen vorkonditionierten *E. coli* einen protektiven Effekt in der Hochdosisgruppe besitzt.

Für den Arzneimittelwirkstoff Ibuprofen konnte eine deutliche Abweichung ($p=0,015$) zwischen der Kaplan-Meier-Kurve der Dosisgruppe *E. coli* 10 μM und NGM_K 25 μM Ibuprofen und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die beobachtete Abweichung ist auf den schnellen Abfall der Überlebenskurve der Dosisgruppe innerhalb der ersten Tage zurückzuführen. Die medianen Lebensspannen der beiden Expositionsgruppen deuten hingegen auf keinen bedeutsamen Unterschied der beiden Gruppen hin. Eine Reduktion der Population in den ersten Tagen, kann jedoch einen enormen Einfluss auf die Anzahl der Nachkommen besitzen, da zu dieser Zeit die Eiablage rate der Nematoden in der reproduktiven Phase am höchsten ist. Dies schwächt die Population im Wachstum und Konkurrenzkampf um ökologische Nischen mit anderen Organismen. Einen Einfluss auf die Anzahl der Nachkommen, konnte für die Dosisgruppe *E. coli* 10 μM und NGM_K 25 μM Ibuprofen nicht beobachtet. Wiederum zeigten die maximalen Dosisgruppen mit *E. coli* 2,5 μM bzw. 25 μM Ibuprofen (Tab. 8) sogar eine Zunahme der medianen Lebensspanne gegenüber der Kontrolle von 11 % (95 % KI; 0,61-2,01) und 24 % (95 % KI; 0,62-2,47), was eher einen entgegengesetzten lebensverlängernden Effekt von Ibuprofen auf *C. elegans* vermuten lässt. Demnach lässt sich kein eindeutiger Effekt von Ibuprofen bei chronischer Exposition am Testorganismus bestimmen. Andererseits lassen sich bei den Untersuchungen mit dem Wirkstoff Naproxen dosisabhängige Unterschiede der Kaplan-Meier-Kurven für alle Expositionsgruppen *E. coli* 0 μM Naproxen zur Gruppenkontrolle beschreiben. Je höher die Wirkstoffkonzentration im Medium, desto größer war die Abweichung der Überlebenskurve zur Kontrolle. Für die Konzentrationen von 2,5 μM ($p=0,074$) und 10 μM ($p=0,04$) Naproxen konnte eine deutliche Abweichung, für die höchste Dosis von 25 μM ($p=0,00008$) sogar eine äußerst deutliche Abweichung beschrieben werden. Die Expositionsgruppen mit *E. coli* 2,5 μM und NGM_K 25 μM ($p=0,044$), sowie *E. coli* 25 μM und NGM_K 10 μM ($p=0,034$) bzw. 25 μM ($p=0,012$) Naproxen zeigten deutliche Unterschiede der Kaplan-Meier-Graphen zur jeweiligen Kontrollgruppe. Bei der Betrachtung der medianen Lebensspannen, weisen lediglich die Expositionsgruppen mit unkonditionierten *E. coli* eine deutliche Reduktion von 37-75 % (95 % KI, 0,35-1,13 und 0,14-0,45) zur jeweiligen Kontrolle auf. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Vorkonditionierung der Bakterien mit Naproxen protektiv auf den Modellorganismus *C. elegans* wirkt, da die durch im NGM_K induzierte dosisabhängige chronische Toxizität von Naproxen

abgeschwächt wird. Dies wird aus den verbesserten Verhältnissen der medianen Lebensspannen zur Kontrolle (Tab. 10) ersichtlich.

Für die mit UV-C Strahlung behandelten Proben zeigten sich sowohl für Ibuprofen als auch Naproxen keine chronischen Effekte auf die Nematoden. Diese Beobachtung stellt sich besonders positiv für den Wirkstoff Naproxen dar, welcher in den Untersuchungen zur Lebensspanne (Abb. 11 A) eindeutige toxische Effekte aufwies, diese jedoch nach einer UV-C Behandlung der Proben bei 125 W/m² für 10 min oder 48,4 W/m² für 10 min mit Sauerstoffzufuhr nicht mehr gezeigt werden konnten.

Die Untersuchungen mit den Störgrößen Ammonium und Nitrat resultierten einzig in der Expositionsgruppe NO₃ GW in einer deutlichen Abweichung (p=0,041) der Überlebenskurve zur Kontrolle, welche mit einer Reduktion der medianen Lebensspanne um 20 % (95 % KI, 0,44-1,46) einherging. Ein derartiger Effekt könnte sich z.B. auf eine Metabolisierung von nicht toxischen bzw. protektiven Substanzen in wirksamen Dosen erst bei höheren Wirkstoffkonzentrationen zurückführen lassen. Bei näherer Betrachtung der Ergebnisse ließen sich in dieser Dosisgruppe deutlich mehr zensierte Nematoden in den ersten Tagen beobachten, die den Verlauf der Kaplan-Meier-Kurve maßgeblich beeinflusst haben, da die Grundgesamtheit der Nematoden hierdurch sank. Je kleiner die Grundgesamtheit der Nematoden, desto stärker fällt die Überlebenskurve beim Ausscheiden eines toten Wurms ab, wodurch die deutliche Abweichung zur Kontrollgruppe resultierte. Ein toxisches Verhalten von NO₃ auf die Lebensspanne von *C. elegans* ist für den Konzentrationsbereich des gesetzlichen Grenzwertes für NO₃ im Ablaufwasser von Kläranlagen der GK5 von 20 mg/l NO₃-N auszuschließen.

Für eine weitere Bewertung der chronischen Toxizität wurde eine Einteilung der Beweglichkeit von *C. elegans* nach Tab. 7 (siehe 3.2.8 Lokomotionstest) mittels TPM-Methode vorgenommen. Bei dem Bewegungsreiz durch Berührung handelt es sich um eine Signalweiterleitung über Mechano-, Inter- und Motoneuronen, die den Reiz in eine Kontraktion umwandeln (Goodman und Sengupta, 2019). Hierdurch lassen sich Effekte auf die neuronale Reizweiterleitung im Wurm erkennen. Für beide Wirkstoffe ließ sich in der Expositionsgruppe *E. coli* 0 µM lediglich an Tag 14 eine dosisabhängige Reduktion der Motilität (Abb. 14 A, Abb. 16 A) feststellen. In der Kontrollgruppe der bestrahlten Ibuprofen-Probe unter Sauerstoffzufuhr konnte ein erhöhter Anteil an Nematoden der Kategorie C an Tag 14 festgestellt werden. Die Dosisgruppen bei einer Exposition mit der behandelten Naproxen-Probe unter Sauerstoffzufuhr zeigten an Tag 14 eine verminderte Zuordnung von Nematoden in die Kategorie C im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abb. 17 B). Des Weiteren konnte für *E. coli* 0 µM und NGM_K 25 µM Naproxen an Tag 4 eine erhöhte Anzahl an Würmern der Kategorie C beobachtet werden. Die beiden Störgrößen Ammonium und Nitrat wiesen keine Auffälligkeiten bei der

Kategorisierung der Motilität der Nematoden gegenüber der Kontrollgruppe auf. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Beweglichkeit der Nematoden mit zunehmendem Lebensalter abnahm. Dies erkennt man am sinkenden Anteil in Kategorie A eingeordnete Nematoden und dem Anstieg der Kategorien C und D über den Expositionszeitraum. Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse scheint es in manchen Fällen zu einer Verbesserung der Motilität gekommen zu sein, da an einem nachfolgenden Beobachtungszeitpunkt die Anzahl der Würmer in Kategorie A größer geworden ist. Dieses Ergebnis ist der mikroskopischen Beobachtung der Nematoden und Zuordnung in die unterschiedlichen Kategorien auf Grundlage ihres Bewegungsmusters geschuldet, die Ungenauigkeiten beinhalten kann. Einzelne Nematoden aus Kategorien geringerer Lokomotion können daher an folgenden Tagen wieder in eine Kategorie mit höherer Beweglichkeit eingruppiert worden sein. Für die exakte Umsetzung dieser Methode ist geschultes Personal zwingend notwendig, um die Ungenauigkeiten bei einer mikroskopischen Untersuchung mittels TPM-Methode weitgehend zu vermeiden und eine möglichst objektive Bewertung der Beweglichkeit zu erhalten. Die beobachtete Variabilität in der Beweglichkeit des Modellorganismus *C. elegans* könnte durch den Medienwechsel, den damit verbundenen Konzentrationschwankungen der Wirkstoffe, des Futters und der möglicherweise entstandenen Metabolite in NGM_K, sowie den mechanischen Reizen beim Umsetzen verursacht bzw. beeinflusst worden sein. Die Durchführung dieser Methode birgt ein gewisses Maß an Unsicherheiten, weshalb eine genaue Zuordnung der Effekte erschwert wird. Zusammenfassend lassen sich für die verschiedenen Testsubstanzen daher keine eindeutigen und konsistenten Effekte auf das Bewegungsmuster der Nematoden über den Beobachtungszeitraum von 21 Tage beschreiben.

