

TEXTE

129/2024

Abschlussbericht

Trends und Daten zur Verbreitung von Munitionsresten in der Meeresumwelt

Dr. Jennifer S. Strehse, Tobias H. Bünning, Prof. Dr. Edmund Maser
Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, UKSH, Kiel

Herausgeber:
Umweltbundesamt

TEXTE 129/2024

Ressortforschungsplan des Bundesministerium für
Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit

Forschungskennzahl 3719 25 2990
FB001468

Abschlussbericht

Trends und Daten zur Verbreitung von Munitionsresten in der Meeresumwelt

von

Dr. Jennifer S. Strehse, Tobias H. Bünning, Prof. Dr.
Edmund Maser
Institut für Toxikologie und Pharmakologie für
Naturwissenschaftler, UKSH, Kiel

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber

Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
info@umweltbundesamt.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

Durchführung der Studie:

Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler des UKSH Campus
Kiel
Brunwiker Straße 10
24105 Kiel

Abschlussdatum:

Dezember 2023

Redaktion:

Fachgebiet II 2.3 Schutz der Meere und Polargebiete
Dr. Anita Künitzer

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, September 2024

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

Kurzbeschreibung: Trends und Daten zur Verbreitung von Munitionsresten in der Meeresumwelt

In Nord- und Ostsee wurden während und nach den Weltkriegen große Mengen konventioneller Munition wie auch Chemische Kampfstoffe (CWA) eingetragen. Aufgrund ihrer toxischen, krebserzeugend und/oder erbgutverändernden Eigenschaften können diese Stoffe der Meeresumwelt schaden und können über den Eintrag in die Nahrungskette letztendlich auch die Gesundheit des Menschen gefährden. Zudem wird es in der Zukunft durch die weiter fortschreitende Korrosion der Munition zu einer verstärkten Freisetzung von Schadstoffen in die Umwelt kommen.

Im Arbeitspaket 1 „Zeitreihen-Analyse von Proben der Umweltprobenbank auf Sprengstofftypische Verbindungen (STV)“ konnte gezeigt werden, dass sich in Miesmuscheln von Standorten in Nord- und Ostsee mit zunehmender Verweilzeit der Munition im Meer Rückstände von STV nachweisen lassen.

Im Arbeitspaket 2 „Untersuchungen zur räumlichen Verteilung der STV“ wurde in Sediment, Plattfischen und Muscheln die flächenartige Ausdehnung der STV Belastung in Nord- und Ostsee ermittelt. In den aus Niedersachsen stammenden Fischen und Sedimentproben konnten STV nachgewiesen werden.

Im Arbeitspaket 3 „Untersuchungen zur möglichen Anreicherung von STV im marinen Nahrungsnetz“ wurden mögliche Vorkommen von STV in marinen Lebewesen aus unterschiedlichen trophischen Ebenen untersucht. Bis auf in den untersuchten Plattfischen wurden in den untersuchten Aalmuttern, Eiderenten, Schweinswalen und Seehunden jedoch keine Hinweise auf STV gefunden.

Im Arbeitspaket 4 „Belastung mit chemischen Kampfstoffen“ wurden Verdachtsproben in der Nähe des Bornholmbeckens und der Flensburger Förde auf Rückstände von CWA untersucht. In den beiden Sedimentproben der Flensburger Förde konnte Adamsit nachgewiesen werden. Zudem konnte durch Auswertung der MUDAB-Datenbank gezeigt werden, dass kein Zusammenhang zwischen der Arsenbelastung der deutschen Nord- und Ostsee und der Altmunition besteht.

Abstract: Trends and data on the distribution of munitions compounds in the marine environment

Large quantities of conventional munitions and chemical warfare agents (CWA) were dumped in the North Sea and Baltic Sea during and after the world wars. Due to their toxic, carcinogenic and/or mutagenic properties, these substances can harm the marine environment and can ultimately also jeopardise human health by entering the food chain. In addition, the ongoing corrosion of the munitions will lead to an increased release of pollutants into the environment in the future.

In work package 1 "Time series analysis of samples from the environmental specimen bank for energetic compounds (EC)", it was shown that residues of STV can be detected in mussels from sites in the North and Baltic Seas with increasing residence time of the munitions in the sea.

In work package 2 "Investigations into the spatial distribution of EC", the areal extent of STV contamination in the North Sea and Baltic Sea was determined in sediment, flatfish and mussels. EC were detected in the fish and sediment samples from Lower Saxony.

In work package 3 "Investigations into the possible accumulation of EC in the marine food web", possible occurrences of EC in marine organisms from different trophic levels were investigated. However, with the exception of the flatfish examined, no evidence of EC was found in the eelpouts, eider ducks, harbour porpoises and seals examined.

In work package 4 "Contamination with chemical warfare agents", suspected samples in the vicinity of the Bornholm Basin and the Flensburg Fjord were analysed for residues of EC.

Adamsite was detected in the two sediment samples from the Flensburg Fjord. In addition, analysis of the MUDAB database showed that there is no connection between the arsenic contamination of the German North Sea and Baltic Sea and the submerged munitions.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	11
Tabellenverzeichnis.....	13
Abkürzungsverzeichnis.....	15
Zusammenfassung.....	18
Summary	23
1 Hintergrund und Problemstellung.....	28
1.1 Munition im Meer: Quelle von Schadstoffen und Risiken für Meeresorganismen	28
1.2 Gegenstand des Forschungsprojekts	30
1.2.1 Kurzbeschreibung der untersuchten STV und CWA	32
1.2.1.1 Sprengstofftypische Verbindungen	32
1.2.1.2 Chemische Kampfstoffe.....	34
1.3 Aufgabenstellung und Hintergründe der Arbeitspakete	36
1.3.1 Arbeitspaket 1 – zeitliche Schadstoffbelastung.....	37
1.3.2 Arbeitspaket 2 – räumliche Schadstoffbelastung.....	38
1.3.3 Arbeitspaket 3 – Schadstoffanreicherung in der Nahrungskette	39
1.3.4 Arbeitspaket 4 – chemische Kampfstoffe.....	39
2 Arbeitspaket 1 – Zeitreihen-Analyse von Proben der Umweltprobenbank auf Sprengstofftypische Verbindungen (STV)	41
2.1 Vorgehen und Methodik.....	41
2.1.1 Angewendete Methoden.....	42
2.1.1.1 Probenbereitstellung.....	42
2.1.1.2 Aufarbeitungsmethoden.....	43
2.1.1.3 Verbesserung der Analytik – Optimierung von Geräteparametern der GC-MS/MS	44
2.1.1.4 Bestimmung der Nachweisgrenzen sprengstofftypischer Verbindungen	44
2.1.2 Zeitreihenmessungen	45
2.1.2.1 Lyophilisierte Miesmuschelproben.....	45
2.1.2.2 Aalmutterleberproben.....	45
2.2 Ergebnisse Zeitreihen-Analyse von Proben der Umweltprobenbank.....	46
2.2.1 Verbesserung der Nachweisgrenze durch Methodenoptimierung	46
2.2.1.1 Probenbereitstellung	46
2.2.1.2 Aufarbeitungsmethoden – verbessertes Extraktionsverfahren für STV aus Miesmuschelgewebe zur Matrixminimierung.....	46
2.2.1.3 Verbesserung der Analytik – Optimierung von Geräteparametern der GC-MS/MS	47

2.2.1.4	Bestimmung der Nachweisgrenzen sprengstofftypischer Verbindungen	49
2.2.2	Zeitreihenmessungen	50
2.2.2.1	Miesmuscheln.....	50
2.2.2.2	Aalmuttern (Leber)	55
2.3	Ergebnisbewertung Arbeitspaket 1	56
3	Arbeitspaket 2 – Untersuchungen zur räumlichen Verteilung der sprengstofftypischen Verbindungen.....	61
3.1	Planungen und Durchführungen der Probennahmen	61
3.1.1	Probennahme Mecklenburg-Vorpommern	61
3.1.2	Probennahme Niedersachsen.....	63
3.1.3	Probennahme Schleswig-Holstein	66
3.2	Analytische Methoden.....	67
3.2.1	Aufarbeitung der Probenmaterialien.....	67
3.2.2	Probenanalyse mittels GC-MS/MS.....	68
3.2.3	Probenanalyse mittels LC-MS/MS	69
3.3	Ergebnisse Arbeitspaket 2.....	71
3.3.1	Chemische Analytik.....	71
3.3.1.1	Mecklenburg-Vorpommern.....	71
3.3.1.2	Niedersachsen	72
3.3.1.3	Schleswig-Holstein	74
3.3.2	Identifizierung von Hot-Spots	74
3.3.2.1	Mecklenburg-Vorpommern.....	74
3.3.2.2	Niedersachsen	76
3.3.2.3	Schleswig-Holstein	79
3.4	Bewertung und Empfehlungen Arbeitspaket 2.....	80
3.4.1	Allgemeine ökotoxikologische Bewertung.....	80
3.4.2	Abschätzung der Umweltgefährdung	84
3.4.2.1	Mecklenburg-Vorpommern.....	84
3.4.2.2	Niedersachsen	84
3.4.2.3	Schleswig-Holstein	85
3.4.3	Monitoringempfehlungen für STV	85
3.4.3.1	Allgemeines räumliches Monitoring.....	86
3.4.3.2	Bergungsbegleitendes Monitoring	87
4	Arbeitspaket 3 – Untersuchungen zur möglichen Anreicherung von STV im marinen Nahrungsnetz	88

4.1	Planungen und Durchführungen der Probennahmen	88
4.1.1	Plattfische	88
4.1.2	Eiderenten.....	88
4.1.3	Aalmuttern (Galle)	91
4.1.4	Seehunde und Schweinswale	92
4.2	Analytische Methoden.....	95
4.2.1	Aufarbeitung der Proben	95
4.2.1.1	Plattfische	95
4.2.1.2	Eiderenten	99
4.2.1.3	Aalmuttern (Galle)	102
4.2.1.4	Seehunde und Schweinswale	102
4.2.2	Probenanalyse mittels GC-MS/MS und LC-MS/MS	104
4.2.2.1	GC-MS/MS	104
4.2.2.2	LC-MS/MS	105
4.3	Ergebnisse	105
4.3.1	Plattfische	105
4.3.2	Eiderenten.....	106
4.3.3	Aalmuttern (Galle)	106
4.3.4	Seehunde und Schweinswale	106
4.4	Ergebnisbewertung Arbeitspaket 3	108
4.4.1	Allgemeine Bewertung der etablierten Methoden zur Gewebeaufarbeitung und Messtechnik.....	108
4.4.2	Bewertender Vergleich der auftretenden STV-Konzentrationen in den verschiedenen Tierspezies im Hinblick auf eine mögliche Anreicherung von STV und Umbauprodukten im Nahrungsnetz.....	109
4.4.3	Abschätzung einer möglichen Gefährdung des Menschen und humantoxikologische Bewertung	113
5	Arbeitspaket 4 – Belastung mit chemischen Kampfstoffen	115
5.1	Analyse von Verdachtsproben auf Rückstände chemischer Kampfstoffe	116
5.1.1	Evaluierung geeigneter Gebiete	116
5.1.2	Planung und Durchführung der Probennahmen	117
5.1.3	Probenanalyse	119
5.1.4	Ergebnisse der Probenanalysen.....	119
5.2	Räumliche und zeitliche Arsenbelastung von Nord- und Ostsee in ausgewählten Umweltproben anhand von Daten aus der Meeresumweltdatenbank (MUDAB)	121

5.2.1	Vorgehensweise.....	122
5.2.2	Arsen-Gehalte in Sediment und Wasser von Nord- und Ostsee sowie Miesmuscheln..	124
5.2.3	Bewertung der Arsen-Gehalte in Sediment und Wasser von Nord- und Ostsee sowie Miesmuscheln in Bezug zu Munitionsflächen	128
5.2.4	Toxikologische Bewertung der Arsenbelastung.....	133
6	Zusammenfassung und Ausblick	135
7	Danksagung	137
8	Quellenverzeichnis	138

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Übersicht der munitionsbelasteten Flächen (konventionelle Munition und CWA) der deutschen Bereiche von Nord- und Ostsee.....	30
Abbildung 2:	Beispielaufnahmen der untersuchten Spezies (von links nach rechts, von oben nach unten: Miesmuscheln, Flunder, Aalmutter, Eiderenten, Schweinswale, Seehund)	31
Abbildung 3:	Probennahmeregionen von Miesmuscheln und Aalmuttern im Bereich der Nordsee (links) und Ostsee (rechts).....	38
Abbildung 4:	Regressionsgeraden der Messreihen zur Bestimmung der Nachweisgrenzen von TNT, 2- und 4-ADNT, 1,3-DNB und 2,4-DNT für Injektionen von 100 fg bis 5 pg	50
Abbildung 5:	Darstellung STV in Miesmuschelproben aus (a) Königshafen (Sylt), (b) Darßer Ort und (c) Eckwarderhörne mit den entsprechenden Signalintensitäten.....	55
Abbildung 6:	Übersicht der munitionsbelasteten Flächen in der Nordsee und Ostsee im Bereich der Sammelregionen für Miesmuscheln der Umweltprobenbank des Bundes	56
Abbildung 7:	Detaillierte Darstellung des Probennahmegebiets „Eckwarderhörne“ der Umweltprobenbank in der deutschen Nordsee	58
Abbildung 8:	Probennahmeorte in Mecklenburg-Vorpommern im Jahr 2020/21. An jedem der vier Standorte wurden jeweils drei Proben Miesmuscheln und Sedimente genommen. Die Probennahme erfolgte Ende Oktober 2020 (Bereich Wismarbuch und Rostocker Breitlings) und im April 2021 (nördlich Poel und Warnemünde). Für die Probennahmen wurden zwei verschiedene Arten von Dredgen verwendet (Kieler Kinderwagen und Handdredge)	62
Abbildung 9:	Übersicht der Probennahmeorte in Mecklenburg-Vorpommern für Miesmuscheln (<i>Mytilus</i> sp.) und Dreikantmuscheln (<i>Dreissena</i> sp.) im Herbst 2021.....	63
Abbildung 10:	Stationen der Sammlung von Miesmuscheln und Sedimentproben durch das NLWKN im Sommer/Herbst 2020 und Herbst 2022 sowie die Fangregionen von Plattfischen im Juli 2019	64
Abbildung 11:	Probennahmen von Miesmuscheln und Sediment in Niedersachsen. Die Probennahmen erfolgten zwischen August und September 2020 (von links nach rechts, von oben nach unten: Wurster Watt, Jade/Mellum, Norderney, Jadebusen, Spiekeroog und Borkum.	65
Abbildung 12:	Beprobung von Sediment und Miesmuscheln in Niedersachsen. Die Probennahmen erfolgten zwischen August und Dezember	

	2022 (von links nach rechts, von oben nach unten: Wurster Watt, Jade/Mellum, Norderney, Jadebusen, Spiekeroog und Borkum.	66
Abbildung 13:	Regressionsgeraden zur Bestimmung der Nachweisgrenzen für Injektionen von 100 fg bis 5 pg verschiedener sprengstofftypischer Verbindungen mittels LC-MS/MS.....	71
Abbildung 14:	STV-Konzentrationen in Galleproben von im Jahr 2019 gefangenen Plattfischen in Niedersachsen	73
Abbildung 15:	STV-Konzentrationen in Fischfilet von im Jahr 2019 gefangenen Plattfischen in Niedersachsen	74
Abbildung 16:	Darstellung der Probennahmeorte in Mecklenburg-Vorpommern im Jahr 2020/21 und der Munitionsflächen des Munitionskatasters AmuCad	75
Abbildung 17:	Probennahmeorte in Mecklenburg-Vorpommern im Herbst 2021 und die lokalen Munitionsgebiete des Munitionskatasters AmuCad	76
Abbildung 18:	Übersicht der beprobten Gebiete in Niedersachsen mit den Daten des Munitionskatasters AmuCad	79
Abbildung 19:	Darstellung der Probennahmepositionen für Miesmuscheln und Sediment in der Flensburger Förde mit den im Umkreis liegenden Munitionsflächen aus dem Munitionskataster AmuCad	80
Abbildung 20:	Fangregion der dänischen Eiderenten (2017 – 2019)	90
Abbildung 21:	Probennahmegebiet „NP Vorpommersche Boddenlandschaft“ für Aalmuttern der UPB. Neben dem Probennahmegebiet sind auch Teile des nahegelegenen Schießgebiet „Arkona“ dargestellt.....	92
Abbildung 22:	Männliche Flunder. Das Gewebe über der Leber wurde bereits entfernt, der Schnitt Richtung Schwanzflosse dient der Geschlechtsbestimmung	96
Abbildung 23:	Weibliche Flunder. Kopf, Leber und ein Filet wurden durch das Institut Dr. Nowak für das Monitoring des NLWKN entnommen, der Rest dem Institut für Toxikologie zur eigenen Probennahme übergeben.....	96
Abbildung 24:	Entnahme des Filets aus einem weiblichen Individuum. Anschließend wurde das Filet in das unten rechtsstehende Probengefäß überführt.....	98
Abbildung 25:	Munitionsvorkommen in den eventuellen Einzugsgebieten der in Sletten Haven als Beifang gefundenen Eiderenten	112
Abbildung 26:	Grafische Darstellung der mittleren Arsenkonzentrationen in Sedimentproben der MUDAB Messstationen in der Ostsee sowie ihre Lage zu Munitionsflächen	124

Abbildung 27:	Grafische Darstellung der mittleren Arsenkonzentrationen in Wasserproben der MUDAB Messstationen in der Ostsee sowie ihre Lage zu Munitionsflächen	125
Abbildung 28:	Grafische Darstellung der mittleren Arsenkonzentrationen in Sedimentproben der MUDAB Messstationen in der Nordsee sowie ihre Lage zu Munitionsflächen	126
Abbildung 29:	Grafische Darstellung der mittleren Arsenkonzentrationen in Wasserproben der MUDAB Messstationen in der Nordsee und westlichen Ostsee sowie ihre Lage zu Munitionsflächen.....	127
Abbildung 30:	Grafische Darstellung der mittleren Arsenkonzentrationen in Muschelproben der MUDAB Messstationen in der Nordsee und Ostsee sowie ihre Lage zu Munitionsflächen	128
Abbildung 31:	Gemessene Arsenkonzentrationen in den Sedimenten der verschiedenen Messstellen in der Ostsee sowie mögliche räumliche Nähe zu Munitionsflächen in einem Radius von 10 Kilometern	129
Abbildung 32:	Gemessene Arsenkonzentrationen in den Sedimenten der verschiedenen Messstellen in der Nordsee sowie mögliche räumliche Nähe zu Munitionsflächen in einem Radius von 10 Kilometern	130
Abbildung 33:	Gemessene Arsenkonzentrationen im Wasser der verschiedenen Messstellen in der Nord- und Ostsee sowie mögliche räumliche Nähe zu Munitionsflächen in einem Radius von 10 Kilometern	131
Abbildung 34:	Gemessene Arsenkonzentrationen in Miesmuscheln der verschiedenen Messstellen in der Nordsee (oben) und Ostsee (unten) sowie mögliche räumliche Nähe zu Munitionsflächen in einem Radius von 10 Kilometern	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Darßer Ort – Ergebnisse der untersuchten Miesmuscheln der Zeitreihenanalyse auf die Sprengstofftypischen Verbindungen TNT, 4-ADNT, 2-ADNT und 1,3-DNB	51
Tabelle 2:	Königshafen (Sylt) – Ergebnisse der untersuchten Miesmuscheln der Zeitreihenanalyse auf die Sprengstofftypischen Verbindungen TNT, 4-ADNT, 2-ADNT und 1,3-DNB.....	52
Tabelle 3:	Eckwarderhörne – Ergebnisse der untersuchten Miesmuscheln der Zeitreihenanalyse auf die Sprengstofftypischen Verbindungen TNT, 4-ADNT, 2-ADNT und 1,3-DNB	53

Tabelle 4:	Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen verschiedener Sprengstofftypischer Verbindungen (STV) mittels GC-MC/MC (stand Oktober 2021)	68
Tabelle 5:	LC-MS/MS Retentionszeiten und Übergänge.....	69
Tabelle 6:	Gerätespezifische Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen (LoD und LoQ) der GC-MS/MS und LC-MS/MS-Methoden.....	70
Tabelle 7:	Ergebnisse der STV Analytik der Sedimentproben aus Niedersachsen von 2020 und 2022	72
Tabelle 8:	Basisdaten der zur Verfügung gestellten Eiderenten.....	90
Tabelle 9:	Übersicht der erhaltenen Proben aus Seehunden (<i>Phoca vitulina</i>) und zugehörnde Begleitdaten	93
Tabelle 10:	Übersicht der erhaltenen Proben aus Schweinswalen (<i>Phocoena phocoena</i>) und zugehörnde Begleitdaten	94
Tabelle 11:	Übersicht der Probenvorbereitungsmethoden der untersuchten Gewebe aus Eiderenten.....	100
Tabelle 12:	Frisch- und Trockengewichte der Muskelproben aus Seehund und Schweinswal	103
Tabelle 13:	LC-MS/MS Retentionszeiten und SRM-Übergänge der untersuchten STV	105
Tabelle 14:	Nachweisgrenzen (LoD) und Bestimmungsgrenzen (LoQ) der untersuchten STV pro Gramm präpariertem Gewebe bzw. Milliliter Galle aus Eiderenten und Aalmutter (Galle). Es wurde mittels GC-MS/MS (splittless) gemessen.	106
Tabelle 15:	Ergebnisse der STV Analytik der Untersuchten Gewebe und Körperflüssigkeiten aus Seehunden und Schweinswalen	107
Tabelle 16:	Nachweisgrenzen (LoD) und Bestimmungsgrenzen (LoQ) der untersuchten STV pro Gramm präpariertem Gewebe bzw. Milliliter Urin aus Seehunden und Schweinswalen, für Messungen mittels GC-MS/MS und LC-MS/MS	108
Tabelle 17:	Bekannte CWA Versenkungsgebiete in Nord- und Ostsee. Die Daten stammen aus Knobloch et al., 2013 und www.amucad.org	116
Tabelle 18:	Ergebnis der Analysen von acht Wasser- und vier Sedimentproben aus dem Bornholmbecken, die im Rahmen einer Greenpeace Aktion am 25. und 26. November 2022 genommen wurden.	120
Tabelle 19:	Anzahl der Messwerte mit Entnahmezeitraum von Miesmuscheln, Wasser- und Sedimentproben in Nord- und Ostsee der MUDAB Datenbank	122
Tabelle 20:	Statistische Kennzahlen der Auswertung der Arsenwerte der MUDAB	123

Abkürzungsverzeichnis

2-ADNT	2-Amino-4,6-dinitrotoluol (CAS 35572-78-2)
4-ADNT	4-Amino-2,6-dinitrotoluol (CAS 19406-51-0)
2,4-DANT	2,4-Diamino-6-nitrotoluol (CAS 6629-29-4)
1,3-DNB	1,3-Dinitrobenzol (CAS 99-65-0)
2,4-DNT	2,4-Dinitrotoluol (CAS 121-14-2)
2,6-DNT	2,6-Dinitrotoluol (CAS 606-20-2)
1,3,5-TNB	1,3,5-Trinitrobenzol (CAS 99-35-4)
AmuCad	Ammunition Cadastre Sea
AUC	Area Under the Curve
AWZ	deutsche ausschließliche Wirtschaftszone
BCF	Biokonzentrationsfaktor (bioconcentration factor)
BLMP	Bund/Länder- Messprogramm Nord- und Ostsee
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
b.w.	Körpergewicht
CRM	krebserregend (C = cancer), mutagen (M), reproduktionstoxisch (R)
CWA	chemical warfare agents (chemische Kampfstoffe)
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPA	Diphenylamin
EC	Energetic compounds
EC₅₀	Mittlere Effektive Konzentration
EAWAG	Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz
eV	Elektronenvolt
fg	Femtogramm
f.w.	Feuchtgewicht
GC-MS/MS	Gaschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung
GHS	Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals
h	Stunde(n)
HCG	Hazard Control GmbH (HCG)
HMX	Oktozen, 1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-tetrazocan (CAS 2691-41-0)
IfaÖ	Institut für Angewandte Ökosystemforschung GmbH
ITAW	Institut für Terrestrische und Aquatische Wildtierforschung
K_{ow}	n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LC₅₀	Mittlere letale Konzentration
LfU	Landesamt für Umwelt, Schleswig-Holstein
LoD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)

LOEC	Lowest observed effect concentration
LoQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
LUNG	Landesamt für Umwelt, Naturschutz und Geologie, Mecklenburg-Vorpommern
m³	Kubikmeter
min	Minute(n)
mM	Millimol je Liter
MSRL	Meeresstrategie Rahmenrichtlinie
MUDAB	Meeresumweltdatenbank
MEKUN	Ministerium für Energiewende, Klimaschutz, Umwelt und Natur, Schleswig-Holstein
MW	Mittelwert
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
n	Umfang der Stichprobe
ng	Nanogramm
ng/g d.w.	Nanogramm je Gramm Trockenmasse
NLWKN	Niedersächsischer Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
OGewV	Oberflächengewässer Verordnung
pg	Picogramm
PTV	Programmed Temperature Vaporising
R²	Bestimmtheitsmaß
RDX	Hexogen, 1,3,5-Trinitro-1,3,5-triazinan (CAS 121-82-4)
rpm	Rounds per minute
SOP	Standard Operating Procedure
SPE	Solid Phase Extraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
SSL	Split-/splitless Injektor
STAbw	Standardabweichung
STV	Sprengstofftypische Verbindungen
Tetryl	N-Methyl-N-2,4,6-tetranitroanilin
THH	Tierärztliche Hochschule Hannover
TNT	2,4,6-Trinitrotoluol (CAS 118-96-7)
TGD-EQS	Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards
t.w.	Trockengewicht
U	Unit
UDEM	Umweltmonitoring für die Delaboration von Munition im Meer
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography

UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler
UPB	Umweltprobenbank des Bundes
UQN	Umweltqualitätsnorm
WRRL	Wasserrahmenrichtlinie

Zusammenfassung

Anlass und Forschungsfragen

Seit dem Ersten Weltkrieg gelangte Kriegsmunition im Tonnenmaßstab in Nord- und Ostsee. Die Eintragung ins Meer erfolgte auf verschiedenen Wegen: Während Kriegshandlungen, bei Übungen oder Manövern, aber auch während der Nachkriegszeit durch Verklappung oder militärischen Übungen in Friedenszeiten. Munition wurde zur Abwehr oder im Angriff verschossen, als Sperrwaffen wie beispielsweise Seeminen und zur U-Bootabwehr ausgebracht oder gelangte durch Schiffshavarien, Flugzeugabstürze und vor allem Verklappung durch die Alliierten am Ende des Zweiten Weltkrieges ins Meer. Das Verklappen erfolgte entlang der deutschen Küstenlinien in offiziellen Versenkungsgebieten der Nord- und Ostsee. Es war jedoch ebenfalls eine gängige Praxis, die Munition bereits auf dem Weg ins Versenkungsgebiet über Bord zu werfen. Munition im Meer wird heutzutage immer öfters zu einem Problem, da hierdurch Near- und Offshore Aktivitäten, wie z.B. das Bauen von Windparks und das Verlegen von Kabeltrassen und Pipelines, erheblich behindert werden können. Denn wie an Land kann auch im Wasser liegende Kriegsmunition nach wie vor zu einer Explosion führen. Kürzlich entdeckt und potenziell schwerwiegend ist die Tatsache, dass die Metallhüllen der versenkten Munitionsgüter nach mehr als 70 Jahren auf dem Meeresboden korrodieren, ihre toxischen Verbindungen austreten und sich in der Meeresumwelt verteilen.

Ein weiterer brisanter Aspekt ist nämlich neben der Explosionsgefahr die Toxizität von Sprengstoffen, wie beispielsweise Trinitrotoluol (TNT). Dieser Sprengstoff gehört zu den am häufigsten verwendeten Sprengstoffen weltweit. TNT und dessen Umbauprodukte wirken toxisch auf Wasserorganismen, aber auch auf den Menschen. Es konnten bereits unterschiedliche toxikologische Auswirkungen auf verschiedenste Wasserorganismen wie beispielsweise Seeigel (*Arbacia punctulata*), Schwebegarnelen (*Mysidopsis bahia*), Miesmuscheln (*Mytilus galloprovincialis*) sowie verschiedene Fischarten nachgewiesen werden. Neben letalen Effekten, von denen im besonderen Maße juvenile Tiere betroffen sind, können sprengstofftypische Verbindungen generell die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen, bei Jungtieren Wachstum und Entwicklung stören, Tumore verursachen, Zellfunktionen einschränken sowie zu Verschiebungen im Energiehaushalt führen, was zu einer allgemeinen Konditionsverschlechterung beitragen kann. Eine Anreicherung in der Nahrungskette durch Bioakkumulation wäre auch für den Menschen durch den Verzehr von Fisch und Meeresfrüchten gefährlich, da TNT sowohl akut als auch chronisch toxisch wirkt. Akut kann TNT beim Menschen Gelbsucht, Anämie und eine Schädigung des zentralen Nervensystems bewirken, wobei es als Blutgift vor allem den Sauerstofftransport vermindert, da es Hämoglobin zu Methämoglobin umsetzt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TNT sowohl kanzerogen als auch mutagen wirkt. Für die Bewertung des Gefahrenpotentials von TNT sind jedoch auch dessen Hauptumbauprodukte 4- und 2-Aminodinitrotoluol (4- und 2-ADNT) zu berücksichtigen. Diese sind kaum weniger giftig als TNT selbst und wirken ebenfalls mutagen und karzinogen.

Auch wenn chemische Kampfstoffe (CWA) mengenmäßig einen bedeutend geringeren Teil der im Meer versenkten Munition ausmachen, so gehen von dieser Substanzgruppe nach wie vor erhebliche Gefahren aus. Sie wurden entwickelt, um Personen direkten Schaden zum Beispiel in Kampfeinsätzen zuzufügen. Diese Gefahren gehen deswegen auch noch heute von chemischer Munition aus, wenn sie in Granaten, Bomben oder Lagerbehältnissen wie Fässern in die Meere eingetragen wurden. Von CWA und Begleitsubstanzen, aus der Produktion oder auch Abbauprodukte, gehen jedoch auch akute und chronische Gefahren für die marine Ökosphäre aus. So wurden beispielsweise negative Auswirkungen auf Miesmuscheln und Wasserflöhe durch Senfgas und arsenhaltige Kampfstoffe in Laborversuchen festgestellt.

Das Forschungsprojekt setzt sich aus vier Arbeitspaketen zusammen. Im Fokus der geplanten Untersuchungen standen Zeitreihen (Arbeitspaket 1), räumliche Untersuchungen (Arbeitspaket 2), Anreicherungen entlang der marinen Nahrungskette (Arbeitspaket 3) sowie zusätzlich Untersuchungen auf chemische Kampfstoffe (Arbeitspaket 4).

Im Fokus der geplanten Untersuchungen des Arbeitspaketes 1 „Zeitreihen-Analyse von Proben der Umweltprobenbank auf Sprengstofftypische Verbindungen (STV)“ standen Zeitreihenuntersuchungen von Miesmuschelproben der Umweltprobenbank des Bundes. Die Muscheln entstammen den Jahresmischproben aus zwei Regionen der Nordsee und einer Ostseeregion. Die Sammlungen in den Nordseeregionen (Eckwarderhörne und Königshafen) werden seit Mitte der achtziger Jahre durchgeführt. Muscheln aus der Ostseeregion Darßer Ort werden seit 1992 beprobt. Für die Zeitreihenuntersuchung wurden alle in der Umweltprobenbank vorhandenen Jahrgänge bis 2018 auf Sprengstofftypische Verbindungen (STV) untersucht. Des Weiteren wurden Aalmutterleberproben der Umweltprobenbank aus den Jahren 2005 und 2019 ebenfalls auf STV untersucht.

Im Arbeitspaket 2 „Untersuchungen zur räumlichen Verteilung der STV“ wurde an ausgewählten Matrices (Sediment, Muscheln, Plattfisch) die flächenartige Ausdehnung der STV in Nord- und Ostsee ermittelt. Das Ziel war es abzuschätzen, ob sich STV in der Nord- und Ostsee unterschiedlich verteilen und es Gebiete gibt, in denen STV besonders stark in den verschiedenen Matrices auftreten. Diese Analysen wurden mit historischen und aktuellen Daten in entsprechenden digitalen Plattformen wie das Munitionskataster AmuCad® verglichen, um mögliche „Hot spots“ der Freisetzung von STV zu identifizieren.

Für Arbeitspaket 3 „Untersuchungen zur möglichen Anreicherung von STV im marinen Nahrungsnetz“ wurden mögliche Vorkommen von sprengstofftypischen Verbindungen in marinen Lebewesen aus unterschiedlichen trophischen Ebenen untersucht. Das Ziel war es, einen ersten Nachweis zu erbringen, ob sich STV in den unterschiedlichen marinen Spezies finden lassen und um mögliche Einflüsse auf das marine und humane Nahrungsnetz abzuschätzen. Dafür stellte das Umweltbundesamt über Dritte entsprechendes Probenmaterial zur Verfügung. Neben Fischen und Eiderenten wurden auch Proben von Spitzenprädatoren wie Seehunde und Schweinswale auf mögliche Belastungen untersucht werden.

Im Arbeitspaket 4 „Belastung mit chemischen Kampfstoffen“ organisierte das UKSH als Forschungsnehmer die Analyse verschiedener chemischer Kampfstoffe in Verdachtsproben. Es wurden zwei Verdachtsproben aus dem Sediment der Flensburger Förde und insgesamt 12 Proben (acht Wasserproben und vier Sedimentproben) aus dem Bornholmbecken analysiert. Zusätzlich wurden die Daten aus der MUDAB Datenbank zu Arsen in Wasser, Sediment und Miesmuscheln ausgewertet. Die MUDAB-Daten zu Arsen sollten Hinweise auf das Vorhandensein von chemischen Kampfstoffen in den Beprobungsgebieten liefern, da etliche chemische Kampfstoffe arsenhaltig sind. Das betrifft vor allem Nasen- und Rachenkampfstoffe sowie Hautkampfstoffe und den Lungenkampfstoff Arsin (Arsenwasserstoff).

Methoden und Arbeitsschritte

Vor Beginn der eigentlichen Zeitreihenuntersuchungen in Arbeitspaket 1 wurden umfassende Validierungen der Probenaufarbeitung sowie der analytischen Messung mittels GC-MS/MS durchgeführt. Dies umfasste Untersuchungen der Beschaffenheit des Ausgangsmaterials der verwendeten Miesmuschelproben. Konkret wurde untersucht, ob kryogemahlene oder gefriergetrocknete Proben für eine Extraktion möglicher STV besser geeignet sind. In einem zweiten Schritt wurde untersucht, wie sich die Aufarbeitung und Extraktion der Muschelproben verbessern lassen kann. Dies ist aus zweierlei Hinsicht von Bedeutung: Zum einen sollte durch die Aufarbeitungsmethode eine möglichst vollständige Extraktion möglicher eventueller

Gewebebelastungen mit STV erfolgen. Zum anderen ist es für die anschließende GC-MS/MS Analytik von entscheidender Bedeutung, so wenig störende Begleitsubstanzen aus den Muscheln in den aufgearbeiteten Proben wie möglich zu haben. Der dritte Optimierungskomplex umfasste das Variieren von Geräteparametern an der GC-MS/MS sowie das Austesten von optimalen Gerätekomponenten wie Injektionssysteme und Trennsäulen.

Auf Grundlage der optimierten Methoden wurden die Miesmuscheln der Zeitreihen entsprechend aufgearbeitet und vermessen. Die Muscheln und Aalmutterlebern wurden auf die Sprengstofftypischen Verbindungen TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 1,3-DNB sowie 2,4-DNT untersucht.

Die Probennahme für die räumliche Verteilung der STV in Arbeitspaket 2 wurde mit den drei Bundesländern Mecklenburg-Vorpommern, Schleswig-Holstein und Niedersachsen im Rahmen des Begleitkreises abgestimmt und organisiert. Die Probennahme wurde als Erweiterung des Biota-Schadstoffmonitorings der Länder im Rahmen des Bund/Länder Messprogramms Nord- und Ostsee (BLMP) an den Muschelstationen des BLMP durch die Küstenländer bzw. deren Auftragnehmer durchgeführt. Die Proben aus Niedersachsen und Mecklenburg-Vorpommern stammen jeweils von acht Probennahmelokationen, aus Schleswig-Holstein gab es einen Probennahmeort in der Ostsee. Die Sediment-, Miesmuschel- und Fischproben wurden mit Acetonitril extrahiert, aufkonzentriert und anschließend mittels GC-MS/MS und im späteren Projektverlauf zusätzlich mittels LC-MS/MS analysiert.

Für das Arbeitspaket 3 wurden Plattfisch, Aalmuttern, Eiderenten und marine Säuger (Seehunde und Schweinswale) zur Verfügung gestellt. Den Tieren wurden unterschiedliche Organe entnommen und diese auf eine mögliche Belastung mit sprengstofftypischen Verbindungen untersucht. Für die Analyse der unterschiedlichen Gewebetypen wurden auf die jeweilige Gewebeart optimierte Aufarbeitungsmethoden entwickelt und entsprechende Methoden zum Nachweis sprengstofftypischer Verbindungen mittels GC-MS/MS und LC-MS/MS etabliert. Für Gallen- und Leberproben der verschiedenen Spezies wurde eine Aufarbeitung durch Inkubation mit β -Glucuronidase von *Helix pomatia* und anschließender Festphasenextraktion entwickelt. Die Behandlung mit β -Glucuronidase ist ein übliches Verfahren zur Gesamtbilanzierung von Stoffen, die über die Leber ausgeschieden werden. Denn in den meisten Spezies werden im Phase-II-Metabolismus in der Leber Glucuronsäure-Konjugate gebildet und über die Galle in den Darm ausgeschieden. Die Behandlung mit β -Glucuronidase führt in diesem Fall zur Spaltung von STV-Glucuroniden in die ursprünglichen STV-Monosubstanzen und Glucuronsäure. Somit können diese STV in der GC-MS/MS oder LC-MS/MS Analyse mit detektiert werden. Die Aufarbeitung weiterer Organtypen wie Niere, Muskel und Gehirn erfolgte mittels Gefriertrocknung, Homogenisation, Extraktion durch Verwendung von Acetonitril und anschließender Festphasenextraktion.

Im Arbeitspaket 4 standen Analysen und Bewertungen bezüglich des Vorhandenseins chemischer Kampfstoffe sowie möglicher Bei- und Abbauprodukte in ausgewählten Verdachtsproben im Fokus. Die Proben stammen aus der Nähe des CWA-Versenkungsgebiets im Bornholmbecken sowie der Flensburger Förde. Die Sediment- und Wasserproben wurden von der Hazard Control GmbH mittels GC-MS auf verschiedene CWA untersucht. Des Weiteren wurden in diesem Arbeitspaket Daten der Meeresumweltdatenbank MUDAB bezüglich der Messungen von Arsen in Wasser, Sediment und Miesmuscheln aus Nord- und Ostsee ausgewertet. Die Aufbereitung der Daten erfolgte mit einem selbst geschriebenen Python-Script (Python 3.11.4).

Ergebnisse

Durch das Optimieren der Probenaufarbeitung sowie einer signifikanten Verbesserung von Geräteparametern bezüglich der GC-MS/MS Analytik, konnten die Nachweisgrenzen für

Sprengstofftypische Verbindungen erheblich abgesenkt werden. Die gerätespezifischen Nachweisgrenzen liegen aktuell in einem Bereich von 10 bis 50 fg/μL. Das Absenken von Nachweisgrenzen ist essentiell, wenn Substanzen bereits im Spurenbereich erfasst werden sollen, da zu hohe Nachweisgrenzen zur Folge hätten, dass eine Substanz nicht analytisch erfasst wird und es somit zu einem falsch negativen Ergebnis kommen kann. Für STV ist dies zwingend notwendig, da es sich um Verbindungen mit u.a. kanzerogen Potential handelt und somit auch niedrige Konzentrationen unter Umständen problematisch sein können.

Alle von der Umweltprobenbank des Bundes erhaltenen Miesmuschelproben wurden nach der neu etablierten Aufarbeitungsmethode extrahiert und auf den Gehalt an STV untersucht. Beginnend im Jahr 1999, konnten in den Miesmuscheln der UPB aus allen drei untersuchten Regionen erste Hinweise auf das Vorhandensein von STV erhalten werden. Ab den Jahren 2012 (Eckwarderhörne), 2013 (Königshafen) und 2017 (Darßer Ort) konnten mit hinreichender Wahrscheinlichkeit erste Messsignale sprengstofftypischer Verbindungen oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden. In den Proben der Sammlungen der Jahre 2019 und 2020 in der Region Eckwarderhörne (Niedersachsen) konnten zudem 2- und 4-ADNT geringfügig unterhalb der Quantifizierungsgrenze gemessen werden (2-ADNT 0,14 ng/g (t.w.), 4-ADNT 0,17 ng/g (t.w.)). Es zeichnet sich somit in allen untersuchten Regionen ab, dass sich auch in den zukünftig gesammelten Miesmuschelproben STV nachweisen lassen werden. Aufgrund voranschreitender Korrosion der Metallhüllen der im Meer liegenden Weltkriegsmunition ließe sich Extrapolieren, dass die STV Konzentrationen in den Muscheln zunehmen werden. Da bislang der Zustand der im Meer liegenden Munition weder punktuell noch allgemeingültig eingeordnet werden kann, ist es auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse noch nicht möglich abzuschätzen, ab wann unter Betrachtung der in Arbeitspaket 1 erhaltenen Ergebnisse ein kritischer Zeitpunkt für eine Umweltgefährdung eintreten könnte.

Im Arbeitspaket 2 konnten in Muschel- und Sedimentproben aus Mecklenburg-Vorpommern und Schleswig-Holstein keine STV nachgewiesen werden. Dies gilt ebenfalls für die untersuchten Miesmuschelproben aus Niedersachsen. In den Sedimentproben der Niedersächsischen Nordseeküste konnten dagegen eindeutig sprengstofftypische Verbindungen nachgewiesen werden. Diese lagen aber zum Teil unterhalb der Quantifizierungsgrenze. Die höchsten gemessenen STV-Konzentrationen betragen ca. 1 ng/kg Sediment. Die Proben stammten aus der Region Jade und Jadebusen sowie der Insel Norderney. In Galle und Filet von Plattfischen, die ebenfalls in der Niedersächsischen Nordsee gefangen wurden, konnten in allen Fanggebieten STV im niedrigen ng/ml bzw. ng/g nachgewiesen werden. In den untersuchten Regionen der Niedersächsischen Nordsee konnte somit gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen Munitionsvorkommen und dem Auftreten von STV in Sediment und Biota besteht. Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse kristallisieren sich im Bereich der Niedersächsischen Nordsee mehrere Hot Spots bezüglich der Freisetzung von STV heraus. Dazu zählen die Regionen im Bereich der Jade und des Jadebusens sowie die Ostfriesischen Inseln, hier vor allem Borkum und Baltrum.

In den im Rahmen des Arbeitspakts 3 untersuchten Eiderenten, Aalmuttern, Seehunde und Schweinswale konnten in keinem der Organe die STV 1,3-DNB, 2,4-DNT, TNT, 4-ADNT und 2-ADNT nachgewiesen werden. In den aus der niedersächsischen Nordsee stammenden Plattfischen konnten, wie in den Ergebnissen des Arbeitspaket 2 bereits dargestellt, sowohl in der Galle wie auch im Filet STV nachgewiesen werden. Die Konzentrationen liegen im niedrigen Nanogramm pro Gramm Bereich. In den Galleproben waren die TNT-Metabolite 2- und 4-ADNT die beiden dominierenden STV, wohingegen im Filet mehr TNT als ADNTs detektiert wurden. Das deutet auf eine Aufnahme von TNT aus dem Umgebungswasser hin und nicht auf eine Aufnahme über die Nahrung.

Im Herbst 2022 wurden im Rahmen einer von Greenpeace organisierten Probenexkursion Sediment- und Wasserproben in der Nähe des CWA Versenkungsgebiet im Bornholmbecken genommen und im Rahmen des Arbeitspakts 4 analysiert. Die Firma Hazard Control GmbH hat die Proben auf verschiedene CWA Gruppen untersucht. Dazu gehören Senfgas, N-Lost, Triphenylarsin, Clark I und II sowie verschiedene Abbau- und Beiprodukte. In keiner der untersuchten Proben konnten Rückstände der untersuchten CWA gefunden werden. Zwei Sedimentproben aus der Flensburger Förde wurden gezielt auf den arsenhaltigen Nasen- und Rachenkampfstoff Adamsit untersucht. In den beiden Proben konnten bis zu 40 mg/kg Adamsit nachgewiesen werden. Da Adamsit einen sehr niedrigen Dampfdruck besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht ohne weiteres aus dem Sediment verflüchtigt, zudem die Wasserlöslichkeit auch äußerst gering ist. Eine Gefährdung des Menschen durch inhalative Aufnahme aus so einem belasteten Sediment erscheint somit als sehr unwahrscheinlich, jedoch können bei Hautkontakt Rötungen auftreten. Da Adamsit arsenhaltig ist, könnte das belastete Sediment aber von im Boden lebenden Organismen aufgenommen werden. Eine chronische Arsenaufnahme kann eine Vielzahl von negativen Auswirkungen auf den Organismus haben. Dazu zählen neben vielen unspezifischen Symptomen vor allem Schäden am Nervensystem sowie bösartige Tumorerkrankungen.

Die Auswertungen der MUDAB Daten bezüglich der Arsenkonzentrationen in Wasser, Sediment und Miesmuscheln aus Nord- und Ostsee zeigen, dass diese Daten keinen Zusammenhang der Arsenkonzentrationen mit möglichen Munitionsvorkommen vermuten lassen. Generell liegen die durchschnittlichen Arsenkonzentrationen nur vereinzelt über der UQN von 40 mg/kg Sediment. Aber auch bei Helgoland, wo CWA verklappt wurden, sowie den Verdachtsgebieten in der Flensburger Förde und Wolgast sind keine höheren Arsenkonzentrationen gefunden worden, die Rückschlüsse auf mögliche CWA Vorkommen zulassen würden.

Summary

Content

Since the First World War, munitions have been entering the North Sea and Baltic Sea on a tonne scale. They entered the sea in various ways: During wartime operations, exercises or maneuvers, but also during the post-war period through dumping or military exercises in peacetime.

Ammunition was fired for defense or attack, deployed as barrage weapons such as sea mines and for anti-submarine defense or entered the sea through shipwrecks, shot down aircrafts and, above all, dumping by the Allies at the end of the Second World War. Dumping took place along the German coastline in official dumping areas in the North and Baltic Seas. However, it was also common practice to throw the munitions overboard on the way to the dumping area. Nowadays, munitions in the sea are increasingly becoming a problem, as they can significantly hinder nearshore and offshore activities, such as the construction of wind farms and the laying of cable routes and pipelines. This is because, just as on land, war munitions lying in the water can still lead to an explosion. Recently discovered and potentially serious is the fact that the metal casings of dumped munitions corrode on the seabed after more than 70 years, releasing their toxic compounds and dispersing them into the marine environment.