Einige Humanarzneimittel besitzen eine gewünschte (Kontrazeptiva) oder eine unerwünschte Wirkung auf die Fortpflanzung des Menschen und können womöglich auch einen Einfluss auf die Reproduktion von Nichtzielorganismen aufweisen. Fruchtbarkeits-schädigende Effekte am Menschen zeigen beispielsweise die Zytostatika Methotrexat, welches in niedrigerer Dosierung bei rheumatoider Arthritis eingesetzt wird, oder Etoposid (Marquardt und Schäfer, 2004; Geisslinger *et al.*, 2019). Lee und Kang (2017) beobachteten, dass die Exposition von *C. elegans* mit Etoposid während der frühen Wachstumsphase ausreichte, um eine Schädigung der Fortpflanzungsorgane herbeizuführen. Die Schädigung resultierte in einer erkennbaren Reduktion der Nachkommenanzahl (Lee und Kang, 2017). Reproduktionstoxische Substanzen können neben einer völligen Unfruchtbarkeit, auch eine Einschränkung der Sexualfunktionen hervorrufen oder die embryonale Entwicklung dauerhaft beeinflussen. Dies kann sich in einer Verringerung der Gesamtanzahl an Nachkommen oder einer Fehlbildung,

Wachstumsstörung und sogar im Tod der Nachkommen von *C. elegans* äußern (Marquardt und Schäfer, 2004). Bei den Untersuchungen der verschiedenen Wirkstoffe auf die Reproduktion von *C. elegans* konnten Effekte beschrieben werden, die sich in einer unterschiedlichen Nachkommenanzahl darstellen ließen. Die relative Anzahl an Nachkommen/Nematode der Expositionsgruppen *E. coli* 10 µM und NGM_K 25 µM Ibuprofen (Abb. 19 C), NH₄ GW bzw. GWx15 und NO₃ GW (Abb. 23) waren leicht erhöht, die der Dosisgruppe *E. coli* 0 µM und NGM_K 25 µM Naproxen (Abb. 21 A) verringert gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Die deutliche erkennbare Reduktion der relativen Anzahl an Nachkommen/Nematode in der Expositionsgruppe *E. coli* 0 µM und NGM_K 25 µM Naproxen ist auf den starken Abfall der Überlebensrate (Abb. 11 A) innerhalb der reproduktiven Phase zurückzuführen. Die reproduktive Phase der Nematoden, die ca. zwei bis drei Tage nach Erreichen der Geschlechtsreife vorliegt, zeigte sich zwischen den Beobachtungstagen 2 und 4 (Corsi *et al.*, 2015). Ein Anstieg der Nachkommenanzahl kann genauso schädigend auf die Population und die Umwelt einwirken, wie eine Abnahme der Nachkommen, da sich hierdurch ein Nährstoffmangel einstellen könnte und die Nematoden in das widerstandsfähigere Dauerstadium übergehen würden, um sich vor einer Überpopulation zu schützen. Die Ergebnisse zur relativen Anzahl an Nachkommen/Nematode sollten mit Vorsicht bewertet werden, da dieser Wert durch die Anzahl an zensierten Nematoden verzerrt werden kann. Demnach kann eine Nematode die gesamte reproduktive Phase durchlaufen haben, wird jedoch zu einem späteren Zeitpunkt zensiert. Hierdurch würde die relative Anzahl an Nachkommen/Nematode ansteigen. Hingegen bei der Betrachtung einer taggenauen Aufschlüsselung der Nachkommen/Nematode lassen sich differenziertere Aussagen treffen, da Änderungen in der Zeitspanne der Eiablage beobachtet werden können. Demnach zeigte sich bei der Expositionsgruppe *E. coli* 0 µM und NGM_K 25 µM Naproxen (Abb. 26 A) eine leichte Verlagerung des Zeitraumes der Eiablage beim Modellorganismus *C. elegans* um ein bis zwei Tage. An Tag 6 kann für diese Dosisgruppe eine erkennbare Anzahl von ca. 10 Larven/Nematode im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Teilweise zeigt die Exposition mit NGM_K 25 µM Ibuprofen bzw. Naproxen vereinzelt Nachkommen nach sechs Tagen auf. Des Weiteren wiesen die Nematoden in nahezu allen Dosisgruppen NH₄ und NO₃ an allen Tagen mehr Nachkommen/Nematode auf. An Tag 4 und 5 zeigte die Dosisgruppen NH₄ bzw. NO₃ GWx30 die höchste Nachkommenanzahl/Nematode, wohingegen die Kontrolle das niedrigste Verhältnis vorwies. Die Eiablage kann durch eine Reihe von weiteren Umweltbedingungen negativ beeinflusst werden. Eine mechanische Stimulation der sensorischen Rezeptoren ALM und PLM, durch eine anhaltende Vibration des Kulturmediums, oder hypertone Salzlösungen können die Eiablage hemmen (Sawin, 1996; Schafer, 2005). Darüber

hinaus zeigen Nematoden in Gegenwart von reichlich Futter eine deutlich höhere Eiablage rate gegenüber Individuen die in Abwesenheit von Futter gehalten wurden (Schafer, 2005). Möglicherweise zeigt ein Überschuss an Stickstoff im Medium einen ähnlich positiven Effekt auf die Reproduktion der Nematode, wie die Gegenwart von ausreichend Futter, da Stickstoff zum Aufbau zellulärer Strukturen, z.B. Proteine oder Desoxyribonukleinsäure, benötigt wird (UBA, 2011). Abschließend ließen sich zwei verschiedene Muster der Eiablage erkennen. Die meisten Expositionsgruppen zeigten eine Eiablage innerhalb von fünf Tagen auf, dessen Verlauf am ehesten einer Parabel ähnelt, mit dem Scheitelpunkt am dritten Tag. Einzig die Expositionsgruppen *E. coli* 0 µM und NGM_k 10 µM bzw. 25 µM Naproxen, sowie die Dosisgruppe NGM_k 2,5 µM Ibuprofen behandelt mit UV-C Strahlung unter Sauerstoff ließen eine maximale Nachkommenanzahl/Nematode an Tag 2 erkennen. Danach fiel die relative Anzahl an Nachkommen/Nematode bis zum Tag 5 bzw. 6 ab. Ein eindeutiger Effekt auf die Anzahl der Nachkommen/Nematode konnte sich nur in der Expositionsgruppe *E. coli* 0 µM und NGM_k 25 µM Naproxen feststellen lassen.

Die wissenschaftlichen Ergebnisse dieser Arbeit beleuchten die biologischen Effekte von den Einzelsubstanzen Ibuprofen, Naproxen und deren Abbauprodukte nach UV-C Behandlung mit und ohne Sauerstoffzufuhr, sowie von Ammonium und Nitrat auf den Modellorganismus *C. elegans* und seine Nahrungsquelle *E. coli*. In der aquatischen Umwelt bzw. im Abwasser liegen diese Substanzen mit weitaus mehr Stoffen in einer sogenannten Mischexposition vor. Wie Cleuvers (2004) zeigte, ließen sich in Versuchen mit einer Mischexposition aus Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen und Acetylsalicylsäure deutlich stärkere Effekte erkennen, als in den Untersuchungen der Einzelsubstanzen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass diese Wirkstoffe mit ähnlichem Wirkmechanismus eine additive bzw. teilweise synergistische Wirkung aufweisen können. Die vorliegenden toxikologischen Ergebnisse, der Einzelsubstanzen Ibuprofen und Naproxen, unterschreiten aller Voraussicht nach in Mischexposition den tatsächlichen Effekten in der Umwelt. Zugleich können weitere Substanzen einen positiven oder negativen Einfluss auf die Umweltwirkung der Wirkstoffe besitzen, indem sie beispielsweise die Absorption, den Metabolismus zu toxikologisch relevanten oder weniger relevanten Verbindungen oder die Exkretion modulieren. Ein klassisches Beispiel für eine Wechselwirkung mit einem Arzneimittelwirkstoff in der Humanmedizin stellt der in der Grapefruit enthaltene sekundäre Pflanzeninhaltsstoff Furanocumarine dar. Diese Substanz steigert die Bioverfügbarkeit von CYP3A4-Substraten, wie z.B. Verapamil oder Simvastatin, und führt somit zu einer Überdosierung des Wirkstoffes im menschlichen Organismus, welche mit teilweise starken Nebenwirkungen verbunden ist

(Geisslinger *et al.*, 2019). Daher sind ebenfalls weiterführende Untersuchungen zu den Umweltwirkungen von Mischexpositionen und Wechselwirkungen zwischen Arzneimittelwirkstoffen und anderen Störgrößen in Realwässern auf *C. elegans* vorzunehmen.

Neben einer Interaktion verschiedener Substanzen untereinander, welche ihre Wirkung gegenseitig verstärken oder hemmen können und dadurch advers auf den Testorganismus einwirken, ist auch der allgemeine (Vitalitäts-)Zustand des Organismus von besonderer Bedeutung. Kümmerer (2010) beschreibt in seinen Untersuchungen, dass ein vorbelasteter Organismus eher zu einer negativen Wirkung im Expositionsszenario tendiert. Als vorbelastet zählen z.B. Individuen die eine genetische Fehlveranlagung eines Gens besitzen, welches ein Enzym zum Abbau der Substanz exprimiert oder deren Gewebe in ihrer Funktion geschädigt sind. Die beiden Störgrößen NH_4 und NO_3 üben bei einem zu hohen Eintrag in die Umwelt einen großen Selektionsdruck auf viele Pflanzen- und Tierarten aus, können zur Eutrophierung der Gewässer und somit auch zu einer Vorbelastung von Organismen und der Reduktion der biologischen Vielfalt führen (DUH, 2017). Die toxikologischen Untersuchungen mit den Störgrößen NH_4 und NO_3 zeigten keine Effekte am Modellorganismus *C. elegans* auf. Basierend auf den Untersuchungen unter Laborbedingungen könnte die Nematode daher für Feldstudien oder zur Entwicklung eines Reporterorganismus in der Abwasserreinigung genutzt werden. *C. elegans* wurde bereits zur Bewertung der Wasserqualität in den 70er Jahren genutzt (Zullini, 1976). Hierbei verglich Zullini (1976) die chemisch-physikalischen Wasserparameter mit dem Vorkommen, sowie der Spezieszusammensetzung der Nematoden. Eine toxikologische Begutachtung des Modellorganismus fehlte allerdings gänzlich.

Trotz multipler Unsicherheiten, aufgrund der Vielschichtigkeit der zu betrachtenden Ökosysteme, können mithilfe der toxikologischen Untersuchungen der Einzelsubstanzen wichtige Entscheidungswerte erhoben und aufgestellt werden, die unter Einbeziehung von Abstandsfaktoren, zur einer vollständigen Umweltrisikobewertung einer Substanz herangezogen werden. Die verwendeten Konzentrationen der beiden NSAID orientierten sich an ihrer Löslichkeit in wässriger Lösung und den Nachweisen in Wasser. Die niedrigste untersuchte Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ Ibuprofen liegt 23-fach über der gemessenen Spitzenkonzentration im Kläranlagenzulauf von $22,8 \mu\text{g/l}$ Ibuprofen in der Abwasserbehandlungsanlage Freyburg 2002-2004 (LAU, 2006). Aus den Laboruntersuchungen zur chronischen und reproduktiven Toxizität (Kapitel 4.2 und 4.3) lassen sich für den Modellorganismus *C. elegans* eine NOEC von $2,3 \text{ mg/l}$ ($10 \mu\text{M}$) für Ibuprofen und von $0,58 \text{ mg/l}$ ($2,5 \mu\text{M}$) für Naproxen in NGM_k ableiten. Mit den beobachteten NOEC und

einem maximalen Unsicherheitsfaktor von 1.000 können PNEC-Werte von 2,3 µg/l für Ibuprofen und 0,58 µg/l für Naproxen berechnen werden. Da der Modellorganismus *C. elegans* nicht in den Leitlinien für die aquatische Risikoabschätzung als Testorganismus enthalten ist, wurde der maximale Abstandsfaktor für die PNEC-Bestimmung verwendet. Vergleicht man diese Werte erneut mit den gemessenen Umweltkonzentrationen (Kapitel 1.2.1 und 1.3), sind teilweise höhere Konzentrationen der beiden Wirkstoffe in der Umwelt beobachtet worden. Die Ergebnisse geben allen Anlass Minimierungsmaßnahmen zu entwickeln, um mit Nachdruck den Eintrag von Arzneimittelrückständen in die Umwelt zu minimieren. Aufgrund der hohen Artenvielfalt und der unterschiedlichen Sensitivität verschiedener Spezies, können andere Organismen eine höhere oder geringere Toxizität für die untersuchten Substanzen aufweisen. Für die Umweltrisikobewertung müssen daher immer Organismen aus drei verschiedenen Trophiestufen betrachtet werden, sodass noch weitere Langzeituntersuchungen mit weiteren Testorganismen aus der Ökotoxikologie, wie z.B. *Daphnia magna* oder *Danio rerio* durchgeführt werden sollten, um eine abschließende Bewertung vornehmen zu können. Anhand der vorliegenden Ergebnisse zeigt sich der Testorganismus *C. elegans* als nützlich für das Screening und die Bewertung umweltrelevanter Substanzen in wässrigen Lösungen. Der Bedarf an kostengünstigen, schnelleren und aussagekräftigen Toxizitätstest nimmt stetig zu, sodass der Modellorganismus *C. elegans* bei der Entwicklung künftiger neuartiger Assays und Bewertungsmethoden in der Umweltrisikobewertung einen wichtigen Beitrag leisten kann (Hunt, 2017).