In addition to the risk of explosion, another aspect is the toxicity of explosives such as trinitrotoluene (TNT). This explosive is one of the most commonly used explosives in the world. TNT and its transformation products have toxic effects on aquatic organisms, but also on humans. Various toxicological effects on a wide range of aquatic organisms such as sea urchins (*Arbacia punctulata*), floating shrimps (*Mysidopsis bahia*), blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and various fish species have already been demonstrated. In addition to lethal effects, which particularly affect juvenile animals, energetic compounds can generally impair the ability to reproduce, disrupt growth and development in young animals, cause tumors, restrict cell functions and lead to shifts in the energy budget, which can contribute to a general deterioration in condition. Accumulation in the food chain through bioaccumulation would also be dangerous for humans through the consumption of fish and seafood, as TNT has both acute and chronic toxic effects. Acutely, TNT can cause jaundice, anaemia and damage to the central nervous system in humans. As a blood poison, it primarily reduces oxygen transport as it converts haemoglobin to methaemoglobin. It has also been shown that TNT is both carcinogenic and mutagenic. However, when assessing the hazard potential of TNT, its main metabolites 4- and 2-aminodinitrotoluene (4- and 2-ADNT) must also be taken into account. These are hardly less toxic than TNT itself and also have mutagenic and carcinogenic effects.

Even though chemical warfare agents (CWA) make up a significantly smaller proportion of the munitions dumped in the sea in terms of quantity, this group of substances continues to pose considerable dangers. They were developed to cause direct harm to people, for example in combat operations. This is why chemical munitions still pose these dangers today when they are released into the sea in grenades, bombs or storage containers such as barrels. However, CWA and accompanying substances, from production or degradation products, also pose acute and chronic risks to the marine ecosystem. For instance, negative effects on blue mussels and water fleas caused by mustard gas and arsenic-containing warfare agents have been identified in laboratory tests.

The research project comprises four work packages. The planned investigations focused on time series (work package 1), spatial investigations (work package 2), enrichment along the marine food chain (work package 3) and additional investigations into chemical warfare agents (work package 4).

The planned investigations of Work Package 1 "Time series analysis of samples from the Environmental Specimen Bank for energetic compounds (EC)" focused on time series analyses of blue mussel samples from the Federal Environmental Specimen Bank. The mussels originate from the annual mixed samples from two regions of the North Sea and one Baltic Sea region. The collections in the North Sea regions (Eckwarderhörne and Königshafen) have been carried out since the mid-1980s. Mussels from the Darßer Ort region of the Baltic Sea have been sampled since 1992. For the time series analysis, all vintages available in the environmental specimen bank up to 2018 were analyzed for energetic compounds. In addition, eelpout samples from the environmental specimen bank from 2005 and 2019 were also analyzed for EC.

In work package 2 "Investigations into the spatial distribution of energetic compounds", the areal extent of EC in the North and Baltic Seas was determined using selected matrices (sediment, blue mussels, flatfish). The aim was to estimate whether EC are distributed differently in the North and Baltic Seas and whether there are areas in which EC are particularly prevalent in the different matrices. These analyses were compared with historical and current data in corresponding digital platforms such as the AmuCad® Ammunition Cadastre Sea in order to identify possible "hot spots" of EC release.

For work package 3 "Investigations into the possible accumulation of energetic compounds in the marine food web", possible occurrences of EC in marine organisms from different trophic levels were investigated. The aim was to provide initial evidence as to whether EC can be found in various marine species and to assess possible influences on the marine and human food web. To this end, the Federal Environment Agency provided appropriate sample material via third parties. In addition to fish and eider ducks, samples from top predators such as seals and harbor porpoises were also examined for possible contamination.

In work package 4 "Contamination with chemical warfare agents", the UKSH organized the analysis of various chemical warfare agents in suspected samples. Two suspected sediment samples from the Flensburg Fjord and a total of 12 samples (eight water samples and four sediment samples) from the Bornholm Basin were analyzed. In addition, the data from the MUDAB database on arsenic in water, sediment and mussels were evaluated. The MUDAB data on arsenic should provide indications of the presence of chemical warfare agents in the sampling areas, as a number of chemical warfare agents contain arsenic. This mainly concerns Blue Cross agents as well as blister agents and the pulmonary agent arsine (hydrogen arsenide).

Methods and working steps

Before the start of the time series analyses in work package 1, comprehensive validation of the sample preparation and the analytical measurement using GC-MS/MS was carried out. This included analyses of the nature of the starting material of the mussel samples used. Specifically, it was investigated whether cryo-ground or freeze-dried samples are more suitable for extracting energetic compounds. In a second step, it was investigated how the processing and extraction of the mussel samples could be improved. This is important for two reasons: Firstly, the processing method should ensure that any possible tissue contamination with EC is extracted as completely as possible. Secondly, it is crucial for the subsequent GC-MS/MS analysis to have as few interfering accompanying substances from the mussels in the processed samples as possible. The third optimization complex comprised the variation of device parameters on the GC-MS/MS and the testing of optimal device components such as injection systems and separation columns.

Based on the optimized methods, the blue mussel samples in the time series were processed and measured accordingly. The mussels and eelpout livers were analyzed for the energetic compounds TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 1,3-DNB and 2,4-DNT.

Sampling for the spatial distribution of energetic compounds in work package 2 was coordinated and organized with the three federal states of Mecklenburg-Western Pomerania, Schleswig-Holstein and Lower Saxony as part of the monitoring group. The sampling was carried out by the coastal states or their contractors as an extension of the biota pollutant monitoring of the federal states within the framework of the Federal/State Monitoring Programme for the North Sea and Baltic Sea (BLMP) at the blue mussel stations of the BLMP. The samples from Lower Saxony and Mecklenburg-Western Pomerania were taken from eight sampling locations each, while one sampling location from Schleswig-Holstein was in the Baltic Sea. The sediment, mussel and fish samples were extracted with acetonitrile, concentrated and then analyzed using GC-MS/MS and, later in the project, additionally using LC-MS/MS.

Flatfish, eelpouts, eider ducks and marine mammals (seals and harbor porpoises) were provided for work package 3. Various organs were removed from the animals and analyzed for possible contamination with energetic compounds. For the analysis of the different tissue types, processing methods optimized for the respective tissue type were developed and corresponding methods for the detection of EC using GC-MS/MS and LC-MS/MS were established. For bile and liver samples of the different species, a processing method was developed by incubation with β -glucuronidase from *Helix pomatia* and subsequent solid phase extraction. Treatment with β -glucuronidase is a common procedure for the overall balancing of substances that are excreted via the liver. This is because in most species, glucuronic acid conjugates are formed in the liver during phase II metabolism and excreted via the bile into the intestine. In this case, treatment with β -glucuronidase leads to the cleavage of EC glucuronides into the original EC monosubstances and glucuronic acid. These EC can therefore also be detected in the GC-MS/MS or LC-MS/MS analysis. Other organ types such as kidney, muscle and brain were processed by means of freeze-drying, homogenization, extraction using acetonitrile and subsequent solid phase extraction.

Work package 4 focused on analyses and assessments regarding the presence of chemical warfare agents and possible by-products and degradation products in selected suspected samples. The samples were taken from the vicinity of the CWA dumping area in the Bornholm Basin and the Flensburg Fjord. The sediment and water samples were analyzed by the Hazard Control GmbH for various CWAs using GC-MS. Furthermore, data from the marine environmental database MUDAB were evaluated in this work package with regard to measurements of arsenic in water, sediment and mussels from the North Sea and Baltic Sea. The data was analyzed using a self-written Python script (Python 3.11.4).

Results

By optimizing sample preparation and significantly improving device parameters with regard to GC-MS/MS analysis, the detection limits for energetic compounds have been significantly improved. The device-specific detection limits are currently in the range of 10 to 50 fg/ μ L. The lowering of detection limits is essential if substances are to be detected at trace levels, as detection limits that are too high would mean that a substance is not detected analytically, which could lead to a false negative result. This is absolutely essential for EC, as they are compounds with carcinogenic potential and therefore even low concentrations can be problematic under certain circumstances.

All mussel samples received from the Federal Environmental Specimen Bank were extracted using the newly established processing method and analyzed for EC content. Starting in 1999, initial indications of the presence of EC were obtained in the mussels from the ESB from all three regions analyzed. From 2012 (Eckwarderhörne), 2013 (Königshafen) and 2017 (Darßer Ort), the first measurement signals of EC above the detection limit were detected with sufficient

probability. In the samples from the 2019 and 2020 collections in the Eckwarderhörne region (Lower Saxony), 2- and 4-ADNT were also measured slightly below the quantification limit (2-ADNT 0.14 ng/g (d.w.), 4-ADNT 0.17 ng/g (d.w.)). It is therefore becoming apparent in all the regions analyzed that EC will also be detected in the mussel samples collected in the future. Due to the advancing corrosion of the metal shells of the World War munitions lying in the sea, it can be extrapolated that the EC concentrations in the blue mussels will increase. As the condition of the munitions lying in the sea cannot yet be categorized either selectively or generally, it is not yet possible on the basis of the results obtained so far to estimate when a critical point in time for an environmental hazard could occur, considering the results obtained in work package 1.

In work package 2, no energetic compounds were detected in blue mussel and sediment samples from Mecklenburg-Western Pomerania and Schleswig-Holstein. This also applies to the mussel samples analyzed from Lower Saxony. In contrast, EC were clearly detected in the sediment samples from the North Sea coast of Lower Saxony. However, some of these were below the quantification limit. The highest EC concentrations measured were approx. 1 ng/kg sediment. The samples came from the Jade and Jade Bay region and the island of Norderney. In bile and fillet of flatfish, which were also caught in the North Sea of Lower Saxony, EC in the low ng/ml or ng/g range were detected in all fishing areas. In the investigated regions of the North Sea of Lower Saxony, it could thus be shown that there is a correlation between the presence of munitions and the occurrence of EC in sediment and biota. Based on the results presented here, several hot spots with regard to the release of EC have crystallized in the Lower Saxony North Sea. These include the regions around the Jade and the Jade Bay as well as the East Frisian Islands, in particular Borkum and Baltrum.

The energetic compounds 1,3-DNB, 2,4-DNT, TNT, 4-ADNT, and 2-ADNT could not be detected in any of the organs of the eider ducks, eelpouts, harbor seals and harbor porpoises examined as part of work package 3. In the flatfish from the North Sea of Lower Saxony, EC were detected in both the bile and the fillet, as already described in the results of work package 2. The concentrations are in the low nanogram per gram range. In the bile samples, the TNT metabolites 2- and 4-ADNT were the two dominant EC, whereas more TNT than ADNTs were detected in the fillet. This indicates an uptake of TNT from the surrounding water and not from food.

In autumn 2022, sediment and water samples were taken in the vicinity of the CWA damping area in the Bornholm Basin as part of a sampling excursion organized by Greenpeace and analyzed as part of Work Package 4. The company Hazard Control GmbH analyzed the samples for various types of CWA. These include mustard gas, N-Lost, triphenylarsine, Clark I and II as well as various degradation and by-products. No residues of the analyzed CWA were found in any of the samples tested. Two sediment samples from the Flensburg Fjord were analyzed specifically for the arsenic-containing Blue Cross agent adamsite. Up to 40 mg/kg of adamsite was detected in both samples. As adamsite has a very low vapor pressure, it can be assumed that it does not readily volatilize from the sediment, and its solubility in water is also extremely low. A risk to humans through inhalation from such a contaminated sediment therefore appears very unlikely, although reddening may occur on contact with the skin. However, as adamsite contains arsenic, the contaminated sediment could be ingested by organisms living in the soil. Chronic arsenic uptake can have a variety of negative effects on organisms. In addition to many unspecific symptoms, these include damage to the nervous system and malignant cancers.

Analyses of the MUDAB data on arsenic concentrations in water, sediment and mussels from the North Sea and Baltic Sea show that these data do not suggest any connection between arsenic concentrations and possible munitions deposits. In general, the average arsenic concentrations are only occasionally above the EQS of 40 mg/kg sediment. However, even at Helgoland, where

CWA were dumped, and the suspected areas in the Flensburg Fjord and Wolgast, no higher arsenic concentrations were found that would allow conclusions to be drawn about possible CWA deposits.

1 Hintergrund und Problemstellung

1.1 Munition im Meer: Quelle von Schadstoffen und Risiken für Meeresorganismen

Die Meere sind weltweit von einer "neuen" Verschmutzungsquelle bedroht: Millionen Tonnen aller Arten von Kriegsmaterial, das hauptsächlich aus den Kriegsaktivitäten des letzten Jahrhunderts resultiert, belasten die Meere, insbesondere die Küstenregionen (Beddington and Kinloch, 2005; Carton and Jagusiewicz, 2011). Der Großteil dieser Munition ist das Ergebnis von Verklappungsaktivitäten nach dem Ersten und Zweiten Weltkrieg, aber auch versunkene Unterwasserminensperren, nicht explodierte Kampfmittel und Wracks von Militärflugzeugen und Kriegsschiffen, die Munition mit sich führten, tragen zu diesem Problem bei. Insbesondere die Küstenstandorte in Europa, Nordamerika und im südwestlichen Pazifik sind stark betroffen (Monfils et al., 2006). So wird geschätzt, dass allein in den deutschen Teilen der Nord- und Ostsee ca. 1,6 Millionen Tonnen konventionelle Munition, die TNT und andere Explosivstoffe enthalten, und mehr als 5.000 Tonnen chemischer Kampfstoffe (Böttcher et al., 2011; Nehring, 2005) als Relikte aus den beiden Weltkriegen vorhanden sind. Darüber hinaus befindet sich eine unbekannte Menge moderner Munition der Bundesmarine, der ehemaligen Nationalen Volksarmee der Deutschen Demokratischen Republik, der NATO und der sowjetischen Marine in deutschen Gewässern (Nehring, 2008).

Relikte konventioneller und chemischer Munition unter Wasser stellen eine mehrfache Gefahr für menschliche Aktivitäten dar. Als größte Gefahr werden in erster Linie unkontrollierte Selbstdetonationen durch Schiffsverkehr (zivil und militärisch), Fischerei, Wassersport, Kabelanlagen, Windparks und Pipelines befürchtet. Mehr noch, nach langen Ruhezeiten unter Wasser nimmt die Empfindlichkeit der Sprengstoffe durch den Verfall stabilisierender Komponenten oder durch Rekristallisation zu (Pfeiffer, 2012). Bezogen auf chemische Munition können Personengruppen wie Fischer und Taucher direkt mit dieser in Kontakt kommen, wenn sie zum Beispiel beim Schleppnetzfishen an Bord geholt wird oder Taucher am Meeresgrund auf diese stoßen (Knobloch et al., 2013). Ebenso wäre ein indirekter Kontakt möglich über den Verzehr von belastetem Fisch oder Meeresfrüchten (Knobloch et al., 2013).

Potenziell schwerwiegend ist die Tatsache, dass die Metallhüllen der versenkten Munitionsgüter nach mehr als 70 Jahren auf dem Meeresboden korrodieren, ihre toxischen Verbindungen austreten und sich in der Meeresumwelt verteilen (Appel et al., 2018; Beck et al., 2022, 2019; Böttcher et al., 2011; Strehse et al., 2023, 2017). Explosive Chemikalien wie TNT und seine Metabolite sind für ihre Toxizität bekannt, ebenso für ihr krebserzeugendes und erbgutveränderndes Potenzial (Bolt et al., 2006; Sabbioni and Rumler, 2007). Des Weiteren stellen sie eine große Bedrohung für die Meeresumwelt dar (Talmage et al., 1999). Studien zur Toxizität im Aquarium und im Freiland mit Süßwasserorganismen und verschiedenen marinen Arten deuten darauf hin, dass die Konzentrationen explosiver Chemikalien an mit Munition kontaminierten Stellen aufgrund ihrer langsamen Auflösung und starken Verdünnung wahrscheinlich keine **akute** Toxizität für Biota aufweisen. Es gibt jedoch immer mehr Hinweise darauf, dass Chemikalien, die mit Munition in Verbindung stehen, subletale und **chronische** Effekte in aquatischen Biota, insbesondere in benthischen und epifaunalen Organismen, verursachen können (Ek et al., 2006, 2008; Juhasz and Naidu, 2007; Lotufo et al., 2013; Rosen and Lotufo, 2007a; Talmage et al., 1999). Es konnten zum Beispiel für TNT bereits unterschiedliche toxikologische Auswirkungen auf verschiedenste Wasserorganismen wie beispielsweise Seeigel (*Arbacia punctulata*), Schwebegarnelen (*Mysidopsis bahia*) und Seetang (*Ulva fasciata*) nachgewiesen werden (Nipper et al., 2001). Dazu gehören Einschränkungen im

Bereich des Wachstums und der Fortpflanzung, Krebserkrankungen sowie erhöhter (oxidativer) Stress im Allgemeinen (Lotufo et al., 2021; Nipper et al., 2001; Schuster et al., 2021; Strehse et al., 2020). Besonders in den Fokus rücken immer mehr die marinen Spezies, die auch dem Menschen als Nahrung dienen. Dazu zählen Meeresfrüchte wie Miesmuscheln (*Mytilus* spp.) sowie verschiedene Sorten Speisefisch, zum Beispiel Kliesche (*Limanda limanda* L.) und Atlantischer Seelachs (*Salmo salar*) (Koske et al., 2020; Mariussen et al., 2018; Strehse et al., 2017). Da letale wie auch subletale Effekte bereits bei TNT-Wasserkonzentrationen unterhalb von einem Milligramm je Liter beobachtet wurden (Beck et al., 2018), ist es zudem zwingend notwendig, die analytische Nachweisgrenze für STV weit möglichst abzusenken, um eine eindeutige Identifizierung wie auch Quantifizierung zu ermöglichen.

Trotz der beträchtlichen Mengen an austretenden explosiven Chemikalien ist wenig über die möglichen Auswirkungen auf die Meeresumwelt und die Meeresorganismen bekannt. Einerseits ist nicht klar, wie gut toxikologische Laborexperimente natürliche Gemeinschaften in der Meeresumwelt repräsentieren (Ek et al., 2008; Nipper et al., 2002, 2001). Andererseits ist die Bestimmung des Vorkommens von Munitionsbestandteilen in natürlichen Ökosystemen nach wie vor eine analytische Herausforderung. Eine weitere Gefahr neben der akuten Detonationsgefahr und der chronischen Gefährdung der Meeresumwelt besteht darin, dass austretende explosive Chemikalien in die marine Nahrungskette gelangen und sich beim Verzehr kontaminierter Meeresfrüchte direkt auf die menschliche Gesundheit auswirken können (Ek et al., 2008, 2007, 2006; Maser and Strehse, 2021).

Neben dem langsamen Durchrosten der Munitionskörper gibt es ein weiteres Problem. Um eine Gefährdung des heutigen Schiffsverkehrs oder der Installation von Pipelines und Offshore-Anlagen durch unkontrollierte und unvorhergesehene Explosionen zu verhindern, sind kontrollierte Sprengungen dieser gefährlichen Weltkriegsrelikte weltweit eine gängige Praxis. Zu diesem Zweck werden manuell Kontaktgeberladungen angebracht, die die Detonation dieser Munitionskörper einleiten. So genannte „Blast-in-Place Operationen“ der direkt vor Ort durchgeführten Munitionsbeseitigung (Koschinski and Kock, 2009) führen jedoch häufig zu einer unvollständigen (niederwertigen) Detonation, wobei erhebliche Mengen des Sprengstoffs in der Umwelt zurückbleiben (Kalderis et al., 2011; Maser et al., 2023a; Maser and Strehse, 2020; NATO, 2010; Pfeiffer, 2007).

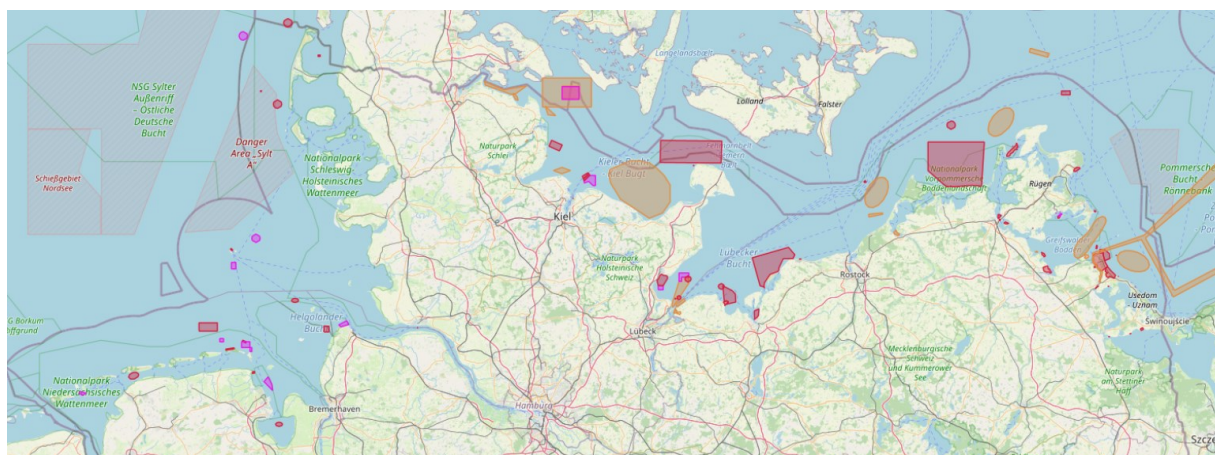
Auch wenn chemische Kampfstoffe mengenmäßig nur einen verhältnismäßig kleinen Anteil der Altmunition in der deutschen Nord- und Ostsee ausmachen, so geht auch von dieser Munitionsart Risiken für Mensch und Meeresumwelt aus. Da auch diese Stoffe metallumschlossen sind, korrodieren auch diese Behältnisse im Wasser und setzen ihre Inhaltsstoffe frei. Da die Behältnisse in der Regel dünnwandiger sind als jene von konventioneller Munition, muss deswegen davon ausgegangen werden, dass die Korrosion dieser Behältnisse bereits jetzt deutlich weiter fortgeschritten ist und es außerdem einen hohen Anteil komplett durchgerosteter Behältnisse geben wird (Frey, 2024). So konnten beispielsweise erhöhte Arsenkonzentrationen in Sedimentproben nachgewiesen werden, die in der Ostsee in der Nähe eines Versenkungsgebiets mit CWA genommen wurden (Bełdowski et al., 2016). Weitere Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass Rückstände von CWA noch in bis zu 250 Metern Entfernung von den entsprechenden Munitionskörpern im Sediment nachweisbar sind (Vanninen et al., 2020).

Neben den akuten Gefahren für Leib und Leben haben chemische Kampfstoffe auch chronische Folgen, da sie zum Teil krebserzeugendes und/oder erbgutveränderndes Potenzial haben (Baršienė et al., 2014; Höher et al., 2019). Laborstudien zur Toxizität an unterschiedlichen marinen Spezies und Süßwasserorganismen deuten darauf hin, dass von chemischer Munition Gefahren für die untersuchten Arten ausgehen können. Dies gilt sowohl für die chemischen

Ausgangssubstanzen wie auch für deren hydrolysierte und oxidierte Verbindungen. Dies konnte zum Beispiel für arsenhaltige CWA und Senfgas anhand von *Daphnia magna* gezeigt werden (Czub et al., 2021, 2020). Wie auch bei den konventionellen Sprengstoffen rücken auch in Bezug auf CWA immer mehr die marinen Spezies in den Fokus, da sie nicht nur Bestandteil des marinen Nahrungsnetzes sind, sondern auch dem Menschen als Nahrungsmittel dienen. So bioakkumulieren Miesmuscheln (*Mytilus trossulus*) oxidierte Formen der arsenhaltigen Kampfstoffe Clark I und Adamsit und zeigen zudem negative Auswirkungen auf den Gesundheitsstatus auf subzellulärer und funktioneller Ebene (Höher et al., 2019). Ebenfalls wiesen in einer 2014 veröffentlichten Studie Flundern (*Platichthys flesus*), Hering (*Clupea harengus*) und Atlantischer Kabeljau (*Gadus morhua*), die in der Nähe eines Gebietes mit verklappter chemischer Munition gefangen wurden, einen erhöhten Grad an geno- und cytotoxischen Schäden im Vergleich zu Fischen aus einem Referenzgebiet auf (Baršienė et al., 2014). Bisher gibt es jedoch nur sehr wenige Studien in denen marine Spezies auf Rückstände chemischer Kampfstoffe untersucht wurden, die in der Nähe von Verklappungsgebieten gefangen worden sind. So konnten zum Beispiel Spuren von arsenhaltigen CWA-Rückständen in Kabeljau detektiert werden, der in der Nähe der schwedischen Küste beim Munitionsversenkungsgebiet Måseskär gefangen wurden (Niemikoski et al., 2017).

Aus den Daten des Munitionskatasters AmuCad lässt sich deutlich erkennen, dass die deutschen Gewässer der Nord- und Ostsee großflächig mit Altmunition belastet sind (Abbildung 1). Durch diese ausgedehnte räumliche Verteilung von Altmunition und der Tatsache, dass immer mehr Munitionskörper rosten und ihre chemischen Munitionsbestandteile freisetzen, muss damit gerechnet werden, dass sich die austretenden STV und CWA in den verschiedenen deutschen Küstenregionen in Biota wie auch in Wasser und Sediment finden lassen können. Von besonderem Interesse ist natürlich die Frage, inwieweit sich aus Altmunition stammende Chemikalien in der marinen und humanen Nahrungskette detektieren lassen und welche Rückschlüsse für die unterschiedlichen trophischen Ebenen zur Belastung gezogen werden können.

Abbildung 1: Schematische Übersicht der munitionsbelasteten Flächen (konventionelle Munition und CWA) der deutschen Bereiche von Nord- und Ostsee



Rot = Munitionsbelastete Fläche, Orange = Munitionsverdachtsfläche, Lila = Munitionsversenkungsgebiet

Quelle: www.amucad.org abgerufen am 06.10.2021

1.2 Gegenstand des Forschungsprojekts

Im Rahmen des vorliegenden Forschungsprojekts wurden verschiedene biologische Proben (Miesmuscheln, Flundern, Aalmuttern, Eiderenten, Schweinswale und Seehunde; Abbildung 2)

und Sedimentproben auf Sprengstofftypische Verbindungen (STV) sowie ihre Metabolite untersucht. Des Weiteren wurden Wasser- und Sedimentproben auf Rückstände ausgewählter CWA untersucht. Die gewonnenen Daten wurden zudem toxikologisch bewertet. Im Fokus der geplanten Untersuchungen stehen dabei Zeitreihen, räumliche Untersuchungen, Anreicherungen entlang der marinen Nahrungskette sowie zusätzlich die erwähnten Untersuchungen auf chemische Kampfstoffe.

Abbildung 2: Beispielaufnahmen der untersuchten Spezies (von links nach rechts, von oben nach unten: Miesmuscheln, Flunder, Aalmutter, Eiderenten, Schweinswale, Seehund)



Quelle (v.l.n.r.v.o.n.u.): NLWKN, © Hans Hillewaert¹, UPB-Projektgruppe Trier, Stephanie Gross ITAW, © Ecomare/Sytske Dijkse – Ecomare², ITAW

In einem Arbeitspaket soll untersucht werden, ob sich seit Mitte der 80er Jahre sprengstofftypische Verbindungen aus versenkter Kriegsmunition lösen und in Miesmuscheln und Aalmuttern der routinemäßigen Sammlungen der Umweltprobenbank des Bundes nachweisen lassen und wie diese Konzentrationen zu bewerten sind. Auf dieser Grundlage können sich Rückschlüsse ziehen lassen, inwiefern künftig weitere Korrosion der Metallhüllen der Munition die Meeresökosysteme und letztlich ggf. den Menschen durch die austretenden Chemikalien gefährden könnte (Arbeitspaket 1).

In einem zweiten Arbeitspaket soll an ausgewählten Matrices (Sediment, Muscheln und Fisch) die räumliche Ausdehnung der STV und ihrer Metabolite gemessen und bewertet werden, um mögliche „hot spots“ der Freisetzung von STV zu identifizieren. Diese Erkenntnisse könnten eine Diskussionsgrundlage bilden, um zu prüfen, ob an den untersuchten Stationen ein regelmäßiges Monitoring-Programm etabliert, eventuelle Räumungsmaßnahmen eingeleitet oder ein Fischfangverbot oder eine Einschränkung von Aquakultur-Systemen in diesen Bereichen in Erwägung gezogen werden sollten (Arbeitspaket 2).

Ein drittes Arbeitspaket soll eine Aussage ermöglichen, ob es im marinen Nahrungsnetz zu einer Anreicherung von STV und deren Metaboliten kommt. Dazu sollen verschiedene Tierspezies

¹ https://de.wikipedia.org/wiki/Flunder#/media/Datei:Platichthys_flesus_1.jpg CC BY-SA 4.0

² [https://de.wikipedia.org/wiki/Schweinswale#/media/Datei:Ecomare_-_bruinvissen_Michael_en_Jose_2012_\(bruinvissen-michael-jose2012-1551-sd\).jpg](https://de.wikipedia.org/wiki/Schweinswale#/media/Datei:Ecomare_-_bruinvissen_Michael_en_Jose_2012_(bruinvissen-michael-jose2012-1551-sd).jpg) CC BY-SA 4.0

entlang der evolutiven Reihe auf deren Gehalt an STV analysiert und bewertet werden (Arbeitspaket 3).

Neben den quantitativ vorherrschenden sprengstofftypischen Verbindungen 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) und seinen Metaboliten 2-Amino-4,6-dinitrotoluol (2-ADNT) und 4-Amino-2,6-dinitrotoluol (4-ADNT) gibt es noch weitere Explosivstoffe aus der Reihe der Nitroaromaten, wie 2,4- und 2,6-Dinitrotoluol (DNT), 1,3,5-Trinitrobenzol (1,3,5-TNB), 1,3-Dinitrobenzol (1,3-DNB), 2,4,6-Trinitrophenylmethylnitramin (Tetryl) und 2,4,6-Trinitrophenol (Pikrinsäure). Vorkommende Nitramine sind Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) und Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX). Die beide letztgenannten sind möglicherweise aus quantitativer Sicht relevant, aber toxikologisch nicht so problematisch wie die Nitroaromaten TNT, 2-ADNT und 4-ADNT.

Im letzten Arbeitspaket sollen zur Abschätzung der Verteilung chemischer Kampfstoffe und deren Abbauprodukten vorhandene Messergebnisse von Arsen aus dem Bund-Länder Messprogramm Nord- und Ostsee (BLMP) dargestellt und bewertet werden (Arbeitspaket 4). Des Weiteren sollen ausgewählte Verdachtsproben auf Rückstände verschiedener CWA untersucht werden.

Chemische Kampfstoffe wurden entwickelt um Menschen zu töten oder kampfunfähig zu machen oder die Sicht zu beeinträchtigen (Augen- und Nebelkampfstoffe). Je nach Stoffeigenschaft werden CWA in verschiedene Gruppen eingeteilt. Dazu gehören Nasen- und Rachenkampfstoffe wie Arsinöl, Clark 1-3 und Adamsit, Lungenkampfstoffe wie Phosgen, Hautkampfstoffe wie Lost/Senfgas und Lewisit 1-3 und Nervenkampfstoffe wie Tabun und Sarin. Diese und viele weitere Substanzen wie auch weitere Substanzklassen wurden in Nord- und Ostsee verklappt.

1.2.1 Kurzbeschreibung der untersuchten STV und CWA

Im folgenden Abschnitt werden die im Rahmen der durchgeführten Analysen untersuchten STV und CWA vorgestellt.

1.2.1.1 Sprengstofftypische Verbindungen

Trinitrotoluol

Der sekundäre Sprengstoff Trinitrotoluol (TNT) gehört zur Gruppe der Nitroaromaten und ist Hauptbestandteil fast aller Munitionsformulierungen (Juhász and Naidu, 2007). Zudem wird und wurde er auch zu zivilen Zwecken verwendet, zum Beispiel im Bergbau. TNT hat einen niedrigen Schmelzpunkt und ist thermisch und chemisch stabil. Um ihn zu zünden ist ein Sprengzünder erforderlich. Die Löslichkeit von TNT in Wasser ist abhängig von der Wassertemperatur. Sie beträgt bei Raumtemperatur in etwa 130 mg/L (Juhász and Naidu, 2007). Zu den Hauptmetaboliten gehören 2-Amino-4,6-dinitrotoluol (2-ADNT) und 4-Amino-2,6-dinitrotoluol (4-ADNT). Sie entstehen bei der biotischen Transformation durch die Reduktion der jeweiligen Nitrogruppe zu einer Aminogruppe (Juhász and Naidu, 2007). Das akute wie auch chronische toxische Potenzial, sowie die Kanzerogenität und Mutagenität, lassen sich darauf zurückführen, dass TNT in der Lage ist oxidativen Stress in einem Organismus hervorzurufen (Bolt et al., 2006; Koske et al., 2020; Strehse et al., 2017; Talmage et al., 1999). Dieser kann wiederum die DNA, Zellbestandteile und Enzyme schädigen, ihre Funktionen einschränken oder zum Zelltod führen. In Studien konnten bereits schädliche Auswirkungen auf den Menschen und die Fauna belegt werden. Dies zeigen zum Beispiel die Reviews von Bolt et al. (2006) und Beck et al. (2018).

Aminodinitrotoluole

Die nitroaromatischen Verbindungen 2- und 4-Aminodinitrotoluol gehören zu den beiden Hauptmetaboliten, die aus TNT durch biotische Transformation entstehen. Sie werden von Bakterien gebildet, entstehen aber auch im humanen Metabolismus, wie auch in einer Reihe von Tierspezies wie beispielsweise Muscheln und Fischen (Ek et al., 2005; Mariussen et al., 2018; Strehse et al., 2017). Es gibt Hinweise, dass vornehmlich 4-ADNT gebildet wird und mengenmäßig weniger der Metabolit 2-ADNT (Mariussen et al., 2018; Strehse et al., 2020). Die Toxizität der Aminodinitrotoluole wird im Vergleich zur Muttersubstanz je nach Studie unterschiedlich bewertet. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass Aminodinitrotoluole über ein ähnliches kanzerogenes Potenzial verfügen wie TNT selbst (Bolt et al., 2006).

Dinitrotoluole

Eine weitere Substanzgruppe nitroaromatischer Verbindungen sind Dinitrotoluole. Das 2,4-Dinitrotoluol ist ein Zwischenprodukt bei der Herstellung von TNT. Je nach Güte der TNT-Herstellung kann 2,4-DNT somit in variierenden Anteilen im TNT enthalten sein und somit ebenfalls in TNT-haltigen Sprengstoffgemischen wie Schießwolle. Das 2,4-DNT ist wie auch TNT schwer wasserlöslich und bei höheren Temperaturen thermisch instabil. Zudem ist es selbst ebenfalls explosionsfähig. Nach der GHS-Gefahrstoffkennzeichnung³ wird 2,4-Dinitrotoluol als krebserzeugend eingestuft (Carc. 1B). Zudem ist es möglicherweise fruchtschädigend (Repro. 2) und erbgutverändernd (Muta. 2). Im Menschen wurden vor allem Schädigungen des Urothelialtraktes beobachtet (Bolt et al., 2006). Es kann durch Hautresorption aufgenommen werden. Laut GHS-Gefahrstoffkennzeichnung ist 2,4-Dinitrotoluol gewässergefährdend.

Dinitrobenzole

Dinitrobenzole können ebenfalls bei der Herstellung von TNT entstehen, wenn Benzol anstatt des eigentlich zur Herstellung von TNT benötigte Toluol nitriert wird. Es zählt somit zu den bei der Herstellung von TNT entstehenden Verunreinigungen. Das Isomer 1,3-Dinitrobenzol ist aufgrund seines Schmelz- und Siedepunkts analytisch gut erfassbar. Dinitrobenzole sind sowohl für den Menschen, wie auch für Wasserorganismen akut toxisch. Ebenso geht von ihnen eine krebserzeugende Wirkung aus (Bolt et al., 2006).

Hexogen

Chemisch betrachtet gehört der sekundäre Sprengstoff Hexogen (RDX, systematischer Name 1,3,5-Trinitro-1,3,5-triazinan) zur Gruppe der Nitramine. Die Nitrogruppen sind im Molekül dementsprechend nicht wie bei TNT an ein Kohlenstoffatom gebunden, sondern an ein im acyclischen Ringsystem vorkommenden Stickstoff. RDX gilt als der kraftvollste und brisanteste der militärischen Sprengstoffe (Juhász and Naidu, 2007). Die Wasserlöslichkeit wird bei 20°C mit 42 mg/L angegeben, der Schmelzpunkt liegt bei 204°C (Juhász and Naidu, 2007). RDX ist bis heute Bestandteil vieler Sprengstoffformulierungen wie Amatex, Composition A und B sowie Torpex. Allgemein bekannt ist RDX als Hauptbestandteil (91 %) des sogenannten „Plastiksprengstoffs“ C-4. Das toxische Potential von RDX scheint deutlich geringer zu sein als das von TNT und seinen Metaboliten. Trotzdem konnten in Studien auch für RDX Beeinträchtigungen von Meeresorganismen nachgewiesen werden wie beispielsweise auf die Reproduktion von Polychaeten (Lotufo et al., 2017). Auch wurden für RDX genotoxische Effekte nachgewiesen (Inouye et al., 2009).

³ <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32008R1272>

Oktogen

Das ebenfalls zur Gruppe der Nitramine zählende Oktogen (HMX, systematischer Name Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocin) wurde 1942 als Nebenprodukt bei der Synthese von RDX isoliert. Es ist wie TNT und RDX ein sekundärer Sprengstoff. HMX ist praktisch unlöslich in Wasser und schmilzt sowie zersetzt sich ab ungefähr 270°C (Akhavan, 2018). Die Detonationsgeschwindigkeit ist höher als die von TNT aber vergleichbar mit der von Hexogen. Zudem ist HMX reib- und schlagempfindlich. Für HMX konnten bisher keine toxischen Wirkungen gezeigt werden. Auch scheint es keine genotoxischen Eigenschaften zu haben (Beck et al., 2018).

RDX und HMX wurden im 2. Weltkrieg anteilig zu verschiedenen Sprengstoffgemischen zugegeben. Die Produktionszahlen im Deutschen Reich liegen bisher nur schätzungsweise vor. Je nach Kriegsjahr wird von drei bis 12 % ausgegangen, bezogen auf die Gesamtmenge an produzierter Munition (Wichert, 2023). Da HMX als Nebenprodukt der RDX Synthese entsteht, beziehen sich die genannten Zahlen auf die Produktion beider Sprengstoffe. Produktionsmengen und somit mögliche vorkommende Munition in der deutschen Nord- und Ostsee durch die Alliierten liegen bis dato nicht vor.

1.2.1.2 Chemische Kampfstoffe

Im 1. Weltkrieg wurde eine Vielzahl unterschiedlichster Chemischer Kampfstoffe (CWA) produziert und eingesetzt. Auch wenn 1925 der Einsatz von CWA durch das Genfer Protokoll untersagt wurde, wurden Chemische Kampfstoffe weiterhin von vielen Nationen produziert. Im 2. Weltkrieg kamen in Europa diese jedoch nicht zum Einsatz, jedoch kam es immer wieder zu Unfällen mit versehentlicher Freisetzung zum Beispiel während der Produktion oder des Transports (Czub et al., 2021, 2020). Weltweit gesehen wurden bis 1945 schätzungsweise 500 000 Tonnen chemischer Kampfstoffe produziert, wovon knapp 12 % arsenhaltige CWA waren (SIPRI, 1971). Wie auch konventionelle Munition, wurden auch CWA nach den Kriegen in erheblichen Mengen in den Meeren verklappt (Knobloch et al., 2013).

Clark I

Diphenylarsanchlorid wurde im 1. Weltkrieg erstmalig als chemischer Kampfstoff aus der Gruppe der Nasen-Rachen-Reizstoffe eingesetzt und gehört zu den sogenannten Maskenbrechern, da es sehr stark die oberen Atemwege reizt und Brechreiz hervorruft. Als Folge wurden die vor anderen chemischen Kampfstoffen schützenden Masken abgenommen. Clark I ist schwer wasserlöslich mit ca. 0,2 g/L (Perry and Green, 2008), weist eine hohe Stabilität auf und ist auf der anderen Seite leicht substituierbar, so dass in der Umwelt durch u.a. Hydrolyse und Oxidation eine Vielzahl an Umwandlungsprodukten entstehen können (Haas et al., 1998). Bezüglich möglicher ökotoxikologischer Auswirkungen von CWA auf die marine Ökosphäre ist die generelle Datenlage sehr gering, was auch für Clark I gilt. Es konnten negative Effekte auf funktionaler und subzellulärer Ebene für Miesmuscheln (*Mytilus trossulus*) durch Clark I festgestellt werden (Höher et al., 2019). Im *Daphnia magna* Immobilisierungstest nach OECD 202 wurde Clark I zudem als sehr toxisch eingestuft (Czub et al., 2021; OECD, 2004).

Clark II

Diphenylarsincyanoimid wurde ebenfalls im 1. Weltkrieg als Nasen- Rachenreizstoff eingesetzt und verursacht neben Übelkeit und Erbrechen zudem Kopfschmerzen. Als weitere Folge kann es zu potentiell tödlichen Lungenödemen führen. Über die Ökotoxizität von Clark II ist nach bisheriger Recherche nichts bekannt.

Triphenylarsin

Das in Wasser nahezu unlösliche Triphenylarsin ist ein Bestandteil des Arsinöls, was zu den Nasen- Rachenreizstoffen gehört. Nach dem global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS)⁴ wurde Triphenylarsin für den Menschen als giftig eingestuft sowie als umweltschädlich. Im *Daphnia magna* Immobilisierungstest nach OECD 202 wurde Triphenylarsin zudem als toxisch eingestuft (Czub et al., 2021; OECD, 2004).

Adamsit

Ein weiterer Nasen-Rachen-Reizstoff (detaillierte Beschreibung siehe Clark I) ist das ebenfalls zur Gruppe der arsenhaltigen CWA gehörende Adamsit (10-Chlor-5,10-dihydrophenarsazin). Laut GESTIS-Stoffdatenbank⁵ ist Adamsit bei Raumtemperatur fest und praktisch unlöslich in Wasser (0,064 g/L) (Olajos and Stopford M.D., 2004). Nach GHS² ist Adamsit giftig für den Menschen, sowie sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung. Im *Daphnia magna* Immobilisierungstest nach OECD 202 wurde Adamsit als sehr toxisch eingestuft (Czub et al., 2021; OECD, 2004). Die LC₅₀ wird mit 55,6 und 74,3 µg/L (zuzüglich Standardabweichung) angegeben, die EC₅₀ mit 44,4 und 71,5 µg/L (zuzüglich Standardabweichung) (Czub et al., 2021). Bei Hautkontakt kommt es zu leichten Hautreizungen (Rötungen). Adamsit wirkt als Sternutator auf die tieferen Atemwege. Bei Aufnahme über die Atemwege kommt es nach einer Latenzzeit von einigen Minuten (bis zu 15 min) zu starken Schmerzen im Brustraum, unter dem Brustbein und auch im Kieferbereich. Die Symptome klingen an frischer Luft relativ schnell ab (nach 30-60 min). Bei oraler Aufnahme scheint es kaum verstoffwechselt zu werden, zumindest wurde berichtet, dass es beim Verschlucken nicht zu schwerwiegenden Vergiftungen kam. Wahrscheinlich ist das auch durch die geringe Löslichkeit bedingt. Die Schwellenkonzentration beim Menschen liegt bei 0,1 mg pro min und m³.

Hexachlorethan

Hexachlorethan wurde als Substanz militärisch zur künstlichen Nebelbildung eingesetzt. Als Reinsubstanz ist Hexachlorethan fest und praktisch unlöslich in Wasser. Der GESTIS-Stoffdatenbank⁶ konnten folgende ökotoxikologischen Daten entnommen werden: LC₅₀ Fisch (96 Stunden) 1,32 mg/L (Medianwert), LC₅₀ Krustentiere (48 Stunden) 2,9 mg/L (Medianwert), EC₅₀ Krustentiere (48 Stunden) 4,3 mg/L (Medianwert), EC₅₀ Algen (96 Stunden) 90,1 mg/L (Medianwert).

Senfgas

Das auch als Yperit oder S-Lost bezeichnete Senfgas gehört zur Gruppe der Gelbkreuzkampfstoffe (Hautkampfstoffe). Seit 1913 wurde es in Waffen eingesetzt und ab 1916 auf den Kriegsschauplätzen des 1. Weltkriegs (Czub et al., 2020). Weltweit wurden Schätzungsweise bis 1945 zwischen 206 000 und 257 000 Tonnen Senfgas produziert (SIPRI, 1971). Am Ende des 2. Weltkrieges betrug alleine die Lagerbestände des Dritten Reichs ca. 28 000 Tonnen (Czub et al., 2020).

Seine akute Wirkung auf den Menschen übt Senfgas auf der Haut und in der Lunge aus, wo es zu schweren verbrennungs- und verätzungsartigen Schäden führt und Haut und Lunge auf schwerste Weise schädigt, was bis zum Tod der exponierten Person führen kann. S-Lost ist als krebserregend eingestuft⁷ sowie cyto- und genotoxisch (Czub et al., 2020). Senfgas ist giftig für Vertebraten und Fische (Czub et al., 2020). Im *Daphnia magna* Immobilisierungstest nach OECD

⁴ <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32008R1272>

⁵ <https://gestis.dguv.de/data?name=491146>

⁶ <https://gestis.dguv.de/>

⁷ https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=en&p_card_id=0418&p_version=2

202 wurde Senfgas als giftig eingestuft, mit einer LC_{50} sowie EC_{50} im einstelligen mg/L Bereich (Czub et al., 2020; OECD, 2004).

S-Lost ist bei Raumtemperatur flüssig und in Wasser schwer löslich⁷. Dadurch und durch seine Viskosität sowie hydrophoben Eigenschaften kommt es in der Meeresumwelt in Form persistenter Klumpen vor.

1,4-Oxathian, 1,4-Dithian, 1-Oxa-4,5-dithiepan und 1,2,5-Trithiepan

In wässriger Umgebung können aus Senfgas cyclische Abbauprodukte wie 1-Oxa-4,5-dithiepan, 1,2,5-Trithiepan, 1,4-Oxathian und 1,4-Dithian entstehen. Diese wasserlöslichen Polymerisationsprodukte können weiteren Transformationen unterliegen. Im *Daphnia magna* Immobilisierungstest nach OECD 202 wurden 1,4-Oxathian, 1,4-Dithian als nicht toxisch eingestuft, 1-Oxa-4,5-dithiepan hingegen als giftig und 1,2,5-Trithiepan als sehr giftig (OECD, 2004; Vanninen et al., 2020). Die LC_{50} sowie EC_{50} liegt für 1-Oxa-4,5-dithiepan bei etwa 2,2 mg/L, 1,2,5-Trithiepan hat eine EC_{50} von ca. 0,21 mg/L und eine LC_{50} von ca. 0,22 mg/L (Czub et al., 2020).