Die Ergebnisse sollten Anlass geben den Eintrag von Arzneimittelwirkstoffen in unsere Umwelt zu reduzieren. Allerdings kann die Reduktion des Eintrages von Arzneimittelwirkstoffen zu dem Zielkonflikt zweier Schutzgüter führen. Zum einen der Schutz der menschlichen Gesundheit und zum anderen der Schutz der Umwelt und des Trinkwassers. Bei genauerer Betrachtung sind diese beiden Schutzgüter sehr eng miteinander verknüpft, da der Schutz unserer Umwelt und des Trinkwassers unmittelbar der menschlichen Gesundheit zugutekommt. Daher ist es von großem Interesse Lösungsansätze zu finden, die alle schützenswerte Interessen berücksichtigen. Solange eine große wissenschaftliche Datenlücke in Hinsicht der Umweltfolgewirkungen diverser Arzneimittelwirkstoffe besteht, greift das Vorsorgeprinzip im deutschen bzw. europäischen Arzneimittel- und Umweltrecht. Das Vorsorgeprinzip soll Belastungen für die Umwelt, bei mangelnder wissenschaftlicher Datenlage über das Umweltrisiko einer Substanz, durch frühzeitiges und vorausschauendes Handeln vermeiden (Klauer, 2019). Um die Unsicherheiten im Umgang mit Arzneimittelrückständen zu minimieren, sind stets neue Erkenntnisse über die Auswirkungen von verschiedenen pharmazeutischen

Wirkstoffen unabdingbar. Neben der Erhebung neuer Daten zur Umweltfolgewirkung müssen auch neue Strategien zur Minimierung von Arzneimittelrückständen entwickelt und umgesetzt werden. Hierzu lassen sich unterschiedliche Ansätze verfolgen, die jedoch nur in ihrer Gesamtheit zur Reduktion der Einträge von Arzneimittelwirkstoffen in die Umwelt beitragen können. Zunächst lassen sich quellenorientierte Maßnahmen anstreben, die den Einsatz reduzieren oder einen umweltschonenden Umgang mit den Wirkstoffen erzielen sollen. Hierunter würden beispielsweise Anwendungsbeschränkungen zählen, die durch gezielte Indikation der Arzneimittel oder eine Verschreibungspflicht der Wirkstoffe Ibuprofen und Naproxen durchgesetzt werden könnte. Dies könnte zu einem bewussteren Umgang mit den beiden Schmerzmitteln führen. Die Anwendungsgebiete der Wirkstoffe liegen besonders in der symptomatischen Behandlung von bei alltäglichen leichten bis mittleren Schmerzen, wie z.B. Kopf- und Menstruationsschmerzen, was folglich zu einer Substitution mit anderen freiverkäuflichen Schmerzmitteln führen würde, die wiederum selbst eine potentiell umweltschädigende Wirkung besitzen. Demnach wäre es ratsamer die Entwicklung umweltverträglicher Wirkstoffe voranzutreiben, als Beschränkungen und Verbote zu verhängen. Auch ist die Aufklärung der Bevölkerung über einen bewussten Umgang mit Arzneimittelwirkstoffen und deren sachgemäße und bundesweit einheitliche Entsorgung wichtig. Ferner kann auch die Verbesserung der allgemeinen Gesundheit einer Bevölkerung durch z.B. eine gute Gesundheitsvorsorge, ausreichende Bewegung und eine ausgewogene Ernährung als mögliche Maßnahme zur Verringerung des Arzneimittelintrages gesehen werden, da diese Erkrankungen, wie z.B. Arthrose, vorbeugen können und somit auch die damit verbundene Einnahme von NSAID (Salomon, 2005). Aufgrund seiner etablierten Anwendungen von NSAID in den vielfältigen Bereichen der heutigen medizinischen Versorgung, lässt sich deren Eintrag nicht verhindern, jedoch müssen gerade deshalb zusätzliche Maßnahmen zur Entfernung dieser Arzneimittelrückstände in der Umwelt ergriffen werden. Zu diesen dezentralen Maßnahmen zählen die Separation der Substanzen am Entstehungsort inkl. deren sachgerechte Entsorgung, eine umweltschonende Landwirtschaft, sowie die Vorbehandlung von hochbelasteten Abwässern vor der Einleitung in das kommunale Abwassersystem. Da der Anteil an Arzneimittelrückständen, der aus Krankenhausabwässern in das kommunale Abwasser eingeleitet wird wesentlich höher ist, wäre eine Vorbehandlung dieser Abwässer sinnvoll (Klauer *et al.*, 2019). Die Wirkstoffkonzentrationen der Krankenhausabwässer liegen mit Werten bis zu 150 µg/l deutlich über den Konzentrationen im Kläranlagenzulauf aufgrund des bereits einsetzenden Verdünnungseffektes im kommunalen Abwassersystems (Gómez *et al.*, 2006, Kern und Lorenz, 2008). Des Weiteren lassen sich in den Krankenhausabwässern eine Vielzahl an Arzneimittelwirkstoffen detektieren, welche vorwiegend

in Krankenhäusern verwendet werden, wie z.B. Röntgenkontrastmittel, welche zur Verbesserung der Darstellung von bildgebenden Verfahren wie Röntgendiagnostik, Magnetresonanztomografie und Sonografie genutzt werden (Geisslinger *et al.*, 2019). Diese Wirkstoffe, mit ebenfalls hoher Persistenz, sollten am bestens direkt am Eintragungsort aus dem Abwasser eliminiert werden bzw. erst gar nicht ins Abwassernetz eingetragen werden, um möglichst wenig Frischwasser zu verunreinigen. Dies könnte in Kliniken z.B. durch das gesonderte Sammeln von Urin und Fäzes der Patienten mit spezieller Arzneimittelanwendung oder durch eine Vorklärung der Krankenhausabwässer vor Einspeisung in das kommunale Abwassersystem umgesetzt werden.

Basierend auf den diversen Messprogrammen des BLAC (2003), Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt (2006, 2010) und UBA (2018, 2020b) sind die derzeitigen Techniken der kommunalen Abwasserreinigung zu überdenken, da viele potentiell umweltbedenkliche Substanzen, in die Umwelt eingetragen werden. Es sind daher größere Anstrengungen notwendig, um den Eintrag zu reduzieren. Hierzu könnte eine weiterführende Abwasserreinigungsstufe in den kommunalen Kläranlagen eingebaut werden, welche die Substanzen nahezu vollständig filtrierte bzw. abbaut. Der Abbau potentiell umweltrelevanter Substanzen durch thermische, enzymatische, biologische oder chemische Prozesse zur Minimierung von Spurenstoffen im Abwasser kann entweder zu einer vollständigen Mineralisierung des Stoffes oder zur Bildung von aktiven und inaktiven Metaboliten führen. Unter den entstandenen Metaboliten können z.T. toxischere Verbindungen vorkommen als es die Muttersubstanz ist (Kümmerer, 2010). So entstehen beispielsweise beim thermischen Abbau von Tetrachlorethen, einem Lösungsmittel, welches in der Textil- und Metallindustrie Anwendung findet, diverse gefährliche Metabolite, darunter Vinylchlorid, ein bekanntes Humankarzinogen (Ruwwe *et al.*, 2005). In der Trinkwasseraufbereitung können Nitrosamine auf unterschiedliche Weise gebildet werden, so z.B. durch die Anwendung von Chloramin-Desinfektionsmitteln, Aktivkohle, sowie bei der Ozonung oder Photolyse (Kumar *et al.*, 2023). Die Stoffklasse der Nitrosamine wurde von der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit als humankarzinogen und genotoxisch eingestuft (Schrenk *et al.*, 2023). Die Verwendung von Aktivkohle oder die Ozonung sind Verfahrenstechniken, welche für die Entwicklung einer vierten Reinigungsstufe zur Diskussion stehen bzw. teilweise bereits zur erweiterten Abwasserbehandlung genutzt werden. Während eine Ozonung den Wirkstoff Diclofenac sehr gut aus dem Abwasser entfernen würde, ist die Abbaurate für Ibuprofen bei einem Einsatz von 10 mg/l Ozon von 62 % nicht zufriedenstellend. Die Nutzung von Aktivkohle ist aufgrund der hohen Abbauraten von mehr als 90 % sehr effektiv, führt aber zu hohen Betriebskosten. Zudem