Thiodiglykol, Thiodiglykol-Sulfoxid und Thiodiglykol-Sulfon

Bei der Herstellung von Senfgas wird Thiodiglykol zu S-Lost chloriert und ist somit ein Vorstufenprodukt. Wenn sich Senfgas in Wasser löst wird es sehr schnell hydrolysiert. Dabei entsteht wieder Thiodiglykol, was durch Oxidation weiter zu Thiodiglykol-Sulfoxid reagieren kann. Beide Substanzen sind im *Daphnia magna* Immobilisierungstest nach OECD 202 als nichttoxisch eingestuft worden (Czub et al., 2020; OECD, 2004). Thiodiglykol-Sulfon ist ebenfalls ein Metabolit des S-Lost und wird nach dem global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien (GHS)⁸ für den Menschen als giftig und gesundheitsschädlich eingestuft aber als ungiftig für Wasserorganismen.

Sesqui-Lost, Monopropyl-Lost und Sauerstoff-Lost

Diese Substanzen gehören wie Senfgas zur Gruppe der S-Loste. Zur Toxizität, besonders im Hinblick auf Wasserorganismen, konnten für Sesqui-Lost, Monopropyl-Lost und Sauerstoff-Lost keine Angaben gefunden werden.

Stickstoff-Lost und Triethanolamin

Das als N-Lost abgekürzte Stickstoff-Lost wurde von Lan et al. (2005) als toxisch für Wasserspezies eingestuft. Das Sigma-Aldrich Sicherheitsdatenblatt, welches auf der Homepage der Organization for the Prohibition of Chemical Weapons gefunden werden kann, stuft hingegen N-Lost im *Daphnia magna* Immobilisierungstest nach OECD 202 als nichttoxisch ein (Czub et al., 2020; OECD, 2004). Triethanolamin wird als Ausgangsstoff zur N-Lost Synthese benötigt. Laut Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (REACH) wird Triethanolamin als nicht giftig für den Menschen und die Umwelt eingestuft.

1.3 Aufgabenstellung und Hintergründe der Arbeitspakete

Im Fokus der geplanten Untersuchungen standen Zeitreihen, räumliche Untersuchungen, Anreicherungen entlang der marinen Nahrungskette sowie zusätzlich Untersuchungen auf chemische Kampfstoffe. Diese Aspekte wurden in vier Arbeitspakete unterteilt und entsprechend untersucht.

⁸ <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32008R1272>

1.3.1 Arbeitspaket 1 – zeitliche Schadstoffbelastung

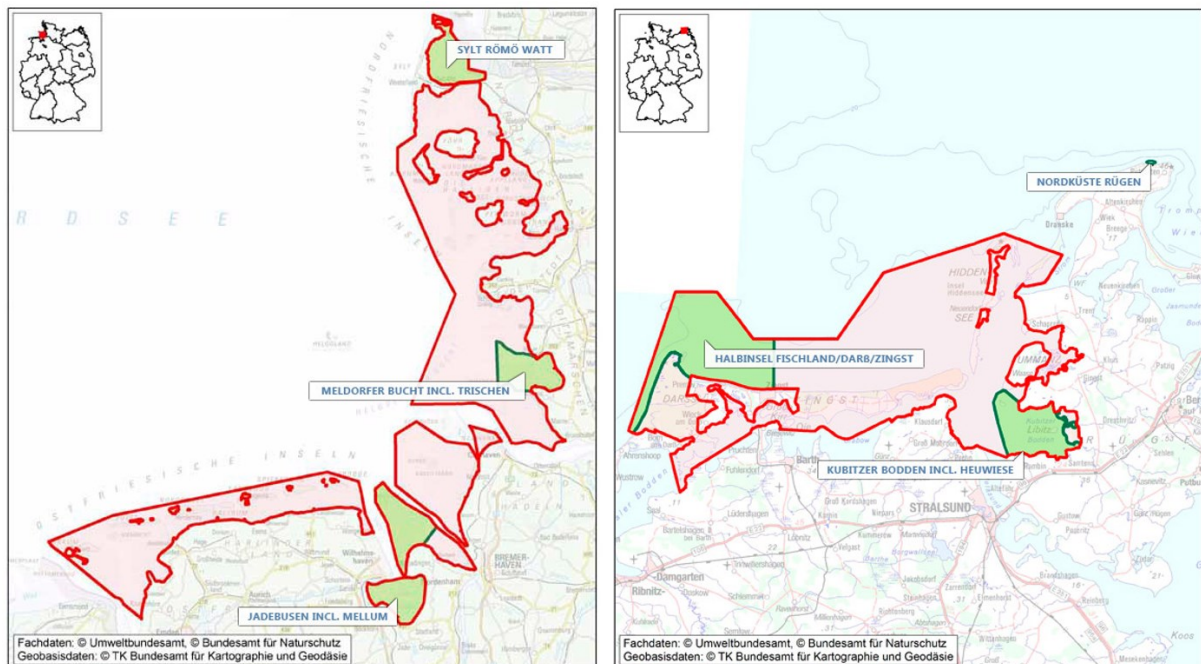
Im Arbeitspaket 1 „Zeitreihen-Analyse von Proben der Umweltprobenbank auf Sprengstofftypische Verbindungen (STV)“ wurde untersucht, ob sich in Miesmuscheln und ausgewählten Aalmutterleberproben von Standorten in Nord- und Ostsee Rückstände von Sprengstoffen wie TNT und seine Metabolite nachweisen lassen. Dazu sollten bereits etablierte Methoden zur Analytik von Miesmuscheln eingesetzt werden, aber auch neue Möglichkeiten der Probenaufarbeitung etabliert werden. Auf diese Weise soll es möglich sein, auch sehr geringe Konzentrationen im so genannten Spurenbereich zu identifizieren und nach Möglichkeit auch quantitativ zu bestimmen.

In diesem Arbeitspaket sollte geklärt werden:

- ▶ Sind STV in den verschiedenen Tierspezies zu finden?
- ▶ Wann tauchen STV zum ersten Mal in den Geweben auf?
- ▶ Verändern/erhöhen sich die Konzentrationen an STV entlang der Zeitschiene?
- ▶ Ist eine Extrapolation auf Zukunftsszenarien möglich?
- ▶ Kann eine Aussage darüber getroffen werden, wann ein kritischer Zeitpunkt für eine Umweltgefährdung eintritt?
- ▶ Kann unter Hinzuziehung von EC_{50} - und LC_{50} -Werten aus der Literatur eine ökotoxikologische Bewertung der Ergebnisse erfolgen?

Die untersuchten Muscheln wurden im Rahmen der routinemäßigen Probennahme der Umweltprobenbank des Bundes seit 1985 genommen, so dass es auf diese Weise möglich war, eventuell länger zurückliegende Belastungen zu ermitteln und ggf. ihren zeitlichen Verlauf nachzuverfolgen. Aalmuttern werden seit 1991 routinemäßig von der Umweltprobenbank des Bundes gesammelt. Die Miesmuscheln stammen von der Nordsee aus der Region Jadebusen sowie der Region Sylt Römö Watt und decken in diesem Bericht die Jahre 1985 bzw. 1986 bis 2021 ab. Die untersuchten Miesmuscheln der Ostsee wurden jährlich von 1992 bis 2020 in der Region Darßer Ort gesammelt. Die untersuchten Aalmutterleberproben stammen aus den Jahren 2005 und 2019 aus der Ostseeregion Darßer Ort sowie den beiden Nordseeregionen Meldorfer Bucht und Varel Mellum. Die Lage der Regionen kann Abbildung 3 entnommen werden.

Abbildung 3: Probennahmeregionen von Miesmuscheln und Aalmuttern im Bereich der Nordsee (links) und Ostsee (rechts)



Quelle: Umweltprobenbank des Bundes (www.umweltprobenbank.de) abgerufen am 17.03.2021

1.3.2 Arbeitspaket 2 – räumliche Schadstoffbelastung

Im Arbeitspaket 2 „Untersuchungen zur räumlichen Verteilung der STV“ wurde an ausgewählten Matrices (Sediment, Muscheln und Plattfischen) die flächenartige Ausdehnung der STV in Nord- und Ostsee ermittelt. Das Ziel war es abzuschätzen, ob sich STV in der Nord- und Ostsee unterschiedlich verteilen und es Gebiete gibt, in denen STV besonders stark in den verschiedenen Matrices aufgetreten sind. Diese Analysen wurden mit historischen und aktuellen Daten in entsprechenden digitalen Plattformen (Munitionskataster AmuCad®) verglichen, um mögliche „hot spots“ der Freisetzung von STV zu identifizieren. Diese Erkenntnisse könnten eine Diskussionsgrundlage bilden, um zu prüfen, ob an den untersuchten Stationen ein regelmäßiges Monitoring-Programm etabliert, eventuelle Räumungsmaßnahmen eingeleitet oder ein Fischfangverbot oder eine Einschränkung von Aquakultur-Systemen in diesen Bereichen in Erwägung gezogen werden sollten.

In diesem Arbeitspaket wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

- ▶ STV-Analysen in Sediment, Muscheln und ggf. weiteren Biota
- ▶ Erstellung von Karten zur räumlichen Übersicht der gemessenen Konzentrationen von STV in den untersuchten Gebieten
- ▶ Abgleich der auftretenden STV-Konzentrationen mit historischen und aktuellen Eintragungen im Munitionskataster AmuCad®
- ▶ Identifizierung von „hot spots“ der Freisetzung von STV
- ▶ Abschätzung einer möglichen Umweltgefährdung
- ▶ Durchführung einer ökotoxikologischen Bewertung unter Hinzuziehung von EC₅₀- und LC₅₀-Werten aus der Literatur

1.3.3 Arbeitspaket 3 – Schadstoffanreicherung in der Nahrungskette

Entsprechend der Leistungsbeschreibung wurde im Arbeitspaket 3 „Untersuchungen zur möglichen Anreicherung von STV im marinen Nahrungsnetz“ folgendes untersucht: Das UBA stellte dem UKSH (Institut für Toxikologie, Kiel) Biota-Proben (vorwiegend Spitzenprädatoren) zur Verfügung, die aus Sammlungen Dritter stammten. Dazu vermittelte das Umweltbundesamt z.B. die kostenfreie Bereitstellung von Gewebeproben von marinen Säugern (Robben und Schweinswalen). Diese sollten u.a. vom Meeresmuseum Stralsund und der Tierärztlichen Hochschule Hannover bereitgestellt werden. Das UKSH musste die Proben lediglich abholen und transportieren. Die Proben wurden vom Institut für Toxikologie auf den Gehalt an STV untersucht. Hierdurch sollte eine Abschätzung getroffen werden, ob „höhere“ Organismen die STV vermehrt in ihrem Gewebe anreichern. Die Idee war abschätzen zu können, ob letztendlich auch der Mensch als „Top-Predator“ durch den Genuss von marinen Nahrungsmitteln gefährdet sein könnte.

In diesem Arbeitspaket sind enthalten:

- ▶ STV-Analysen in Muscheln, Fischen, Eiderenten und Meeressäugern (Robben und Schweinswalen)
- ▶ Entwicklung der Methodik für die Extraktion und Analyse von STV und ihren Metaboliten aus diesen neuen Biota-Matrices
- ▶ Bewertender Vergleich der auftretenden STV-Konzentrationen in den verschiedenen Tierspezies im Hinblick auf die Fragestellung einer möglichen Anreicherung von STV und Umbauprodukten im Nahrungsnetz
- ▶ Abschätzung einer möglichen Gefährdung des Menschen
- ▶ Humantoxikologische Bewertung unter Hinzuziehung von Literaturdaten (NOAEL, LOAEL)

1.3.4 Arbeitspaket 4 – chemische Kampfstoffe

Im Arbeitspaket 4 „Belastung mit chemischen Kampfstoffen“ wurde durch das UKSH die Analyse verschiedener chemischer Kampfstoffe in Verdachtsproben organisiert. Eine Vorgehensweise zur Ermittlung geeigneter Probennahmeorte war eine Recherche in der Datenbank AmuCad. Wenn die Probennahmeorte des UBA mit möglichen Versenkungsgebieten von chemischen Kampfstoffen eine Übereinstimmung ergaben, sollte dort punktuell in den Sedimentproben nach chemischen Kampfstoffen gesucht werden. Die Festlegung der Stationen sollte durch den Begleitkreis unterstützt werden.

Eine indirekte Möglichkeit zur Abschätzung einer Belastung mit chemischen Kampfstoffen ist der Nachweis von Arsen in den verschiedenen Matrices. Arsen ist Bestandteil der chemischen Kampfstoffe Lewisit, Adamsit, Clark 1 und Clark 2 und kann somit als indirekter Nachweis für diese Kampfstoffe herangezogen werden.

Arsen wird im Bund/Länder- Messprogramm Nord- und Ostsee (BLMP) sowie der Umweltprobenbank (UPB) routinemäßig gemessen. In der Meeresumweltdatenbank (MUDAB) liegen über 5.000 Messwerte überwiegend von Arsen im Sediment von Nord- und Ostsee vor. Die Umweltprobenbank verfügt über Zeitreihen von Arsen in Blasentang, Miesmuschel, Aalmutter und Silbermöwe aus Nord- und Ostsee. Diese Daten wurden vom UKSH entsprechend ausgewertet.

In diesem Arbeitspaket sind die folgenden Arbeiten vorgesehen gewesen:

- ▶ Messung von chemischen Kampfstoffen in ausgewählten Biota. Der Umfang sollte zunächst etwa 20 Proben betragen.
- ▶ Auswertung der vorhandenen Messdaten von Arsen in Sedimenten und Biota hinsichtlich der räumlichen und zeitlichen Belastung.
- ▶ Ökotoxikologische und humantoxikologische Bewertung unter Berücksichtigung der Eintragsquellen und -pfade von Arsen.

2 Arbeitspaket 1 – Zeitreihen-Analyse von Proben der Umweltprobenbank auf Sprengstofftypische Verbindungen (STV)

2.1 Vorgehen und Methodik

Um die Frage zu beantworten, ob sich STV in Miesmuscheln und Aalmutterlebern der Umweltprobenbank des Bundes nachweisen lassen, müssen mehrere Aspekte beachtet werden. Neben der eigentlichen Analytik, ist die Bereitstellung von ideal geeignetem Ausgangsmaterial sowie eine optimale Aufarbeitung der Proben vor der eigentlichen Messung ausschlaggebend. Dies umfasst im Einzelnen:

- ▶ Die Art der durch die Umweltprobenbank des Bundes zur Verfügung gestellten Miesmuschel- und Aalmutterleberproben.
- ▶ Das Etablieren von neuen, bisher noch nicht angewendeten Aufarbeitungsmethoden zur Extrahierung möglicher STV aus den Muschelgeweben. Zusätzlich wurden die Proben nach der in Strehse et al. (2017) publizierten Methode aufgearbeitet. Es erfolgte zudem ein Vergleich dieser Aufarbeitungsmethoden untereinander. Des Weiteren wurde eine Methode zur Extrahierung von STV aus Aalmutterleber in die Analytik etabliert.
- ▶ Die Optimierung der Geräteparameter der GC-MS/MS, um mögliche STV Belastungen sowohl qualitativ wie auch quantitativ einer Messung zugänglich zu machen.

Die Optimierungen dieser Parameter dienen dem Zweck, mögliche Belastungen der untersuchten Miesmuscheln selbst im Spurenbereich eindeutig zuzulassen. In diesem Zusammenhang spricht man immer von einer größtmöglichen Absenkung der Nachweisgrenzen. Diese Grenze gibt den niedrigsten Wert einer Substanz an, die von der gewählten Messmethode eindeutig identifiziert und quantifiziert werden kann. Zu hohe Nachweisgrenzen hätten zur Folge, dass eine Substanz nicht analytisch erfasst wird und es somit zu einem falsch negativen Ergebnis kommt. Die Absenkung der Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen sind somit essentiell, wenn Substanzen bereits im Spurenbereich erfasst werden sollen. Für STV ist dies zwingend notwendig, da es sich um Verbindungen mit u.a. kanzerogen Potential handelt und somit auch niedrige Konzentrationen unter Umständen problematisch sein können. Die Art der Probennahme wie auch die Probenaufarbeitung haben einen entscheidenden Einfluss darauf, ob die im zu untersuchenden Material befindlichen Substanzen der Analytik zugänglich gemacht werden können oder nicht. Ein zu aggressives und wenig schonendes Behandeln und Aufarbeiten der Proben könnten zum teilweisen oder kompletten Verlust des Analyten führen. Auf der anderen Seite ist es möglich, dass durch das nicht ausreichende Abtrennen störender so genannter Matrixbestandteile, die Signale des Analyten vom Messgerät nicht eindeutig herausgefiltert und bestimmt werden können. Es kommt somit zu einer Überlagerung des analytischen Signals durch den so genannten Hintergrund. Durch den störenden Hintergrund kann das Detektionslimit um mehr als den Faktor 10 höher sein, als das derselben Substanzkonzentration in reinen Lösungsmitteln. Zu den Matrixbestandteilen gehören alle in den Muscheln vorkommenden Substanzen, die nicht in die Analytik mit einbezogen werden sollen. Dies umfasst zum Beispiel Proteine, Fettsäuren und Gewebeflüssigkeiten. Aber auch die zur Extraktion genutzten Lösungsmittel können als Matrix die Messung beeinflussen. Schwerflüchtige Matrixbestandteile, wie beispielsweise langkettige Fettsäuren, führen zu einer Abnahme der Signalintensität mit fortlaufender Probenzahl. Zwar kann dies durch Verwendung interner Standards und die Messung externer Standards in definierten Abständen in der

Konzentrationsberechnung korrigiert werden, extrem niedrige Konzentrationen sind so aber nach vergleichsweise wenigen Messungen nicht mehr sicher detektierbar.

2.1.1 Angewendete Methoden

Im Folgenden wird das Vorgehen zur Ermittlung des jeweils geeignetsten methodischen Verfahrens zur Probenbereitstellung, Aufarbeitung und analytischen Messung beschrieben, unter Nennung der wichtigsten durchgeführten Optimierungsschritte.

2.1.1.1 Probenbereitstellung

Miesmuschelproben

In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob kryogemahlene (Feinstvermahlung unter Verwendung von flüssigem Stickstoff) oder zusätzlich lyophilisierte (gefriergetrocknete) Miesmuschelproben für die Aufarbeitung und Analytik besser geeignet sind.

Die Sammlung der Miesmuscheln für die Umweltprobenbank erfolgt in den Ostseeregionen im Juni und November eines jeden Jahres. Die Sammlungen in der Nordsee erfolgen dagegen alle zwei Monate. Zum Jahresende werden die Monatsproben zu einem Jahreshomogenat vereint. Um die Langzeitlagerung von Muschelproben in der Umweltprobenbank des Bundes zu ermöglichen, werden die Weichkörper einschließlich des Atemwassers und des Darminhalts im Labor von ihrer Schale im gefrorenen Zustand voneinander getrennt. Unter Einhaltung kryogener Bedingungen werden die Weichkörper der jeweiligen Probenahmen mit gleichen Gewichtsanteilen zusammengeführt und homogenisiert. In dieser Form werden Miesmuschelproben im Archiv der Umweltprobenbank gelagert und für retrospektive analytische Fragestellungen zur Verfügung gestellt. Weitere Details zur Probenahme, Informationen über die genaue Art der Aufarbeitung und Konservierung mit den entsprechenden SOP (Standard Operating Procedure) sowie die Möglichkeiten der Zurverfügungstellung von Probenmaterial, können der Homepage der Umweltprobenbank des Bundes entnommen werden (<http://www.umweltprobenbank.de>).

Das natürlicherweise in den Muschelgeweben vorkommende Wasser, wie auch das in den Proben vorhandene Atemwasser, kann jedoch die nachfolgende Analytik stören. Zum einen reagiert die GC-MS/MS empfindlich auf möglicherweise vorhandenes Wasser im aufgearbeiteten Probenmaterial. Zum anderen sollen die STV im Gewebe erfasst werden und wässrige Bestandteile hätten somit einen verdünnenden Effekt haben. Dieser Verdünnungseffekt kann als Störgröße bezeichnet werden, der die Nachweisgrenze einer Substanz somit erhöhen würde und deswegen zu den störenden Matrixbestandteilen gezählt wird.

Aus diesem Grund wurden von der Umweltprobenbank des Bundes für einen ersten Untersuchungsansatz nicht nur kryogemahlene, sondern auch im Anschluss gefriergetrocknete Proben zur Verfügung gestellt. Die Gefrietrocknung, die auch als Lyophilisierung bezeichnet wird, ist ein sehr schonendes Verfahren zur Trocknung thermisch empfindlicher Proben. Die für diesen Vergleich untersuchten Miesmuscheln entstammten zu einem der Beprobungsregion Darßer Ort (Ostsee) und zum anderen der Region Lister Hafen (Nordsee) jeweils aus dem Jahr 1992.

Alle Proben wurden wie folgt aufgearbeitet:

Je drei Unterproben mit einer Menge von 1,0 g (kryogemahlene Muscheln) bzw. 0,3 g (kryogemahlene und zusätzlich lyophilisierte Muscheln) der beiden Probeentnahmestellen wurden in 15 mL Probenröhrchen eingewogen und mit 5 mL Acetonitril versetzt. Folgende Aufarbeitung wurde mit jeweils einer Unterprobe je Probenpool durchgeführt:

- a) Durchmischen der Proben mittels eines Vortex-Mischers für eine Minute.
- b) Behandlung der Proben im Ultraschallbad für jeweils zehn Minuten.
- c) Durchmischen mittels Vortex-Mischer (1 min) mit anschließender 10-minütiger Behandlung im Ultraschallbad.

Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (8 min, 4100 rpm, 10 °C). Der Überstand wurde mit einer Pipette abgezogen. Die Proben wurden mittels eines SpeedVac™ Vakuumpkonzentrators im Vakuum auf ein Volumen zwischen 100 und 410 µL eingengt und in Braunglasfläschchen überführt. Die Probenröhrchen wurden mit Acetonitril gespült (190 - 500 µL) und mit den Extrakten zu einem Gesamtvolumen von 600 µL vereinigt.

Die Messung der Proben erfolgte mittels Thermo Fisher™ TSQ™ 8000 Tandem Quadrupol Massenspektrometer, gekoppelt mit einem Thermo Fisher™ TRACE™1310 Gaschromatographen. Zur Trennung wurde eine TG-5MS GC-Säule (15 m * 0,25 cm; 0,25 µm Filmdicke) verwendet.

Aalmutterleberproben

Aalmuttern (*Zoarcetes viviparus*) sind für eine Fischart spezialisiert standorttreu und sind somit ein guter Akkumulations- und Wirkungsindikator für küstennahe marine Ökosysteme. Die Probenahme durch die Umweltprobenbank erfolgt jedes Jahr in der Zeit von Mai bis Juni. Die anschließend im Labor entnommenen Lebern werden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung gemeinsam eingefroren. Weitere Details zur Probenahme, Informationen über die genaue Art der Aufarbeitung und Konservierung mit den entsprechenden SOP sowie die Möglichkeiten der Zurverfügungstellung von Probenmaterial, können der Homepage der Umweltprobenbank des Bundes entnommen werden (<http://www.umweltprobenbank.de>).

2.1.1.2 Aufarbeitungsmethoden

Miesmuscheln – mögliche Extraktionsverfahren für STV zur Matrixminimierung

Mit Hilfe der so genannten Festphasenextraktion sollte ein Verfahren zur Matrixreduzierung für die Aufarbeitung der Miesmuschelproben getestet und anschließend etabliert werden. Die Festphasenextraktion eignet sich auf der einen Seite zum Aufkonzentrieren von Analyten aus stark verdünnten Lösungen und zum anderen lassen sich störende Begleitsubstanzen aus der Untersuchungslösung abtrennen. Dazu wurden gefriergetrockneten Proben der Umweltprobenbank aus dem Jahr 1992 mit definierten Mengen sprengstofftypischer Verbindungen angereichert und die Detektionslimits der STV in der lyophilisierten Muschelmatrix bestimmt. Einhundert Milligramm lyophilisierte Muschel (Trockengewicht, t.w.) entsprechen grob 1 000 mg Frischmuschel (Feuchtgewicht, f.w.).

Je 100–300 mg der lyophilisierten Muschelproben wurden mit 1,3-DNB, 2,4-DNT, TNT, 4-ADNT und 2-ADNT (0,1; 0,5; 1,5 ng pro 100 mg Trockengewicht) versetzt. Diese wurden in 1 mL Acetonitril bzw. 2 mL bei mehr als 150 mg Trockengewicht der Einzelprobe, aufgearbeitet. Die Proben wurden mit Millipore Water auf 25 mL verdünnt und die Matrix durch Festphasenextraktion an Macherey-Nagel™ Chromabond™ Easy Säulen entfernt. Nach dem Eluieren der STV von den Säulen, wurden die Extrakte auf 600 µL eingengt und mittels GC-MS/MS durch Auftragung mit einem Splitless-Injektor und einem Injektionsvolumen von 1 µL gemessen.

Aalmutter – Extraktion von STV aus Lebergewebe

Je zweimal 500 mg der kryogemahlten Aalmutterleberproben wurden in 2 mL Gefäße eingewogen, mit 5000 U Glucuronidase (*Helix Pomatia*) gelöst mit 1 mL Acetatpuffer (pH 4.9)

versetzt und bei 37 °C und 300 rpm für 18 h in einem Heizblock unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde für 30 min bei 10 °C und 14 800 rpm zentrifugiert. Ein deutliches Absetzen einer Fettphase (etwa 30-50 µL) oberhalb der wässrigen Pufferphase war bei allen Proben zu beobachten. Es wurden 500 µL n-Hexan zu pipettiert und die Proben für 30 Sekunden mittels Vortex-Mischer geschüttelt. Anschließend wurden die Hexanphasen in ein 15 mL Saarestedt-Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser Prozess wurde je Probe insgesamt fünf Mal durchgeführt. Die vereinigten Hexanphasen (2,5 mL) wurde mittels Rotations-Vakuumverdampfer auf 100 µL eingengt. Da die zurückbleibende, ölige Substanz in Acetonitril nicht in Lösung gebracht werden konnte, wurde das Volumen mit Toluol auf 600 µL eingestellt, mit 0,5 ng ¹³C¹⁵N-TNT als internen Standard versetzt und die Proben in Braunglasvials gefüllt. Die Lagerung bis zum Messen erfolgte bei -80 °C. Die Messung erfolgte mittels GC-MS/MS unter Verwendung des Kaltaufgabesystems.

2.1.1.3 Verbesserung der Analytik – Optimierung von Geräteparametern der GC-MS/MS

Die Messgenauigkeit einer GC-MS/MS ist von einer Vielzahl verschiedener Geräteparameter abhängig. Dazu gehören auf Seiten des Gaschromatographen die Austestung geeigneter Injektionsarten und -volumina sowie ein auf die Analyten optimal eingestelltes Temperaturprogramm zur Trennung der injizierten Bestandteile. Auch der gewählte Säulentyp hat einen entscheidenden Einfluss auf die Trennleistung.

Ein wichtiger Optimierungsschritt, der ebenfalls zu einer Absenkung der Nachweisgrenzen führen kann, ist das verwenden eines sogenannten Kaltaufgabesystems. Dieses Verfahren ermöglicht es, temperaturempfindliche Analyten wie beispielsweise STV noch schonender in den Gaschromatographen einzubringen. Auf diese Weise wird nämlich eine unerwünschte, zu frühe Zersetzung der Analyten verhindert. Des Weiteren ist es mit dieser Injektionsart möglich, größere Probenvolumina aufzutragen. Das Aufkonzentrieren von STV auf der GC-Säule aus größeren Volumina hat den Vorteil, dass sich auch kleinste Mengen der Analyten im Massenspektrum eindeutiger identifizieren lassen.

Um dieses Auftragsystem auf seine Eignung zu testen, wurden Extrakte der Muschelproben mit 1,3-DNB, 2-ADNT, 4-ADNT und TNT versetzt. Anschließend wurden die Proben auf dem Kaltaufgabesystem (PTV-Injektor) im Solvent-Split Modus gemessen. Fünf Mikroliter der Probensubstanz in Acetonitril wurden unterhalb des druckkorrigierten Siedepunkts von Acetonitril (~89 °C) auf den mit Glaswolle gefüllten Liner gegeben. Anschließend wurde das Acetonitril im Trägergasstrom verdampft und durch ein Ventil aus dem Injektor geleitet, sodass nur der Analyt, sowie schwerer flüchtige Matrixbestandteile auf der Glaswolle verblieben. Dieser Prozess dauert bei der eingesetzten Probenmenge nur etwa 12 Sekunden. Im Anschluss wurde der Liner mit variabler Temperatur bis zur Zieltemperatur knapp über dem Siedepunkt des höchst siedenden Analyten (in diesem Fall 2-ADNT) erhitzt. Dadurch werden sensible, temperaturempfindliche Analyten deutlich schonender verdampft, was eine verminderte Zersetzung zur Folge hat. Während des Verdampfungsprozesses ist das Ventil geschlossen, so dass die Analyten zu 100 % auf die Säule übergehen können. Ist die Zieltemperatur erreicht worden, wurde diese für eine Minute gehalten. Anschließend wurde auf eine Temperatur nahe der Temperaturobergrenze geheizt und im starken Trägergasstrom schwer flüchtige Analyten durch das Ventil ausgeleitet. Durch aktive Kühlung kehrt der Injektor rechtzeitig vor Beginn der Messung zur Ausgangstemperatur zurück.

2.1.1.4 Bestimmung der Nachweisgrenzen sprengstofftypischer Verbindungen

Im Anschluss an die Optimierungen auf Seiten der Probenbereitstellung und -Aufarbeitung sowie der Verbesserung verschiedener Geräteparameter der GC-MS/MS, wurden die

Nachweisgrenzen verschiedener sprengstofftypischer Verbindungen mit den optimierten Parametern bestimmt.

Bei der Bestimmung der Nachweisgrenzen müssen zwei Werte unterschieden werden: Das Limit of Detection (LoD, absolute Nachweisgrenze), bei der ein Signal noch vom Hintergrundrauschen unterschieden werden kann und das Limit of Quantification (LoQ, Quantifizierungsgrenze). Je nach Matrix können LoD und LoQ identisch sein (z.B. im Falle hochreiner Standardverdünnungen) oder auch mehrere Größenordnungen auseinander liegen (z.B. im Falle sehr matrixreicher, nicht aufgereinigter Biota-Proben).

Für die Bestimmung der Nachweisgrenzen wurden jeweils 5 µL einer Standardlösung mit Hilfe des PTV-Injektors aufgetragen. Folgende STV Standards wurden verwendet: TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DANT, 2,4-DNT, 1,3-DNB, DPA.

2.1.2 Zeitreihenmessungen

Unter Zuhilfenahme von gefriergetrockneten Miesmuscheln und gefrorenen Aalmutterleberproben der Umweltprobenbank des Bundes sollten folgende Fragen geklärt werden:

- ▶ Wann tauchen STV zum ersten Mal in den Muschelgeweben auf?
- ▶ Verändern/erhöhen sich die Konzentrationen an STV entlang der Zeitschiene?
- ▶ Ist eine Extrapolation auf Zukunftsszenarien möglich?
- ▶ Kann eine Aussage darüber getroffen werden, wann ein kritischer Zeitpunkt für eine Umweltgefährdung eintritt?
- ▶ Kann unter Hinzuziehung von EC₅₀- und LC₅₀-Werten aus der Literatur eine ökotoxikologische Bewertung der Ergebnisse erfolgen?

2.1.2.1 Lyophilisierte Miesmuschelproben

Die zu untersuchenden Miesmuschelproben stammen von der Nordsee aus der Region Jadebusen (Eckwarderhörne) sowie der Region Sylt Römö Watt (Südlicher Lister Hafen, Königshafen) und decken die Jahre 1985 bzw. 1986 bis 2021 ab. Miesmuscheln der Ostsee wurden jährlich in der Region Darßer Ort ab 1992 gesammelt und Proben bis einschließlich 2020 in diesem Arbeitspaket analysiert.

Je etwa die Hälfte der lyophilisierten Muschelproben wurden in lichtdichte 5 mL Gefäße eingewogen und mit 1 mL (< 150 mg t.w.) bzw. 2 mL (>150 mg t.w.) Acetonitril versetzt. Anschließend wurde als interner Standard 1 ng ¹³C¹⁵N-TNT zugegeben. Die Proben wurden mittels eines Vortex-Mischers 1 Minute durchmischt, 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert (8 min, 4100 rpm, 10 °C). Der Überstand wurde mit einer Pipette abgezogen. Von dem Extrakt wurden 100 µL als Rückstellprobe in Braunglasvials mit Inlet gegeben und bei -20 °C gelagert. Das weitere Vorgehen entspricht dem unter 2.1.1.2 beschriebenen Verfahren. Es wurden die durch die Festphasenextraktion erhaltenen Proben wie auch die nicht gesäulten Rückstellproben mittels GC-MS/MS unter Verwendung des Kaltaufgabesystems gemessen.

2.1.2.2 Aalmutterleberproben

Untersucht wurden Aalmutterleberproben der Fangorte Darßer Ort, Meldofer Bucht und Varel Mellum, jeweils aus den Jahren 2005 und 2019. Untersucht wurde auf die sprengstofftypischen Verbindungen TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 1,3-DNB und 2,4-DNT. Die Proben wurden wie unter

2.1.1.2 beschrieben mit Glucuronidase aus *Helix Pomatia* aufgearbeitet und mit n-Hexan sowie Toluol extrahiert.

2.2 Ergebnisse Zeitreihen-Analyse von Proben der Umweltprobenbank

2.2.1 Verbesserung der Nachweisgrenze durch Methodenoptimierung

Im Rahmen des Arbeitspakets 1 ist es gelungen, die Nachweisgrenzen für Sprengstofftypische Verbindungen signifikant um mehr als den Faktor 50 zu senken. Die Nachweisgrenzen liegen nun bei 0,08 – 0,47 ng/mL (8 – 47 fg/μL).

Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse der durchgeführten Optimierungsschritte der Probenbereitstellung, –Aufarbeitung und analytischer Messung aufgezeigt. Zudem wurden die Ergebnisse der Methodenoptimierung 2021 im Journal „Toxics“ open access publiziert (Bünning, T.H.; Strehse, J.S.; Hollmann, A.C.; Bötticher, T.; Maser, E. A Toolbox for the Determination of Nitroaromatic Explosives in Marine Water, Sediment, and Biota Samples on Femtogram Levels by GC-MS/MS. Toxics 2021, 9, 60. <https://doi.org/10.3390/toxics9030060>)

2.2.1.1 Probenbereitstellung

Muschelproben der Umweltprobenbank des Bundes aus dem Jahr 1992 (Nordsee und Ostsee) wurden sowohl in rein kryogemahlener Form und zusätzlich nach erfolgter Gefrier Trocknung zur Verfügung gestellt. Das Verwenden von gefriergetrockneten Proben hat sich aus mehrfacher Hinsicht als Vorteilhaft erwiesen:

1. Das entfernte Gewebe- und Atemwasser ermöglicht eine bessere Handhabung der Muschelproben. Kryogemahlene Muscheln verflüssigen sich während des Auftauens und erschweren das exakte Einwiegen sowie die weitere Aufarbeitung. Lyophilisierte Proben dagegen behalten bei jeder Temperatur ihre pulverartige Form.
2. Das vorherige Entfernen der wässrigen Probenbestandteile hat zudem den entscheidenden Vorteil, dass auf diese Weise die Nachweisgrenze der STV schon um den Faktor 10 im Vergleich zu kryogemahlene Muscheln gesenkt werden konnte. Die kryogemahlene Muscheln enthalten im Schnitt ca. 90 % Feuchtigkeit, die in der Regel keine STV enthält. Ein Abtrennen vor der eigentlichen Aufarbeitung erhöht somit den Gehalt des für die Extraktion relevanten Materials.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die von der Umweltprobenbank für die Zeitreihenuntersuchung zur Verfügung gestellten Miesmuscheln vor Versand gefriergetrocknet.

2.2.1.2 Aufarbeitungsmethoden – verbessertes Extraktionsverfahren für STV aus Miesmuscheltgewebe zur Matrixminimierung

Das Minimieren von störenden Matrixbestandteilen hat sich ebenfalls als eine wichtige Optimierungsstrategie zur Verbesserung der Nachweisgrenze herausgestellt. Die dafür verwendete Festphasenextraktion hat sich als eine gut anwendbare Methode erwiesen.

Dazu wurden Muschelproben mit 1,3-DNB, 2,4-DNT, TNT, 4-ADNT und 2-ADNT versetzt („gespiked“) und mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet. In diesen Proben konnten alle fünf Sprengstofftypischen Verbindungen im Bereich von 0,1 ng/100 mg Trockengewicht sicher nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Absenkung der Nachweisgrenze um annähernd den Faktor 20 (2 ng pro 100 mg t.w. für TNT, 1 ng für 2- und 4- ADNT) für den Einsatz der Festphasenextraktion ohne Berücksichtigung der weiteren etablierten Optimierungen.

Das Entfernen von Matrixbestandteilen, zum Beispiel unter Verwendung von Festphasenextraktionen, ist zudem bei der Verwendung von Kaltaufgabesystemen bei der GC-

MS/MS Analytik zwingend erforderlich. Diese so genannten PTV-Systeme haben den Vorteil, dass größere Probenvolumina von 5 µL und mehr aufgetragen werden können. Aufgrund des bedeutend kleineren Linervolumens im Vergleich zu dem Split-Splitless-Injektor (~200 µL gegenüber 1 mL) und des mindestens fünfmal größeren Injektionsvolumens, kommt es bei matrixreichen Proben sonst zu einem starken Intensitätsverlust, besonders von TNT, innerhalb weniger Messungen. Des Weiteren führen Matrixbestandteile generell zu einer schnelleren Verschmutzung der GC-MS/MS. Dies hätte zur Folge, dass Reinigungsabstände verkürzt werden müssten. Da Reinigungen in der Regel bis zu einem halben Arbeitstag in Anspruch nehmen, würde dies wiederum zu Lasten des Probendurchsatzes gehen und außerdem einen höheren Materialverbrauch zur Folge haben.

2.2.1.3 Verbesserung der Analytik – Optimierung von Geräteparametern der GC-MS/MS

Durch den komplexen technischen Aufbau des Gaschromatographen und des Massenspektrums gibt es eine Vielzahl an Geräteparametern, die variiert werden können und somit einen direkten Einfluss auf die Ergebnisse der Messungen haben. Dies geht von der Ermittlung der jeweiligen optimalen Trenntemperatur einer Substanz bis über die Verwendung verschiedener austauschbarer Gerätekomponenten wie Injektoren, Liner und Trennsäulen. Vor allem die Verwendung eines Kaltaufgabesystems hat sich vorteilhaft erwiesen. Daneben konnten jedoch noch weitere Parameter optimiert werden. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten zusammenfassend dargestellt. Fazit: alle Optimierungen der Geräteparameter führten zu einer Verbesserung der Nachweisgrenze um den Faktor 20.

Etablierung eines PTV-Injektors

Die mit 1,3-DNB, 2-ADNT, 4-ADNT und TNT versetzten Muschelproben wurden auf dem Kaltaufgabesystem (PTV-Injektor) im Solvent-Split Modus gemessen. Von der Probensubstanz wurden 5 µL in Acetonitril jeweils aufgetragen. Theoretisch steigt das Signal des Analyten linear mit der eingespritzten Menge der Probe an – 5 µL einer Lösung der Konzentration 1 ng/mL sollten also dieselbe Signalintensität wie 1 µL einer Lösung $c = 5 \text{ ng/mL}$ besitzen. Durch die Verwendung des PTV-Injektors mit einem Injektionsvolumen von 5 µL sollten fünfmal stärkere Signale erhalten werden als bei der Verwendung des SSL-Injektors (Split-/splitless Injektor; Heißaufgabesystem) mit einer maximalen Injektionsmenge von 1 µL. In reinen Standards werden diese Werte oftmals sogar noch deutlich übertroffen, da die Analyten im PTV-Injektor durch die Temperaturrampe, alle bei ihrer Siedetemperatur verdampft werden. Im SSL-Injektor sind alle Analyten derselben Injektortemperatur (>250 °C) ausgesetzt. Hier sind die Signale bei 5 µL teils bis zu zehnmal so stark. Diesem Effekt steht bei matrixbelasteten Proben wie Muschelproben jedoch Effekte durch die natürlich in der Muschel vorkommenden Substanzen wie beispielsweise Fettsäuren entgegen, die ebenfalls in fünffacher Menge in den Injektor injiziert werden. Dies wirkt sich auf zweierlei Arten aus:

- ▶ Erhöhung der Basislinie mit Verschlechterung des Hintergrunds – Die verwendete Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS, Triple-Quadrupol-MS) ermöglicht die sichere Identifikation von Substanzen im Sub-Nanogrammbereich selbst aus kaum gereinigten Proben. Im Bereich kleiner ein Pikogramm pro Injektion, kann es jedoch trotzdem zu Problemen kommen, wenn sehr viele verschmutzte Proben hintereinander gemessen werden. Der Hintergrund steigt dann durchgehend auf eine Intensität von bis zu 3 000 an (einheitslose Größe). Peaks kleinerer Fläche lassen sich so nicht mehr erkennen. Dieses Problem tritt bei jedem Injektor mit der Zeit auf. Dies ist ein Zeichen, dass der Liner verschlissen ist. Der Liner ist notwendig um die flüssige Probe in den gasförmigen Zustand zu überführen und ist ein wichtiger Bestandteil für die einwandfreie Funktion des Gaschromatographen. Durch das kleine Raumvolumen des PTV-Liners von 100–300 µL (1-2 mm Durchmesser) gepaart mit der

größeren aufgegebenen Probenmenge und der geringeren Menge Glaswolle im Liner, tritt dies beim PTV schneller auf, als beim SSL mit seinen annähernd 1 mL-Volumen und 4,3 mm Durchmesser. Trotz größerem Linervolumen fasst der SSL-Injektor maximal 1 µL Analyt, während in den kleineren Liner des SSL theoretisch unbegrenzte Mengen injiziert werden können. Dies ist daran begründet, dass das Lösungsmittel im SSL schlagartig verdampft. Ein µL flüssiges Acetonitril werden zu >800 µL Gas. Injektion größerer Mengen würde hier zum Rückschlagen des Analyten in die Gasversorgung und Überladung der Säule führen, was die Ergebnisse verfälscht. Im PTV wird das Lösungsmittel beim Einspritzen vergleichsweise langsam verdampft, sodass größere Mengen aufgetragen werden können.

- ▶ Zersetzung des Analyten im Liner: Das Absetzen von schwerflüchtigen Matrixbestandteilen im Liner sorgt dafür, dass sich in diesem, eigentlich chemisch inaktivierten Liner, aktive Stellen bilden, an denen der Analyt zersetzt wird. Dieser Effekt tritt bei den untersuchten STV am stärksten bei TNT auf. Bereits nach wenigen Injektionen nimmt die Signalintensität von TNT und dem als internen Standard eingesetzten isotopengelabelten ¹²C¹⁵N-TNT rapide ab: Im Falle des TNT von einer Signalstärke von 300 000 bei den ersten Messungen zu weniger als einer Signalstärke von 20 000 nach der zwanzigsten Messung. Die Signalintensität des TNT im externen Standard-Mix (TNT, 4-ADNT, 2-ADNT, 1,3-DNB, 2,4-DNT zu je 1 ng/mL), der immer nach 10 Messungen gemessen wurde, hat von anfänglich 16 000 auf 1 000 abgenommen. Da aber selbst in Muscheln, die Wasser mit TNT-Konzentrationen >1 mg/L ausgesetzt waren, annähernd kein unverstoffwechseltes TNT gefunden wird und die Intensität der Signale der primären Metabolite eher ansteigt als abfällt, ist dies für die Messungen somit eher unkritisch. Auch dies tritt beim PTV-Liner durch das kleinere Volumen schneller auf als beim SSL.

Eine Erhöhung des Injektionsvolumens auf 10 µL oder mehr, ist grundsätzlich möglich, geht aber mit einem noch schnelleren Verschmutzen des Liners einher. Es ist daher, bei einem Liner-Preis von etwa 100 Euro pro Stück abzuwägen, ob es sinnvoll ist, die Injektionsmenge zu erhöhen, wodurch nur noch weniger als 10 Injektionen pro Liner möglich wären.

Weitere wichtige Optimierungen

Für eine Verbesserung der Trennleistung des Gaschromatographen wurden verschiedene Säulentypen unterschiedlicher Hersteller getestet. Im Bereich der Sprengstoffanalytik werden fast ausschließlich schwach polare Säulen mit einer Phase aus 5 % Diphenyl- und 95 % Dimethylpolysiloxan eingesetzt, z.B. die TraceGOLD TG5-MS GC-Säule der Firma Thermo Fisher™. Ausgehend von dieser Säule in den Dimensionen 15 m*0,25 mm*0,25 µm wurden verschiedene Säulen dieser und artverwandter Phasen getestet. Die beste Signalintensität und -form wurde mit TG5-MS Amine der Firma Thermo Scientific™ erreicht, da diese durch ihre spezielle Deaktivierung besonders die Metabolite 2- und 4-ADNT, die bei zunehmender Anzahl an Messungen zu einer starken Signalverbreiterung und Intensitätsverlust aufgrund von Wechselwirkungen mit der stationären Phase neigen, deutlich sauberer und schärfer trennt. Die Verwendung einer Säule der doppelten Länge (30 m) brachte nur geringe Verbesserungen in der Trennleistung bei gleichzeitiger Verlängerung der Messzeit um 2-3 Minuten. Zudem konnte durch eine Verkürzung der Trimmintervalle der Säule auf etwa 100 Messungen der Intensitätsverlust durch Kontamination mit schwerflüchtigen Verbindungen verringert werden.

Die Messprogramme wurden für diesen Säulentyp optimiert. Insbesondere eine leichte Absenkung der Injektortemperatur und der finalen Säulentemperatur konnten eine Verbesserung der Signalintensität bewirken.

Eine Messung mittels UHPLC-gekoppelter Massenspektrometrie wurde getestet, zeigte jedoch keine Vorteile gegenüber der etablierten Methode mittels Gaschromatographie-gekoppelter Massenspektrometrie.