sind Aktivkohlefilter weder regenerierbar noch nachhaltig (LANUV, 2007). Eine weitere Alternative der Abwasserreinigung stellt die Verrieselung der geklärten Abwässer aus kommunalen Kläranlagen auf landwirtschaftlichen Nutzflächen dar. Auch bei dieser Methode ist keine vollständige Elimination der Spurenstoffe, durch die Sedimentation in den verschiedenen Gesteins- und Erdschichten, gewährleistet. Darüber hinaus könnte diese Anwendung auf lange Sicht zu einer dauerhaften Belastung des natürlichen Grundwassersreservoirs führen. Daher wurde die aus dem Kooperationsprojekt „EphaA“ von der GMBU e.V. entwickelte neuartige, nachhaltige und kostengünstige Filtrationsmethode für wasserlösliche Spurenstoffe auf ihre ökotoxikologische Unbedenklichkeit im Einsatz als vierte Reinigungsstufe in der vorliegenden Arbeit geprüft. Hierzu wurden die Wirkstofflösungen mittels UV-C Strahlung mit und ohne Sauerstoffzufuhr behandelt, da diese von der Membranmatrix SBA-15 nach erfolgreicher Adsorption in der Reinigungsphase wieder abgetrennt werden sollten. Die Beobachtungen zum Abbau der Wirkstoffe Ibuprofen und Naproxen in den beiden Behandlungsszenarien ohne (Abb. 29) und mit Sauerstoffeintrag (Abb. 30) während der UV-C Behandlung zeigten deutlich bessere Abbauraten bei gleicher Bestrahlungsstärke für die Proben unter Sauerstoffeintrag auf. Aus technischer und ökonomischer Sicht sollte daher die Behandlung mit Sauerstoffeintrag bevorzugt werden. Die Bestrahlungsstärke von $48,5 \text{ W/m}^2$ bei gleichzeitigem Eintrag von Sauerstoff wurde als energieeffizientestes Szenario identifiziert. Die Einführung einer derartigen Abwasserbehandlung wäre von der technischen Seite in kommunalen Kläranlagen (Referenzkläranlage Halle-Nord) möglich, da diese über UV-Niederdruckstrahler mit entsprechend benötigter Bestrahlungsstärke verfügen. Die mit UV-C Strahlung unterschiedlich behandelten Lösungen wiesen keine Auffälligkeiten in den toxikologischen Untersuchungen am Modellorganismus auf. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse kann von einer Unbedenklichkeit des Verfahrens auf den Modellorganismus *C. elegans* unter Laborbedingungen ausgegangen werden. Ferner müssen weitere Untersuchungen unternommen werden, um eine generelle Unbedenklichkeit der Bestrahlungsmethode auf die aquatische Umwelt aussprechen zu können. Ein sich dieser Arbeit anschließendes Forschungsvorhaben, sollte sich auf die qualitative und quantitative Analyse der durch die UV-C Behandlung entstandenen Metabolite konzentrieren, um Rückschlüsse auf deren mögliche Wirkung auf den Modellorganismus und andere Spezies ziehen zu können. Weiterhin sollten sich die Untersuchungen mit weiteren toxikologischen Endpunkten, Trophiestufen bzw. Organismen und einer Mischexposition beschäftigen. Abschließend wären ökotoxikologische Experimente unter Realbedingungen in einer Modellkläranlage anzustreben.

Um eine aktuelle und adäquate Expositionsabschätzung für den Verbrauch von Humanarzneimitteln vornehmen zu können, ist eine höhere Transparenz bei den Verkaufs-, Verbrauchs- und Abgabemengen von Arzneimittelwirkstoffen in Deutschland zwingend erforderlich. Basierend auf den von IQVIA (2021) angeforderten Verbrauchsdaten von ausgewählten Arzneimitteln der Jahre 2017 und 2020 ließen sich nur grobe Schätzungen über den Verbrauch und den daraus resultierenden Eintrag der Wirkstoffe erheben. In Rücksprache mit IQVIA konnten lediglich für die beiden angeforderten Jahre, vollständige Datensätze zur Verfügung gestellt werden, da für die anderen Jahre teilweise Daten fehlten. Es fehlen in diesen Zusammenstellungen Abgabemengen von z.B. Bundeswehr oder Justizvollzugsanstalten gänzlich. Überdies liegen keine Daten aus der Veterinärmedizin vor, obwohl die Anzahl der im Jahr 2022 in deutschen Haushalten lebenden Haustiere auf ca. 34,3 Mio. geschätzt wurde und sich der Nutztierbestand von Geflügel in Deutschland im Jahr 2020 auf ca. 173 Mio. belief (BMEL, 2020; ZZF, 2023). Dies führt zu erheblichen Schätzungsunsicherheiten bei der Bestimmung der Verbrauchsmengen der Arzneimittelwirkstoffe, da auch unsere Haus- und Nutztiere umfassend veterinärmedizinisch behandelt werden. Es wäre daher ratsam eine einheitliche Datenbank für die Verbrauchs- und Abgabemengen von Arzneimittel für Apotheken, Krankenhäuser, Veterinärmedizin und sonstige Einrichtungen aufzubauen, die eine genauere umweltbezogene Expositionsabschätzung ermöglichen würden. Neben der Schließung der Datenlücke zu ökotoxikologischen Langzeitstudien zur Umweltfolgewirkung von Humanarzneimittelwirkstoffen ist auch eine fortlaufende Untersuchung, Beobachtung und Dokumentation von Verbrauchsdaten von Arzneimitteln und deren Konzentrationen im Abwasser und Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser unerlässlich, um aktuelle und zukünftige Gefahren zu identifizieren. Diese Daten könnten ebenfalls dazu genutzt werden punktuell hohe Eintragsquellen zu identifizieren, um diese bereits vor dem Eintrag gesondert zu behandeln oder die Wirkstoffe am Eintragsort zu entfernen.

Diese Arbeit steuert einen Teil zur Schließung der Datenlücke für eine Umweltrisikobewertung der Humanarzneimittelwirkstoffe Ibuprofen und Naproxen bei. Es werden jedoch weiterhin Studien zum Umweltverhalten von Arzneimittelwirkstoffen und Mischexpositionen benötigt, welche mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden sind.

6 Zusammenfassung

Humanarzneimittelrückstände werden zum größten Teil über das kommunale Abwasser, in die Umwelt eingetragen. Für eine Vielzahl der in Oberflächengewässern im µg/l-Bereich nachgewiesenen Arzneimittelwirkstoffe, wie die nichtsteroidalen Antiphlogistika Ibuprofen und Naproxen, fehlen, trotz ihrer zunehmenden Verbrauchsmengen, Langzeitstudien zu ihrem Umweltverhalten.

Die toxikologische Wirkung von Ibuprofen und Naproxen im Medium NGM_k und vorkonditionierter *E. coli* auf *Caenorhabditis elegans* wurde anhand vier unterschiedlicher toxikologischer Endpunkte untersucht. Des Weiteren wurden die Untersuchungen mit den Wirkstofflösungen nach der Behandlung eines neuartigen nachhaltigen Reinigungsverfahrens mittels UV-C Bestrahlung und mit zwei in der kommunalen Abwasserreinigung vorhandenen Störgrößen, die den Modellorganismus zusätzlich vorbelasten könnten, durchgeführt. Es konnten keine akut toxischen Wirkungen und Effekte auf die Lokomotion an *C. elegans* beobachtet werden.

Die Exposition mit Naproxen führte dosisabhängig zur Reduktion der medianen Lebensspanne auf bis zu 25 % (95 % KI; 0,14-0,45) und einer deutlichen Abweichung der Kurve in der höchsten Dosisgruppe im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer zusätzlichen Konditionierung der Bakterien mit dem Wirkstoff zeigten sich keine Abweichungen mehr, sodass von einem protektiven Effekt durch die Vorkonditionierung ausgegangen werden kann.

Für beiden Störgrößen NO₃ und NH₄ konnten keine Unterschiede bei *C. elegans* festgestellt werden. Somit zeigten die toxikologischen Untersuchungen, dass *C. elegans* für Experimente in einer Modellkläranlage geeignet ist.

Darüber hinaus erzeugte die UV-C Behandlung der Wirkstofflösungen bei 48,4 W/m² für 10 min unter Sauerstoffzufuhr keine adversen Effekten am Modellorganismus. Die Reinigungsmethode erwies sich aufgrund der guten Abbauraten als effiziente und nachhaltige Methode zur Entfernung der beiden Wirkstoffe in wässriger Lösung.