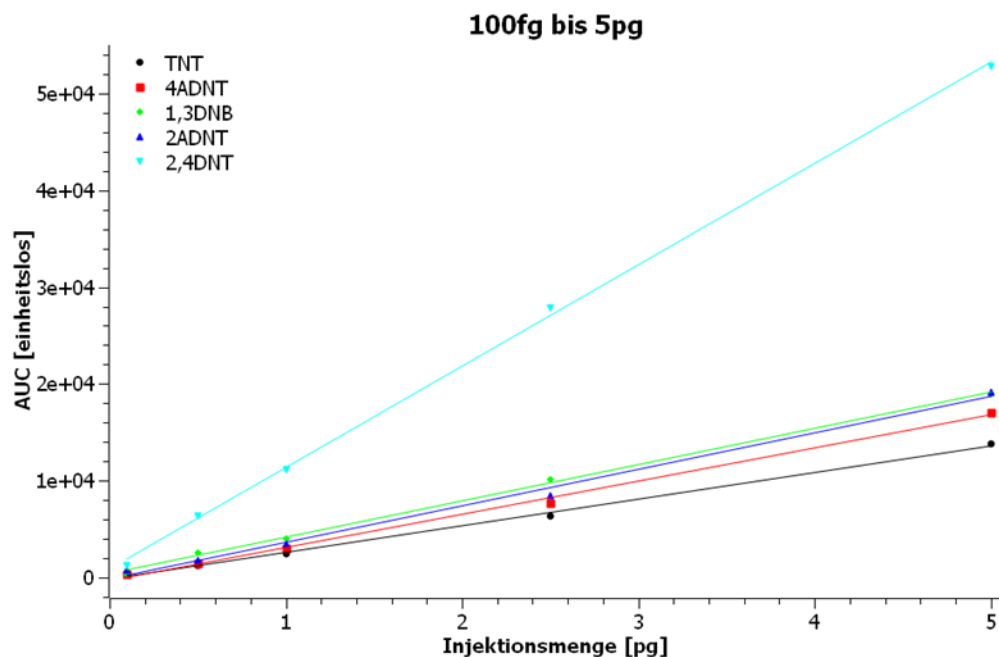
2.2.1.4 Bestimmung der Nachweisgrenzen sprengstofftypischer Verbindungen

Folgende gerätespezifischen Nachweisgrenzen (Limit of Detection) konnten anhand von Standardverdünnungsreihen im Rahmen dieses Arbeitspaketes bestimmt werden (Bünning et al., 2021):

- ▶ TNT ~ 47 fg/μL
- ▶ 4-ADNT ~ 8 fg/μL
- ▶ 2-ADNT ~ 11 fg/μL
- ▶ 2,4-DNT ~ 10 fg/μL
- ▶ 1,3-DNB ~ 32 fg/μL

Die praktischen Nachweisgrenzen sind abhängig von der Probenmatrix, der verwendeten Säule, der Auftragechnik und dem Auftragevolumen. Bei Verwendung eines Split-Splitless-Injektors ist das Probenvolumen auf 1 μL beschränkt, da es sonst zu einer Überladung der Säule kommt. Bei der Verwendung eines Kaltaufgabesystems können theoretisch fast beliebig große Volumina injiziert werden, da das niedrigsiedende Lösungsmittel nach der Injektion und vor Beginn der Chromatographie schonend abgetrennt wird. So können die erforderlichen Substanzmengen aus erheblich schwächer konzentrierten Lösungen erreicht werden. Dies erfordert jedoch Proben mit einem Minimum an unerwünschten Nebensubstanzen. In Abbildung 4 sind Regressionsgeraden der Messreihen zur Bestimmung der Nachweisgrenzen für Injektionen von 100 fg bis 5 pg verschiedener sprengstofftypischer Verbindungen dargestellt, aufgenommen mittels Splitless-Injektion von 1 μL einer Lösung in Acetonitril. Die Regressionsgeraden verdeutlichen die Linearität der für die Ermittlung der jeweiligen Nachweisgrenzen durchgeführten Messreihen. Nur bei einem möglichst hohen resultierenden Bestimmtheitsmaß ist es möglich, aus der durchgeführten Messreihe die tatsächlichen Nachweisgrenzen abzuleiten.

Abbildung 4: Regressionsgeraden der Messreihen zur Bestimmung der Nachweisgrenzen von TNT, 2- und 4-ADNT, 1,3-DNB und 2,4-DNT für Injektionen von 100 fg bis 5 pg



Legende: AUC = Area Under the Curve (Fläche unter der Kurve)

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

2.2.2 Zeitreihenmessungen

2.2.2.1 Miesmuscheln

Alle von der Umweltprobenbank des Bundes gefriergetrockneten Muschelproben aus den Regionen Eckwarderhörne, Lister Hafen (Sylt) und Darßer Ort wurden aufgearbeitet und auf die Sprengstofftypischen Verbindungen TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 1,3-DNB und 2,4-DNT untersucht. Die Tabellen 1–3 zeigen die detaillierten Ergebnisse der Messungen der jeweiligen Regionen unterteilt in die jeweiligen STV. Gemessen wurden aus der Region Darßer Ort insgesamt 32 verschiedene Proben aus den Jahren 1992 bis 2020, aus Königshafen 33 Proben der Jahre 1986 bis 2021 und 36 Proben der Region Eckwarderhörne von 1985 bis 2021. Es wurden die durch die Festphasenextraktion erhaltenen Proben (Tabellenbezeichnung: SPE) wie auch die nicht gesäulten Rückstellproben (Tabellenbezeichnung: Direkt) mittels GC-MS/MS unter Verwendung des Kaltaufgabesystems gemessen. In keiner Probe konnte TNT nachgewiesen werden. Es war zudem nicht möglich 2,4-DNT in den Proben zu detektieren, da es zu einer Signalüberlagerung durch Matrixbestandteile gekommen ist. In keiner Probe konnten quantifizierbare Mengen der TNT Metabolite 2- und 4-ADNT sowie 1,3-DNB zweifelsfrei nachgewiesen werden, jedoch weisen die Proben der Jahre 2019 und 2020 aus der Region Eckwarderhörne Signalintensitäten knapp unterhalb der Quantifizierungsgrenze auf (Abb. 5). Die Quantifizierungsgrenze entspricht dem 3,3-fachen Wert der Nachweisgrenze. In diversen der mittels Festphasenextraktion aufbereiteten Proben ab 1999 wurden Messsignale bei den Retentionszeiten von 1,3-DNB, 2- und 4-ADNT beobachtet, die oberhalb der Nachweisgrenze liegen und daher als positiver Nachweis der entsprechenden STV angesehen werden können (Abb. 5).

Tabelle 1: Darßer Ort – Ergebnisse der untersuchten Miesmuscheln der Zeitreihenanalyse auf die Sprengstofftypischen Verbindungen TNT, 4-ADNT, 2-ADNT und 1,3-DNB

Jahr	TNT		4-ADNT		2-ADNT		1,3-DNB	
	Direkt	SPE	Direkt	SPE	Direkt	SPE	Direkt	SPE
1992	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1993	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1994	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1995	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1996	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1998	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1999	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2000 A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2000 B	<LOD	<LOD	<LOD	+	<LOD	+	<LOD	+
2001	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	+
2002	<LOD	<LOD	<LOD	+	<LOD	+	<LOD	+
2003 A	<LOD	<LOD	?	+	?	<LOD	<LOD	+
2003 B	<LOD	<LOD	?	+	?	+	<LOD	+
2004	<LOD	<LOD	?	<LOD	?	<LOD	<LOD	<LOD
2005	<LOD	<LOD	?	+	?	+	<LOD	+
2006	<LOD	<LOD	?	+	<LOD	?	+	<LOD
2007	<LOD	<LOD	?	<LOD	<LOD	+	?	<LOD
2008 A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	?	<LOD
2008 B	<LOD	<LOD	<LOD	+	?	+	?	+
2009	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	+	?	+
2010	<LOD	<LOD	?	<LOD	<LOD	+	<LOD	<LOD
2011	<LOD	<LOD	?	+	<LOD	+	?	+
2012	<LOD	<LOD	?	+	?	+	?	+
2013	<LOD	<LOD	?	+	?	+	?	+
2014	<LOD	<LOD	?	+	?	+	?	+
2015	<LOD	<LOD	+	++	?	++	?	++
2016 A	<LOD	<LOD	?	+	?	+	?	+
2016 B	<LOD	<LOD	?	+	?	+	?	+
2017	<LOD	<LOD	?	++	?	++	?	++

Jahr	TNT		4-ADNT		2-ADNT		1,3-DNB	
	<LOD	<LOD	?	+	?	+	?	+
2018	<LOD	<LOD	?	+	?	+	?	+
2019	k.A.	<LOD	k.A.	++	k.A.	+	k.A.	+
2020	k.A.	<LOD	k.A.	+	k.A.	+	k.A.	+

<LOD keine STV detektierbar oder unterhalb des Limits of Detection (LoD); ? Signalpeak womöglich vorhanden jedoch Unterhalb des LoD, kein bestätigter Fund; + STV wahrscheinlich, Konzentration jedoch unterhalb der definierten Nachweisgrenze; ++ STV detektiert unterhalb der Quantifizierungsgrenze (LoQ); k.A. keine Messung durchgeführt. A und B bezeichnen Proben aus einem Jahr, die als zwei separate Aliquote geliefert wurden.

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Tabelle 2: Königshafen (Sylt) – Ergebnisse der untersuchten Miesmuscheln der Zeitreihenanalyse auf die Sprengstofftypischen Verbindungen TNT, 4-ADNT, 2-ADNT und 1,3-DNB

Jahr	TNT		4-ADNT		2-ADNT		1,3-DNB	
	Direkt	SPE	Direkt	SPE	Direkt	SPE	Direkt	SPE
1986	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1988	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1990	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1992	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1993	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1994	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1995	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1996	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1997	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1998	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1999 A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	+
1999 B	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	+
2000 A	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	+
2000 B	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	+
2001	<LOD	<LOD	?	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2002	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2003	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2004 A	<LOD	<LOD	?	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2004 B	<LOD	<LOD	?	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2005	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2006	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2007	<LOD	<LOD	<LOD	+	<LOD	+	<LOD	<LOD

Jahr	TNT		4-ADNT		2-ADNT		1,3-DNB	
	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	?	+	?	+
2008	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	?	+	?	+
2009	<LOD	<LOD	<LOD	+	<LOD	+	<LOD	<LOD
2010	<LOD	<LOD	?	+	<LOD	+	?	+
2011	<LOD	<LOD	?	+	<LOD	+	?	<LOD
2012	<LOD	<LOD	<LOD	?	<LOD	?	?	?
2013	<LOD	<LOD	<LOD	+	<LOD	+	?	+
2014	<LOD	<LOD	?	+	?	+	?	+
2015	<LOD	<LOD	<LOD	++	<LOD	++	?	+
2017	<LOD	<LOD	?	+	?	+	<LOD	+
2019	k.A.	<LOD	k.A.	+	k.A.	+	k.A.	+
2021	k.A.	<LOD	k.A.	+	k.A.	+	k.A.	+

<LOD keine STV detektierbar oder unterhalb des Limits of Detection (LoD); ? Signalpeak womöglich vorhanden jedoch Unterhalb des LoD, kein bestätigter Fund; + STV wahrscheinlich, Konzentration jedoch unterhalb der definierten Nachweisgrenze; ++ STV detektiert unterhalb der Quantifizierungsgrenze (LoQ); k.A. keine Messung durchgeführt. A und B bezeichnen Proben aus einem Jahr, die als zwei separate Aliquote geliefert wurden.

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Tabelle 3: Eckwarderhörne – Ergebnisse der untersuchten Miesmuscheln der Zeitreihenanalyse auf die Sprengstofftypischen Verbindungen TNT, 4-ADNT, 2-ADNT und 1,3-DNB

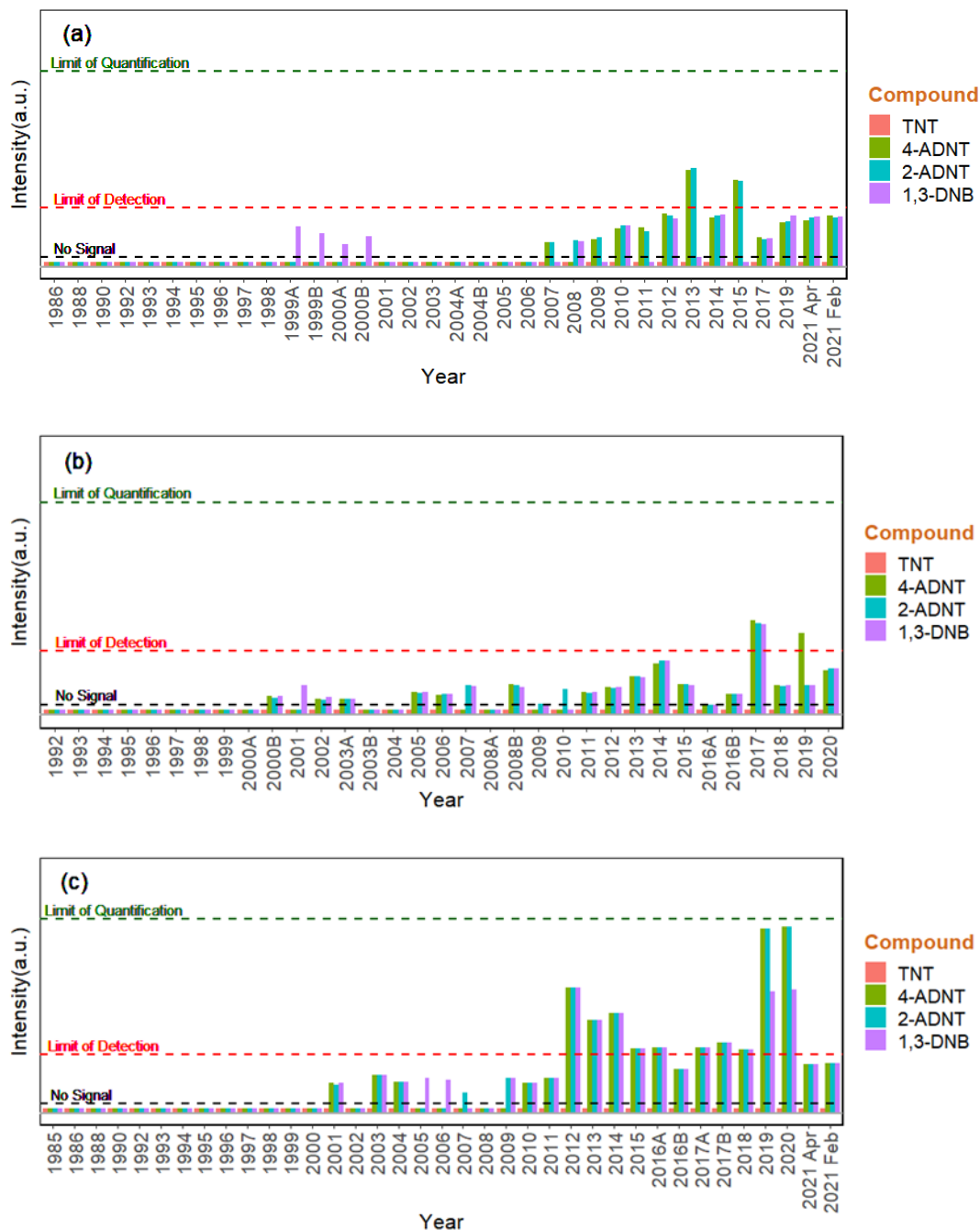
Jahr	TNT		4-ADNT		2-ADNT		1,3-DNB	
	Direkt	SPE	Direkt	SPE	Direkt	SPE	Direkt	SPE
1985	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1986	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1988	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1990	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1992	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1993	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1994	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1995	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1996	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1997	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1998	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
1999	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2000	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2001	<LOD	<LOD	<LOD	+	<LOD	+	<LOD	+

Jahr	TNT		4-ADNT		2-ADNT		1,3-DNB	
2002	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2003	<LOD	<LOD	<LOD	+	<LOD	+	<LOD	+
2004	<LOD	<LOD	<LOD	+	<LOD	+	<LOD	+
2005	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	+
2006	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	+
2007	<LOD	<LOD	?	<LOD	?	+	?	<LOD
2008	<LOD	<LOD	?	<LOD	?	<LOD	?	<LOD
2009	<LOD	<LOD	?	<LOD	?	+	?	+
2010	<LOD	<LOD	?	+	?	+	?	+
2011	<LOD	<LOD	<LOD	+	?	+	?	+
2012	<LOD	<LOD	<LOD	++	<LOD	++	<LOD	++
2013	<LOD	<LOD	?	++	?	++	?	++
2014	<LOD	<LOD	?	++	?	++	?	++
2015	<LOD	<LOD	?	++	?	++	?	++
2016 A	<LOD	<LOD	?	++	?	++	<LOD	++
2016 B	<LOD	<LOD	?	++	<LOD	++	?	++
2017 A	<LOD	<LOD	?	++	?	++	<LOD	++
2017 B	<LOD	<LOD	?	++	?	++	<LOD	++
2018	<LOD	<LOD	?	++	?	++	?	++
2019	k.A.	<LOD	k.A.	++*	k.A.	++*	k.A.	++
2020	k.A.	<LOD	k.A.	++*	k.A.	++*	k.A.	++

<LOD keine STV detektiert oder unterhalb des Limits of Detection (LoD); ? Signalpeak womöglich vorhanden jedoch Unterhalb des LoD, kein bestätigter Fund; + STV wahrscheinlich, Konzentration jedoch unterhalb der definierten Nachweisgrenze; ++ STV detektiert unterhalb der Quantifizierungsgrenze (LoQ); ++* Intensitäten der Messsignale geringfügig unterhalb der Quantifizierungsgrenze; k.A. keine Messung durchgeführt. A und B bezeichnen Proben aus einem Jahr, die als zwei separate Aliquote geliefert wurden.

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Abbildung 5: Darstellung STV in Miesmuschelproben aus (a) Königshafen (Sylt), (b) Darßer Ort und (c) Eckwarderhörne mit den entsprechenden Signalintensitäten



A und B bezeichnen Proben aus demselben Jahr, die in zwei verschiedenen Aliquoten behandelt wurden, die beide zur Qualitätssicherung analysiert wurden.

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel).
 Übernommen aus Strehse et al. (2023).

2.2.2.2 Aalmuttern (Leber)

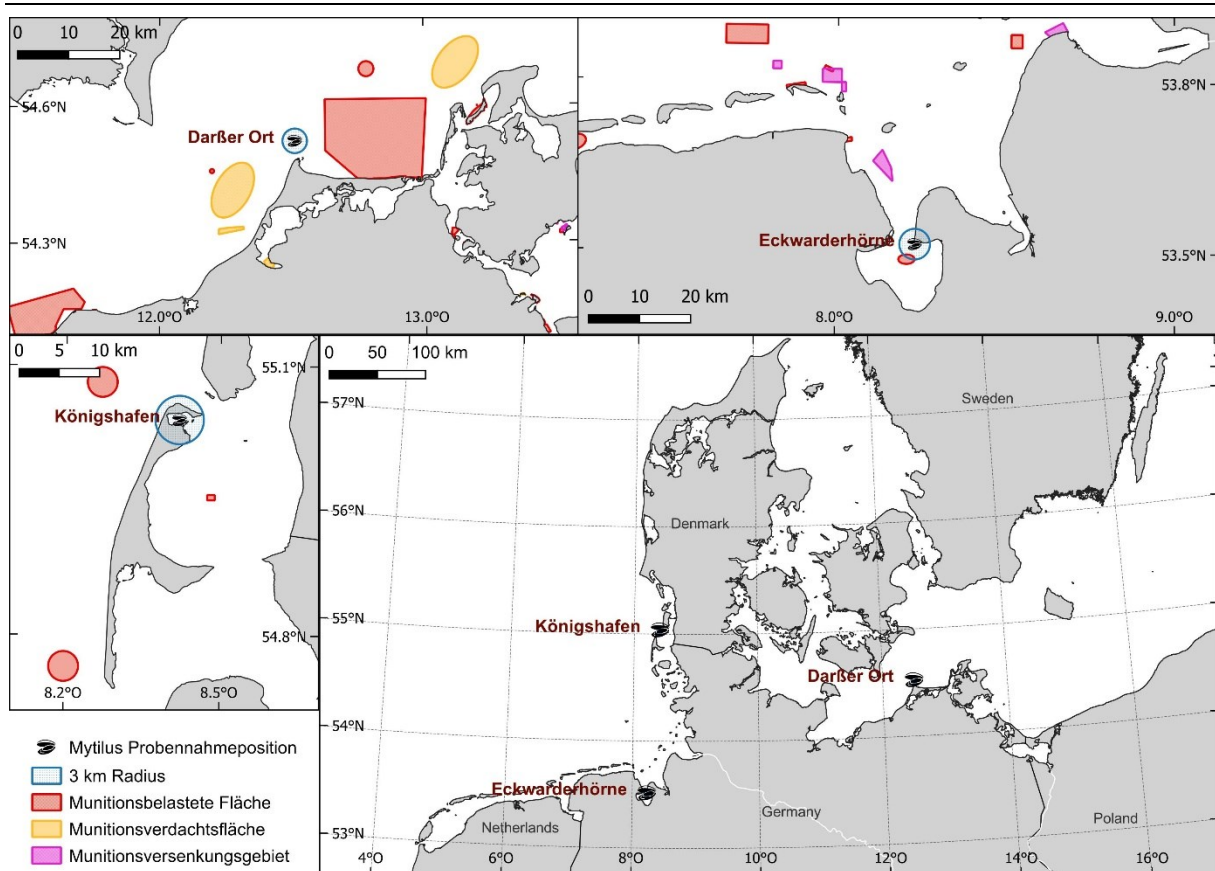
Alle sechs von der Umweltprobenbank gelieferten kryogemahlene Aalmutterleberproben wurden aufgearbeitet. Um die sprengstofftypischen Verbindungen analytisch erfassbar zu machen, wurde β -Glucuronidase (von der Weinbergschnecke *Helix Pomatia*) zur Spaltung im Lebergewebe glucuronidierter sprengstofftypischer Verbindungen bei der Aufarbeitung

eingesetzt. Nach der Inkubation war eine deutliche Fettphase oberhalb der wässrigen Phase zu erkennen. Daher konnten die Proben nicht wie geplant mittels Festphasenextraktion aufgereinigt werden. Stattdessen wurde eine flüssig-flüssig Extraktion mit dem wasserunlöslichen Lösungsmittel n-Hexan durchgeführt. Dieses wurde anschließend im Vakuum wieder entfernt. Der ölige Rückstand konnte nicht im GC-Standardlösungsmittel Acetonitril aufgenommen werden. Daher wurden die Lösungsmittel Cyclohexan und Toluol verwendet. Verglichen wurde mit Proben, die mit 0,5 ng der sprengstofftypischen Verbindungen versetzt wurden. In den Aalmutterleberproben konnten keine STV nachgewiesen werden. Aufgrund der zu fettreichen Matrix eignen sich Aalmutterlebern daher nur sehr bedingt für ein Biomonitoring auf sprengstofftypische Verbindungen mittels GC-MS/MS.

2.3 Ergebnisbewertung Arbeitspaket 1

Munitionsfunde in den letzten Jahrzehnten wie auch die historisch-genetische Rekonstruktion verschiedener Arten historischer Akten und Berichte zeigen, dass das Auffinden von Munition im Meer auch außerhalb ausgewiesener Verklappungsgebiete mit großer Regelmäßigkeit vorkommt (Böttcher et al., 2011). Dies schließt auch diejenigen Gebiete mit ein, in denen die Miesmuscheln und Aalmuttern im Rahmen der Probennahme für die Umweltprobenbank erfolgen (Abb. 6). Im Folgenden werden mögliche Eintragspfade von Munition in die Probennahme Gebiete zusammenfassend aufgezeigt.