Ferner sind weiterführende Untersuchungen zum Abbauverhalten der beiden Wirkstoffe und anderer umweltrelevanter Humanarzneimittelwirkstoffe mittels UV-C Bestrahlung vorzunehmen. Um die Lücke an fehlenden Daten zum Langzeitverhalten von Arzneimittelrückständen in der Umwelt zu schließen, werden weitere toxikologische Untersuchungen, bei denen andere Endpunkte an der Nematode untersucht und weitere Organismen beprobt werden, benötigt. Neben der Darstellung und Bewertung der biologischen Effekte der Wirkstoffe auf die Umwelt und Nichtzielorganismen sind zwingend nachhaltige Maßnahmen zur Minimierung des Arzneimitteleintrages erforderlich. Eine Maßnahme stellt die Entwicklung einer erweiterten Abwasserreinigung dar.

7 Literaturverzeichnis

- Amrhein V, Greenland S, McShane B (2019) Scientists rise up against statistical significance. *Nature*:305–307.
- Arp HPH, Hale SE (2019) REACH: Improvement of guidance and methods for the identification and assessment of PMT/vPvM substances.
- Artal-Sanz M, De Jong L, Tavernarakis N (2006) *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. *Biotechnol J* 1:1405–1418.
- Arzneimittel und Umwelt. UBA – Umweltbundesamt (2021a) Abrufdatum 03.04.2023. <https://www.umweltbundesamt.de/themen/chemikalien/arzneimittel/humanarzneimittel/arzneimittelumwelt>.
- Arzneimittelentsorgung. BfArM – Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (2023) Abrufdatum 03.04.2023 <https://www.bfarm.de/DE/Buergerbereich/Arzneimittel/arzneimittelentsorgung.html>.
- Arzneimittelwirkstoffe. UBA – Umweltbundesamt (2020b) Abrufdatum 03.04.2023. <https://www.umweltbundesamt.de/themen/wasser/fluesse/zustand/arzneimittelwirkstoffe>.
- Arzneimittelwirkstoffe in Oberflächengewässern, Arzneimittelwirkstoffe, die in Konzentrationen über 0,1 µg/l in Oberflächengewässern 2016 gefunden wurden. UBA – Umweltbundesamt (2018) Abrufdatum 12.10.2020. <https://www.umweltbundesamt.de/bild/arzneimittelwirkstoffe-in-oberflaechengewaessern-0>.
- Arzneimittelwirkstoffe in Oberflächengewässern, Arzneimittelwirkstoffe, die 2019 in Konzentrationen über 0,1 µg/l in Oberflächengewässern gefunden wurden. UBA – Umweltbundesamt (2020a) Abrufdatum 03.04.2023. <https://www.umweltbundesamt.de/bild/arzneimittelwirkstoffe-in-oberflaechengewaessern-0>.
- Aus der Beek T, Weber FA, Bergmann A, Hickmann S, Ebert I, Hein A, Küster A (2016) Pharmaceuticals in the environment - Global occurrences and perspectives. *Environ Toxicol Chem* 35:823–835.
- Bahr C, Ernst M, Jekel M (2007) Pilotuntersuchungen zur kombinierten oxidativ-biologischen Behandlung von Klärwerksabläufen für die Entfernung von organischen Spuren- und Wirkstoffen und zur Desinfektion. Schriftreihe Kompetenzzentrum Wasser, Berlin. Band 5: Kompetenzzentrum Wasser Berlin GmbH.
- LfU – Bayerisches Landesamt für Umwelt (2013) Verfahren der biologischen Abwasserreinigung.
- LfU (2016) Spurenstoffe im Wasser, UmweltWissen: Schadstoffe.
- Bergmann A, Fohrmann R, Weber FA (2011) Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln, UBA – Umweltbundesamt Texte Nr. 66/2011.
- BfArM – Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (2022) Verkehrsfähige Arzneimittel im Zuständigkeitsbereich des BfArM. Abrufdatum: 04.08.2022. https://www.bfarm.de/DE/Aktuelles/Statistiken/Arzneimittelzulassung/verkehrsfahige-Arzneimittel/_artikel.html?nn=471280.
- BLAC - Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (2003) Arzneimittel in der Umwelt. Auswertung der Untersuchungsergebnisse.
- BMG – Bundesministerium für Gesundheit (2022) Arzneimittel richtig aufbewahren und entsorgen.
- Bongers T, Ferris H (1999) Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 14 :224–228.

- Brain RA, Johnson DJ, Richards SM, Sanderson H, Sibley PK, Solomon KR (2004) Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environ Toxicol Chem* 23:371–382.
- Brendler-Schwaab S, Enzmann H, Horn M, Völkel H, Adler N, Bartel H, Chorus I, Ebert I, Eckhardt A, Fastner J, Grummt T, Klitzke S, Küster A, Mohaupt V, Rechenberg B, Schlüter C, Winde C (2017) Gemeinsamer Bericht vom Umweltbundesamt und Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte an das Bundesministerium für Gesundheit über die Prüfung von Handlungsmöglichkeiten zur Minimierung des Eintrages von Humanarzneimitteln (inkl. Rückständen) in das Rohwasser der Trinkwasseraufbereitung, UBA – Umweltbundesamt, BfArM – Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte.
- Brenner S (1973) The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*:71–94.
- Brune K, Dannhardt G, Hinz B, Högger P, Ribbat M, Langeneckert A (2002) Analgetika: Naproxen - lange wirksam bei mäßig starken Schmerzen. *Deutsche Apotheker Zeitung* 2002: 28.
- BMUV – Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und Verbraucherschutz (2014) Kurzinfo Abwasser - Kläranlage.
- C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282:2012–2018.
- Caelo (2021) Sicherheitsdatenblatt gemäß 1907/2006/EG, Artikel 31 - Ibuprofen.
- Ching TT, Chiang WC, Chen CS, Hsu AL (2011) Celecoxib extends *C. elegans* lifespan via inhibition of insulin-like signaling but not cyclooxygenase-2 activity. *Aging Cell* 10:506–519.
- Civity (2018) Kosten und verursachungsgerechte Finanzierung einer vierten Reinigungsstufe in Kläranlagen, In: *civity Management Consultants* (Hrsg.), Berlin, 2018.
- Cleuvers M (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*:185–194.
- Cleuvers M (2004) Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2004:309–315.
- Collado N, Buttiglieri G, Ferrando-Climent L, Rodriguez-Mozaz S, Barceló D, Comas J, Rodriguez-Roda I (2012) Removal of ibuprofen and its transformation products: experimental and simulation studies. *Sci Total Environ* 433:296–301.
- Corsi AK, Wightman B, Chalfie M (2015) A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 200:387–407.
- Daughton CG, Ternes TA (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107 Suppl 6:907–938.
- Dengg M, Van Meel JCA (2004) *Caenorhabditis elegans* as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*:209–214.
- DVGW – Deutscher Verein des Gas- und Wasserfaches e.V. (2015) Arzneimittelrückstände im Wasserkreislauf, eine Bewertung aus Sicht der Trinkwasserversorgung. *DVGW-Information Wasser* 54.
- Ebert I, Amato R, Hein A, Konradi S (2014) Arzneimittel in der Umwelt vermeiden, reduzieren, überwachen: Hintergrundpapier. UBA – Umweltbundesamt.

- ECHA – Europäische Chemikalienagentur (2023) Ibuprofen CAS number: 15687-27-1. Abrufdatum 03.04.2023. <https://echa.europa.eu/de/registration-dossier/-/registered-dossier/1270/7/6/1>.
- Fagron Services B.V. (2017) Analysezertifikat nach § 6 Abs. 1 und 3 ApBetrO - Naproxen.
- Fent K, Weston AA, Caminada D (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 76:122–159.
- Ferrari B, Paxéus N, Lo Giudice R, Pollio A, Garric J (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol Environ Saf* 55:359–370.
- Fielenbach N, Antebi A (2008) *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes & Dev.*:2149–2165.
- Flaherty CM, Dodson SI (2005) Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* 61:200–207.
- Geisslinger G, Menzel S, Gudermann T, Hinz B, Ruth P (2019) Mutschler Arzneimittelwirkungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Gómez MJ, Petrović M, Fernández-Alba AR, Barceló D (2006) Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J Chromatogr A* 1114:224–233.
- Goodman MB, Sengupta P (2019) How *Caenorhabditis elegans* senses mechanical stress, temperature, and other physical stimuli. *Genetics* 212:25–51.
- Götz K, Keil F (2007) Medikamentenentsorgung in privaten Haushalten: Ein Faktor bei der Gewässerbelastung mit Arzneimittelwirkstoffen? *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* 19:180–188.
- Graumnitz S, Jungmann D (2021) The database "Pharmaceuticals in the Environment", Update for the period 2017-2020, UBA – Umweltbundesamt. Texte | 163/2021.
- Günthert FW, Rödel S (2013) Bewertung vorhandener Technologien für die Elimination anthropogener Spurenstoffe auf kommunalen Kläranlagen, Abschlussbericht: Universität der Bundeswehr München, Institut für Wasserwesen Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik.
- Halling-Sørensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Lützhøft HCH, Jørgensen SE (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere* 36:357–393.
- Hanisch B, Abbas B, Kratz W (2002) Ökotoxikologische Bewertung von Humanarzneimitteln in aquatischen Ökosystemen., Studien und Tagungsberichte. Band 39.
- Hanisch B, Abbas B, Kratz W, Schüürmann G (2004) Bewertungsansatz zur Abschätzung des ökotoxikologischen Risikos von Arzneimittelrückständen. *Z Umweltchem Ökotox*:223–238.
- Havermann S, Humpf HU, Wätjen W (2016) Baicalein modulates stress-resistance and life span in *C. elegans* via SKN-1 but not DAF-16. *Fitoterapia* 113:123–127.
- Heberer T, Feldmann D (2004) Removal of pharmaceutical residues from contaminated raw water sources by membrane filtration. In: Kümmer (Hrsg.): *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. Springer, Berlin-Heidelberg, 2008:427-453.
- Herdegen T (2014) *Pharmko-logisch! Schmerz*. 1. Aufl., Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.

- Hilp M (2006) Ökologie, Arzneimittelbelastung in der Umwelt. Pharmazeutische Zeitung - Die Zeitschrift der deutschen Apotheke.
- Höger B, Köllner B, Dietrich DR, Schmid D, Linke A, Metzger J, Hitzfeld B (2005) Toxikologische Untersuchungen zur Biokonzentration von Humanpharmaka und ihren Effekten auf das Immunsystem in Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*), Forschungsbericht FZKA-BWPLUS.
- Hunt PR (2017) The *C. elegans* model in toxicity testing. J Appl Toxicol. 37(1):50–59.
- IMS Health (2013) MIDAS database, Frankfurt/Main, Germany.
- Intensive Landwirtschaft belastet unser Grundwasser und die Umwelt. DUH - Deutsche Umwelthilfe (2017) Abrufdatum 03.04.2023. <https://www.duh.de/aktuell/interviews-und-statements/aktuelle-meldung/news/intensive-landwirtschaft-belastet-unser-grundwasser-und-die-umwelt/>.
- IQVIA – IQVIA Commercial GmbH & Co. OHG (2021) IQVIA Arzneimittelverbrauch (AMV) Sonderstudie.
- Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A, Previtiera L, Rubino M (2005) Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. Sci Total Environ 348:93–101.
- Kaub JM, Biebersdorf N (2014) Kläranlage Wesel 4. Reinigungsstufe zur Elimination von Mikroschadstoffen: TUTTAHS & MEYER Ingenieurgesellschaft mbH.
- Kenyon CJ (2010) The genetics of ageing. Nature 464:504–512.
- Kern D, Lorenz W (2008) Rückstände ausgewählter Humanarzneimittel in Oberflächengewässern im Einzugsgebiet Halle (Saale) Umweltchem. Ökotox. 2008:97–101.
- Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B, Zaslavsky L, Zhang J, Bolton EE (2021) PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces - PubChem CID 156391. Nucleic Acids Res 49:D1388–D1395.
- Klauer B, Aicher C, Bratan T, Eberle U, Hillenbrand T, Kümmerer K, Reuter W, Schiller J, Schulte-Römer N, Schramm E, Tettenborn F, Völker C, Walz A (2019) Arzneimittelrückstände in Trinkwasser und Gewässern, Endbericht zum TA-Projekt Arbeitsbericht Nr.183.
- Kratz W, Abbas B, Linke I (2000) Arzneimittelwirkstoffe in der Umwelt. UWSF - Z Umweltchem Ökotox 12:343–349.
- Kumar M, Shekhar S, Kumar R, Kumar P, Govarathanan M, Chaminda T (2023) Drinking water treatment and associated toxic byproducts: Concurrence and urgency. Environ Pollut 320:121009.
- Kümmerer K (2001) Arzneimittel, Diagnostika und Desinfektionsmittel in der Umwelt. UWSF - Z Umweltchem Ökotox 13:269–276.
- Kümmerer K (Hrsg.) Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risks, Springer, Berlin-Heidelberg, 2004.
- Kümmerer K (2010) Neuartige Spurenstoffe im Wasser. Hydrologie und Wasserbewirtschaftung 54:349–359.
- Kwak K, Ji K, Kho Y, Kim P, Lee J, Ryu J, Choi K (2018) Chronic toxicity and endocrine disruption of naproxen in freshwater waterfleas and fish, and steroidogenic alteration using H295R cell assay. Chemosphere 204:156–162.
- Lakowski B, Hekimi S (1996) Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. Science 272:1010–1013.
- Landwirtschaft, Geflügelhaltung in Deutschland. BMEL – Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2020) Abrufdatum 03.04.2023. <https://www.bmel-statistik.de/landwirtschaft/tierhaltung/gefluegelhaltung>.

- LANUV - Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (2007) Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt, Literaturstudie.
- LAU – Landesamt für Umweltschutz Sachsen-Anhalt (2006) Arzneistoffe in Zu- und Abläufen von kommunalen Kläranlagen des Landes Sachsen-Anhalt, Bericht zum Sondermessprogramm 2002-2004 Nr. 3.
- LAU (2010) Arzneistoffe in Gewässern und Kläranlagen in Sachsen-Anhalt (2006 bis 2007) Nr. 2.
- Lee SY, Kang K (2017) Measuring the Effect of Chemicals on the Growth and Reproduction of *Caenorhabditis elegans*. J Vis Exp 128:56437.
- Liebig M. 2005. Untersuchungen zu Umweltrisikobewertungen von Humanpharmaka und Inhaltsstoffen von Körperpflegeprodukten vor dem Hintergrund europäischer Bewertungskonzepte. Dissertation. Frankfurt (am Main): Johann-Wolfgang Goethe-Universität.
- Lüllmann H, Mohr K, Wehlin M, Hein L (2016) Pharmakologie und Toxikologie. 18. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Vicent T, Caminal G (2009) Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. Chemosphere 74:765–772.
- Marquardt H, Schäfer S (Hrsg): Lehrbuch der Toxikologie: Mit 342 Tabellen, Wiss. Verl.- Gesell, Stuttgart, 2004.
- Mukhopadhyay A, Deplancke B, Walhout AJM, Tissenbaum HA(2005) *C. elegans* tubby regulates life span and fat storage by two independent mechanisms. Cell Metab 2:35–42.
- Nurmi TMA, Kiljunen TK, Knuutinen JS (2019) A fugacity model assessment of ibuprofen, diclofenac, carbamazepine, and their transformation product concentrations in an aquatic environment. Environ Sci Pollut Res Int 26:328–341.
- Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJI, Arshad M, Mahmood S, Ali A, Khan AA (2004) Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. Nature 427:630–633.
- Römer J (2018) Schadstoffe in Gewässern, Was ist Ihnen sauberes Wasser wert?, Spiegel.
- Roskosch A, Heidecke P (2018) Klärschlamm Entsorgung in der Bundesrepublik Deutschland.
- Ruggeri G, Ghigo G, Maurino V, Minero C, Vione D (2013) Photochemical transformation of ibuprofen into harmful 4-isobutylacetophenone: pathways, kinetics, and significance for surface waters. Water Research 47 :6109–6121.
- Ruwwe S, Stock K, Zeisberger V (2005) Handbuch Altlasten - Arbeitshilfe zu überwachten natürlichen Abbau- und Rückhalteprozessen im Grundwasser. 2. Aufl., HLUG, Wiesbaden.
- Salomon M (2005) Arzneimittel in der aquatischen Umwelt. UWSF - Z Umweltchem Ökotox 17:50–53.
- Sawin ER. 1996. Genetic and cellular analysis of modulated behaviors in *Caenorhabditis elegans*. Dissertation. Massachusetts.
- Schafer WF (2005) Genetics of egg-laying in worms. Annu Rev Genet 40:487–509.

- Schrenk D, Bignami M, Bodin L, Chipman JK, Del Mazo J, Hogstrand C, Hoogenboom LR, Leblanc JC, Nebbia CS, Nielsen E, Ntzani E, Petersen A, Sand S, Schwerdtle T, Vleminckx C, Wallace H, Romualdo B, Cristina F, Stephen H, Marco I, Mosbach-Schulz O, Riolo F, Christodoulidou A, Grasl-Kraupp B (2023) Risk assessment of N-nitrosamines in food. EFSA J 21:e07884.
- Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J, Püttmann W (2007) Humanpharmakawirkstoffe in der Umwelt: Einträge, Vorkommen und der Versuch einer Bestandsaufnahme. UWSF - Z Umweltchem Ökotox 19:168–179.
- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. Aquat Toxicol 68:141–150.
- Schwarz D, Leblanc L (2021) Sachgerechte Entsorgung von Arzneimitteln: Wege zu mehr Umweltschutz. Dtsch Arztebl:A-616 / B-519.
- Sistig J. 2016. Spurenstoffentfernung – Vergleich der Eliminationsleistungen verschiedener Technologien im Hinblick auf aktuelle Leitparameter. Masterarbeit. Köln.
- SRU – Sachverständigenrat für Umweltfragen (2007) Arzneimittel in der Umwelt, Stellungnahme Nr. 12.
- Stiernagle T(2006) Maintenance of *C. elegans*. WormBook: 1–11.
- Stock HD, Reupert R (2006): Arzneimittelrückstände im Abwasser: Was gelangt in die Gewässer? In: Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen (Hrsg), Jahresbericht 2005. LUA NRW, Essen, 17–26.
- Strain Information *C. elegans* VC2010. CGC – *Caenorhabditis* Genetics Center, University of Minnesota (2008) Abrufdatum 03.04.2023. <https://cgc.umn.edu/strain/VC2010>.
- Strain Information *E. coli* OP50. CGC (2020) Abrufdatum 03.04.2023. <https://cgc.umn.edu/strain/OP50>.
- Stuer-Lauridsen F, Birkved M, Hansen LP, Lützhøft HC, Halling-Sørensen B (2000) Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. Chemosphere 40:783–793.
- Ternes T (2004) Assessment of technologies for the removal of pharmaceuticals and personal care products in sewage and drinking water facilities to improve the indirect potable water reuse. Abrufdatum 07.06.2019. cordis.europa.eu/project/rcn/53072/reporting/en.
- Triebskorn R, Casper H, Heyd A, Eikemper R, Köhler, Schwaiger J (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Aquat Toxicol 68:151–166.
- UBA – Umweltbundesamt (2011) Stickstoff - Zuviel des Guten?, Überlastung des Stickstoffkreislaufs zum Nutzen von Umwelt und Mensch wirksam reduzieren.
- UBA (2012): Maßnahmen zur Minderung des Eintrags von Humanarzneimitteln und ihrer Rückstände in das Rohwasser zur Trinkwasseraufbereitung. Empfehlung des Umweltbundesamtes vom 30.08.2011 nach Anhörung der Trinkwasserkommission des Bundesministeriums für Gesundheit. Bundesgesundheitsbl 2012 55:143-149.
- UBA (2015) Arzneimittel NICHT in die Toilette und Spüle. Faltblatt.
- UBA (2021b) Bericht des Bundesministeriums für Gesundheit und des Umweltbundesamtes an die Verbraucherinnen und Verbraucher über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch* (Trinkwasser) in Deutschland, gemäß § 21 Trinkwasserverordnung anhand des Formats für die Berichterstattung der zuständigen obersten Landesbehörden. Bundesgesundheitsbl 2013-56:1191- 1215.

- Umweltatlas - Reaktiver Stickstoff, Verursacher - Abwasser und Oberflächenablauf. UBA – Umweltbundesamt (2022) Abrufdatum 03.04.2023. <https://www.umweltbundesamt.de/umweltatlas/reaktiver-stickstoff/verursacher/abwasser-oberflaechenablauf/was-haben-abwasser-oberflaechenablauf-reaktivem>.
- Vijg J, Campisi J (2008) Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* 454:1065–1071.
- Wasserstein RL, Schirm AL, Lazar NA (2019) Moving to a World Beyond “ $p < 0.05$ ”. *Am Stat*:1–19.
- Zettler ML, Jueg U (2001) Die Bachmuschel (*Unio crassus*) in Mecklenburg-Vorpommern. *Naturschutzarbeit in Mecklenburg-Vorpommern*:9–16.
- Zullini A (1976) Nematodes as indicators of river pollution. *Nematol. mediterr.* 4:13–22.
- Zwiener C, Seeger S, Glauner T, Frimmel FH (2002) Metabolites from the biodegradation of pharmaceutical residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments. *Anal Bioanal Chem* 372:569–575.
- ZZF – Zentralverband Zoologischer Fachbetriebe e.V. (2023) Der deutsche Heimtiermarkt 2022, Struktur & Umsatzdaten. Datenblatt.

8 Thesen

- Ibuprofen, Naproxen, deren Metabolite nach UV-C Behandlung, sowie NH_4 und NO_3 induzieren keine akut toxischen Effekte auf die Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).
- Naproxen reduziert mit einer Konzentration von 25 μM im Medium (NGM_k) die mediane Lebensspanne von *C. elegans* auf 25 % (95% KI; 0,14-0,45) deutlich.
- *E. coli* 0 μM und NGM_k 10 bzw. 25 μM Naproxen zeigen deutliche Abweichungen der Überlebenskurven von *C. elegans* im Vergleich zur Kontrolle auf.
- Die Konditionierung von *E. coli* mit Naproxen zeigt einen protektiven Effekt auf *C. elegans* bei gleichzeitiger Exposition in NGM_k .
- Naproxen führt zu einer Veränderung des Eiablagemusters von *C. elegans*.
- Der Wirkstoff Naproxen weist eine höhere Toxizität als Ibuprofen bei *C. elegans* auf.
- Für *C. elegans* lassen sich ein *No Observed Effect Concentration* von 2,3 mg/l (10 μM) für Ibuprofen und von 0,58 mg/l (2,5 μM) für Naproxen in NGM_k aus den Untersuchungen ableiten.
- Eine 10-minütige UV-C Behandlung bei einer Bestrahlungsstärke von 48,4 W/m^2 unter Sauerstoffzufuhr erweist sich als effizienteste Methode zur Elimination der Wirkstoffe.
- Beide Bestrahlungsmethoden zeigen keine toxikologisch bedenklichen Wirkungen am Modellorganismus *C. elegans*.
- *C. elegans* wird nicht durch die beiden Störgrößen NH_4 und NO_3 advers beeinträchtigt.
- Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der Nematode als Modellorganismus für Feldstudien genutzt werden kann.

Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre, an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum/Unterschrift