Abbildung 6: Übersicht der munitionsbelasteten Flächen in der Nordsee und Ostsee im Bereich der Sammelregionen für Miesmuscheln der Umweltprobenbank des Bundes



Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Region Jadebusen (Eckwarderhörne) mit Varel und Mellum

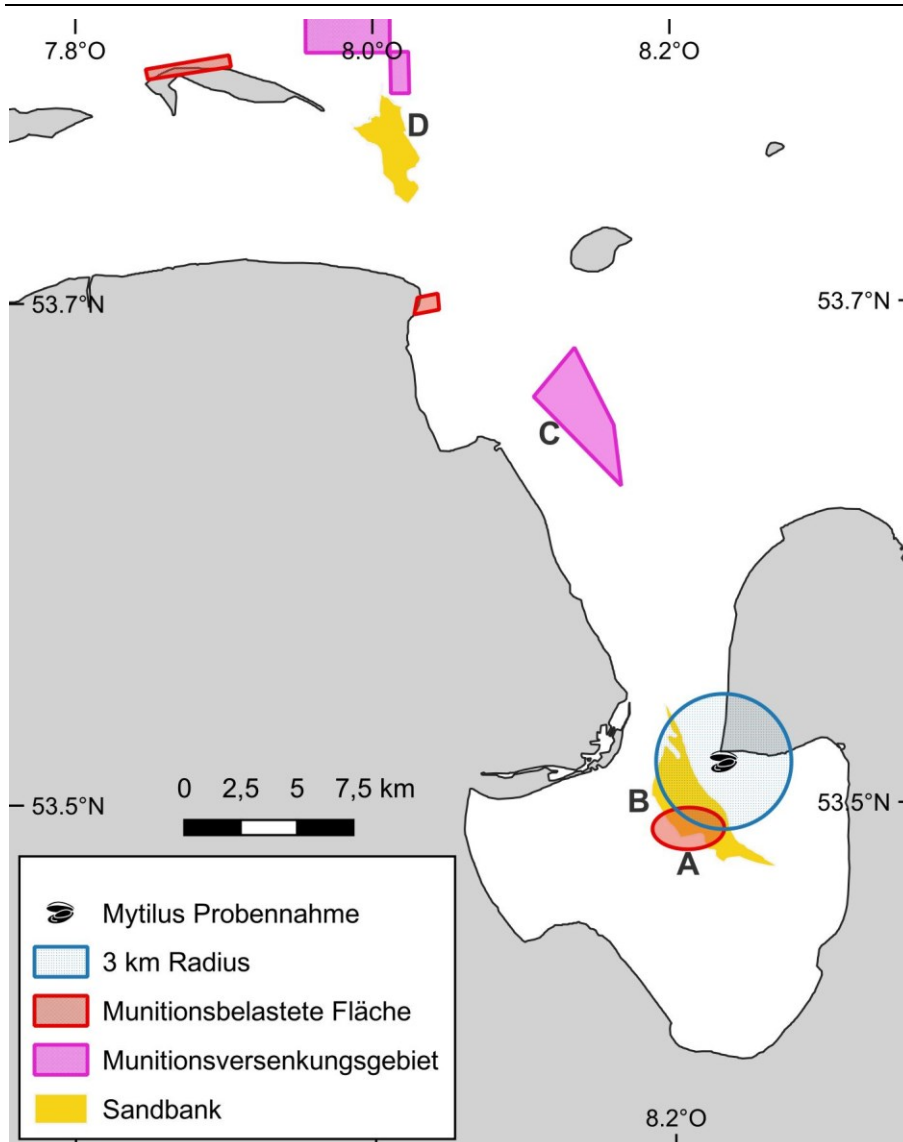
Der Datenbank AmuCad⁹ lässt sich entnehmen, dass der Jadebusen eine mit Munition belastete Fläche darstellt. Die Gesamtmenge dort liegender Munition ist bis heute nicht genau bekannt. Eine vollständige Auswertung der historischen Dokumente steht zurzeit noch aus. Unter anderem sind in dieser Region Wasserbomben gefunden worden. Es wird vermutet, dass im Bereich der Jade 650.000 bis 1,2 Mio. Tonnen konventioneller Munition einschließlich schwerer Granaten verklappt wurden, der größte Teil davon im Verklappungsgebiet Hooksielplate (Abb. 7) (Böttcher et al., 2011).

Im Bereich der Jade und dem Jadebusen ist auch mit einer zunehmenden Freisetzung von STV aufgrund der fortschreitenden Korrosion von Munitionshüllen zu rechnen. Die fortschreitende Korrosion könnte die zunehmende Detektion von STV in den untersuchten Miesmuscheln aus Eckwarderhörne mit erklären. Zwischen 2006 und 2007 wurden zudem Bomben und Rauchbomben in unmittelbarer Nähe des Probenahmegebiets geborgen (Warmke, 2022). Die Nachweise von TNT-Metaboliten in den Muscheln ab 2012 könnten beispielsweise auch durch gezielte Sprengungen von Munition auf dem Jappensand, einem Gebiet in unmittelbarer Nähe des Probenahmegebiets, erklärt werden (Abb. 7) (Warmke, 2022). So wurden im April 2011 104 Wasserbomben des Typs MK11/MK6 im nördlichen Teil der Sandbank Jappensand gefunden und gezielt gesprengt (Böttcher et al., 2014). Munitionssprengungen auf anderen Sandbänken in der Nähe des Jadebusens können ebenfalls zu einem kurzfristigen Anstieg der STV in den Muscheln der Umweltprobenbank geführt haben, da das kontaminierte Wasser mit dem Einsetzen der Flut in den Jadebusen gedrückt wird. So werden auf der Minsener Oog seit einigen Jahren gezielt Blindgänger gesprengt (persönliche Kommunikation mit den Verantwortlichen im Jahr 2021), wie z.B. im Jahr 2014, als auf der Minsener Oog 24 Ankertauminen gezielt gesprengt wurden (Böttcher et al., 2014).

Aufgrund der beträchtlichen Mengen an Altmunition im Einzugsgebiet der Jade kann davon ausgegangen werden, dass sich die Einträge von STV in Miesmuscheln in den kommenden Jahren aufgrund von fortschreitender Korrosion der Altmunition, wie auch möglicherweise Freisetzung durch gezielte Sprengungen von Munitionsfunden, noch weiter zunehmen werden.

⁹ www.amucad.org

Abbildung 7: Detaillierte Darstellung des Probennahmegebiets „Eckwarderhörne“ der Umweltprobenbank in der deutschen Nordsee



A Munitionsbelastete Fläche Jappensand, B Sandbank Jappensand, C Munitionsversenkungsgebiet Hooksielplate, D Insel Minsener Oog mit Sandbank.

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Region Meldorfer Bucht

Nach jetzigem Kenntnisstand befinden sich im Bereich Meldorfer Bucht inkl. der Insel Trischen keine mit Munition belasteten Flächen oder Verdachtsflächen. Der Abgleich erfolgte über das Munitionskataster AmuCad. Von hier stammen ein Teil die untersuchten Aalmutterleberproben.

Region Sylt Römö Watt (Südlicher Lister Hafen, Königshafen)

Da die Insel Sylt während des Zweiten Weltkriegs militärisch genutzt wurde (Häfen sowie der Flughafen Westerland), hat sich am Ende des Krieges Altmunition auf der Insel befunden, die beispielweise zwischen der Insel und dem Festland im Meer entsorgt wurde. Dies geschah unter anderem in der Zeit von Juni bis August 1945. Die genauen Versenkungsorte und Mengen sind jedoch unbekannt und sind Bestandteil aktueller historischer Forschung. Es wurde vor allem leichte Munition verklappt, zum Beispiel 15-cm Granaten. Diese Daten entstammen ebenfalls der Datenbank AmuCad. Darüber hinaus befanden sich auf der Insel mehrere Flugabwehrverbände

und -Formationen, die auf das umliegende Wattenmeer gerichtet waren, wodurch es ebenfalls zum Eintrag von Munition während der Kriegshandlungen gekommen ist. Es wird davon ausgegangen, dass bis zu 1/3 der abgefeuerten Munition Blindgänger waren. In den letzten Jahren wurden wiederholt Munitionsfunde in der Nähe der Probennahmeregion bei Königshafen auf Sylt gemacht (Böttcher et al., 2014). Das Probennahmegebiet befindet sich in einer kleinen Bucht, in der auch Fliegerbomben und Kleinmunition gefunden wurden (Warmke, 2022). Darüber hinaus befinden sich direkt am Eingang der Bucht mehrere Wracks von Kampfflugzeugen, zudem wurden in den vergangenen Jahren dort auch wiederholt Seeminen gefunden (Warmke, 2022). Die Ergebnisse der untersuchten Miesmuscheln von der Insel Sylt zeigen, dass diese zunehmend Sprengstofftypischen Verbindungen ausgesetzt sind, die infolge der fortschreitenden Korrosion der Altmunition in diesem Gebiet in die Umwelt gelangen.

Region Darßer Ort (Fischland)

Auch im Bereich Darßer Ort sind laut AmuCad und dem Geoinformationsdienst des Marinekommandos (Warmke, 2022) mehrere Munitionsbelastete Flächen wie auch Verdachtsflächen in der Nähe der Sammelregion der Umweltprobenbank bekannt. Die auch hier fortschreitende Korrosion der Munitionshüllen könnte die zunehmende Detektion von Spuren der untersuchten STV in den Miesmuscheln aus dieser Region erklären. In diesem Küstenbereich hat sich unter anderem im Zweiten Weltkrieg und der Zeit der ehemaligen Deutschen Demokratischen Republik ein Übungsschießgebiet zur Flugabwehr befunden. Es ist deswegen mit dem Vorkommen von Abwurfmunition aller Art zu rechnen. Auch können Verklappungen in dieser Region nicht ausgeschlossen werden. Eine abschließende Untersuchung der tatsächlichen Belastung hinsichtlich Art und Menge der vorkommenden Munition sowie die räumliche Belastungsverteilung, konnte bis heute noch nicht gänzlich erfolgen. Auch hier steht unter anderem die weitere Auswertung historischer Dokumente noch aus. Im Umkreis von 15 Kilometern zum beprobten Gebiet wurden bisher jedoch keine Einzelfunde gemeldet (Warmke, 2022).

Fazit

In zur Jahrtausendwende gesammelten Miesmuscheln der UPB (Königshafen 1999, Darßer Ort 2000, Eckwarderhörne 2001) konnten in allen drei untersuchten Regionen erste Hinweise auf das Vorhandensein von STV in den untersuchten Proben erhalten werden. Ab den Jahren 2012 (Eckwarderhörne), 2013 (Königshafen) und 2017 (Darßer Ort) konnten mit hinreichender Wahrscheinlichkeit erste Messsignale von Sprengstofftypischer Verbindungen oberhalb der Nachweisgrenze detektiert werden. In den Proben der Sammlungen der Jahre 2019 und 2020 in der Region Eckwarderhörne konnten zudem 2- und 4-ADNT geringfügig unterhalb der Quantifizierungsgrenze gemessen werden. Diese liegen bei 0,14 ng/g (t.w.) für 2-ADNT und 0,17 ng/g (t.w.) für 4-ADNT. Es zeichnet sich somit in allen untersuchten Regionen ab, dass sich auch in den zukünftig gesammelten Miesmuschelproben STV nachweisen lassen werden. Zudem ließe sich Extrapolieren, dass die STV Konzentrationen in den Muscheln zunehmen werden, aufgrund voranschreitender Korrosion der Metallhüllen der im Meer liegenden Weltkriegsmunition. Da bislang der Zustand der im Meer liegenden Munition weder punktuell noch allgemeingültig eingeordnet werden kann, ist es auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse noch nicht möglich abzuschätzen, ab wann unter Betrachtung der in diesem Arbeitspaket erhaltenen Ergebnisse ein kritischer Zeitpunkt für eine Umweltgefährdung eintreten wird. Da die bisherigen Analyseergebnisse von Muscheln der UPB unterhalb der Quantifizierungsgrenze liegen, ist es somit zum gegenwärtigen Zeitpunkt auch nicht möglich in diesem Arbeitspaket eine ökotoxikologische Bewertung und Einordnung der Ergebnisse vorzunehmen. Vorschläge für Qualitätsnormen in Anlehnung an das TGD-EQS Guidance Dokument 27 (aktualisierte Fassung von 2018) konnten somit in diesem Arbeitspaket nicht erfolgen.

Die Ergebnisse der Zeitreihenuntersuchungen wurden im Journal „Toxics“ offen zugänglich publiziert (Strehse, J.S.; Bünning, T.H.; Koschorreck, J.; Künitzer, A.; Maser, E. Long-Term Trends for Blue Mussels from the German Environmental Specimen Bank Show First Evidence of Mmunition Contaminants Uptake. *Toxics* 2023, 11, 347. <https://doi.org/10.3390/toxics11040347>).

3 Arbeitspaket 2 – Untersuchungen zur räumlichen Verteilung der sprengstofftypischen Verbindungen

3.1 Planungen und Durchführungen der Probennahmen

Die Probennahme für die räumliche Verteilung der STV wurde mit den Bundesländern Mecklenburg-Vorpommern, Schleswig-Holstein und Niedersachsen im Rahmen des Begleitkreises abgestimmt und organisiert. Die Probennahme wurde als Erweiterung des Biota-Schadstoffmonitorings der Länder im Rahmen des Bund/Länder Messprogramms Nord- und Ostsee (BLMP) an den Miesmuschelstationen des BLMP durchgeführt. Das UBA hat für die Überlassung von Proben an das Projekt entsprechende Gespräche mit den Zuständigen von Landesämtern aus Niedersachsen, Schleswig-Holstein und Mecklenburg-Vorpommern geführt. Mit dem Auftragnehmer von Mecklenburg-Vorpommern wurde ein Unterauftrag zur Probennahme geschlossen, um die Kosten für Schiff und Personal durch die zusätzlichen Probennahmen durch das Projekt zu tragen. Es war geplant die Proben über zwei Jahre zu nehmen und entsprechend zu analysieren und auszuwerten.

3.1.1 Probennahme Mecklenburg-Vorpommern

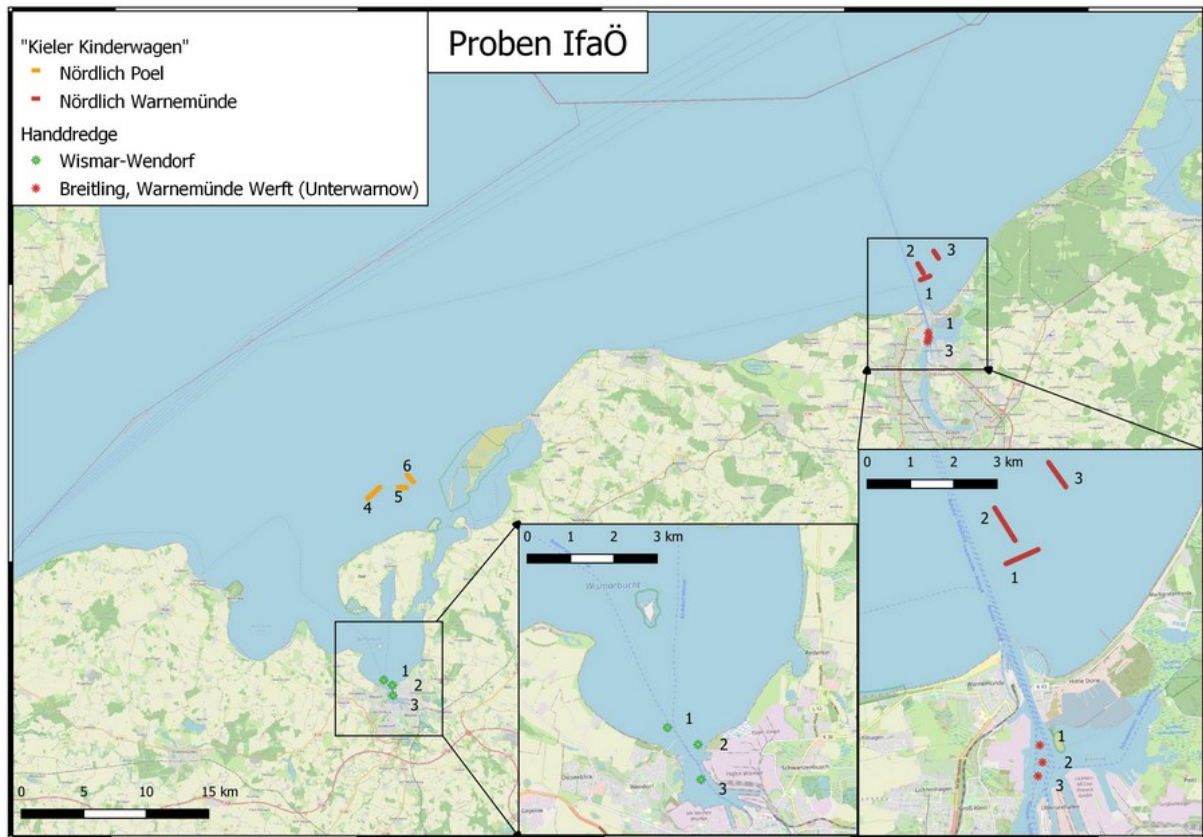
Planung

Unmittelbar nach Projektbeginn konnte das Institut für Angewandte Ökosystemforschung GmbH (IfAÖ) als Unterauftragnehmer zur Probennahme für das Projekt gewonnen werden. Das IfAÖ hat als Auftragnehmer des Landesamtes für Umwelt, Naturschutz und Geologie (LUNG) über zwei Jahre Biota-Proben des BLMP für Mecklenburg-Vorpommern gesammelt und analysiert. Das IfAÖ hatte eingewilligt, Miesmuscheln (*Mytilus* sp.) und Zebrauscheln (*Dreissena* sp.) zur Verfügung zu stellen. Im Jahr 2020 sollten Miesmuscheln an den Stationen Wismar-Bucht, Poel, Unterwarnow und Warnemünde gesammelt werden. Die Beprobung von Oberflächensediment war mit Hilfe von van-Veen-Greifern und ggf. Ekman-Birge-Greifern vorgesehen. Für den Herbst 2021 wurde die Sammlung von *Dreissena* sp. aus dem Zecheriner Brücke und Kamminke sowie *Mytilus* sp. aus der Oderbank und aus dem Bereich vor Zingst geplant.

Durchführung im Jahr 2020

Für das Jahr 2020 war eine erste Probennahme von Muscheln (*Mytilus* spp.) sowie Sediment in den Kalenderwochen 42–45 geplant worden. Wie vorgesehen, wurden Ende Oktober 2020 Muschel- und Sedimentproben im Bereich der Wismarbucht und des Rostocker Breitlings entnommen (Abbildung 8). Allerdings gestaltete sich die Probenahme mit dem Behördenschiff vor Poel und Warnemünde im Jahr 2020 äußerst kompliziert: Nach mehrfachen Verschiebungen aufgrund der Corona-Bestimmungen mussten die angesetzten Touren wegen eines Maschinenschadens abgesagt und vorerst auf unbestimmte Zeit verschoben werden. Im April 2021 konnten dann die geplante Probennahme nördlich von Poel und Warnemünde nachgeholt werden (Abbildung 8). Die Muschelproben der beiden Sammelzeiträume wurden jeweils am Tag der Probennahme bis zum Eintreffen im Labor am selben Tag in einer Tonne mit Umgebungswasser gelagert und anschließend sofort zusammen mit den Sedimentproben bei -20 °C eingefroren. Zusammen mit den im Oktober 2020 gesammelten Muschel- und Sedimentproben aus Wismar und Breitling, wurden die Proben im Mai 2021 dem UKSH zur Aufarbeitung und Analysierung übergeben.

Abbildung 8: Probennahmeorte in Mecklenburg-Vorpommern im Jahr 2020/21. An jedem der vier Standorte wurden jeweils drei Proben Miesmuscheln und Sedimente genommen. Die Probennahme erfolgte Ende Oktober 2020 (Bereich Wismarbucht und Rostocker Breitlings) und im April 2021 (nördlich Poel und Warnemünde). Für die Probennahmen wurden zwei verschiedene Arten von Dredgen verwendet (Kieler Kinderwagen und Handdredge)

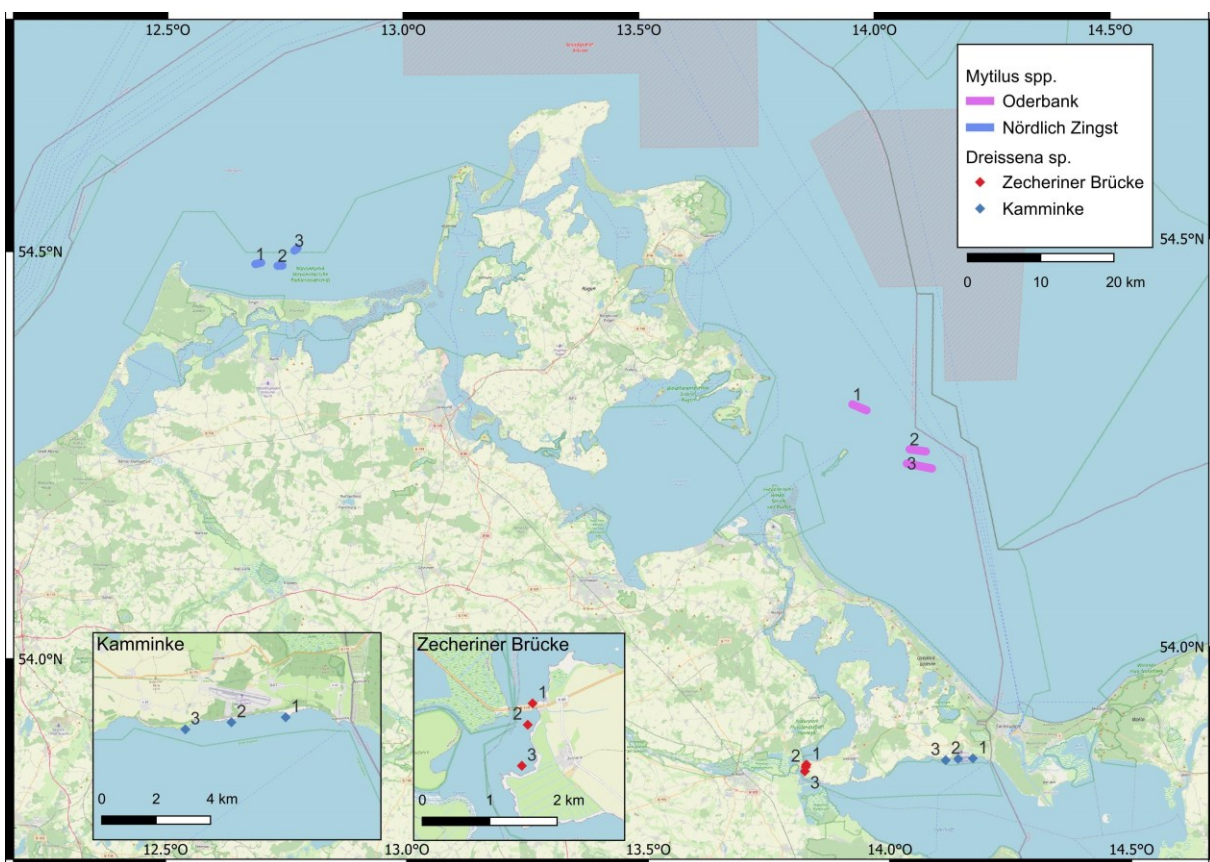


Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Durchführung im Jahr 2021

Im Oktober und November 2021 konnten wie geplant die Probennahme von Miesmuscheln und Zebrauscheln erfolgen sowie Sediment genommen werden. Am Standort Zecheriner Brücke und Kamminke wurden im Oktober je drei Hols *Dreissena* sp. und Sediment mittels einer Handdredge genommen. Im November erfolgte an der Station Nördlich Zingst und Oderbank die Beprobung von *Mytilus* spp. und Sediment mit Hilfe einer 1-m Dredge (Kieler Kinderwagen). Auch hier wurden jeweils drei Hols genommen (Abbildung 9). Auch hier wurden die Muscheln bis zum Eintreffen im Labor in Umgebungswasser zwischengelagert und am selben Tag bei -20 °C eingefroren und bis zum Transport gelagert.

Abbildung 9: Übersicht der Probennahmeorte in Mecklenburg-Vorpommern für Miesmuscheln (*Mytilus* sp.) und Dreikantmuscheln (*Dreissena* sp.) im Herbst 2021



Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

3.1.2 Probennahme Niedersachsen

Planung

Mit dem Niedersächsischen Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz (NLWKN) konnte ebenfalls direkt nach Projektbeginn eine erfolgreiche Kooperation bezüglich der Zurverfügungstellung von Probenmaterial beschlossen werden. Der NLWKN hatte sich bereit erklärt, Miesmuscheln und Sedimentproben für das Projekt im Rahmen ihres routinemäßigen Biotamonitorings mit zu sammeln. Es sollten jährlich im Sommer bei Norderney, Borkum, Wurster Watt, Spiekeroog, Jadebusen und Jade/Mellum entsprechende Proben entnommen werden. Für das Projekt sollten pro Station 10–20 Muscheln gesammelt werden sowie Oberflächensediment.

Durchführung im Jahr 2020

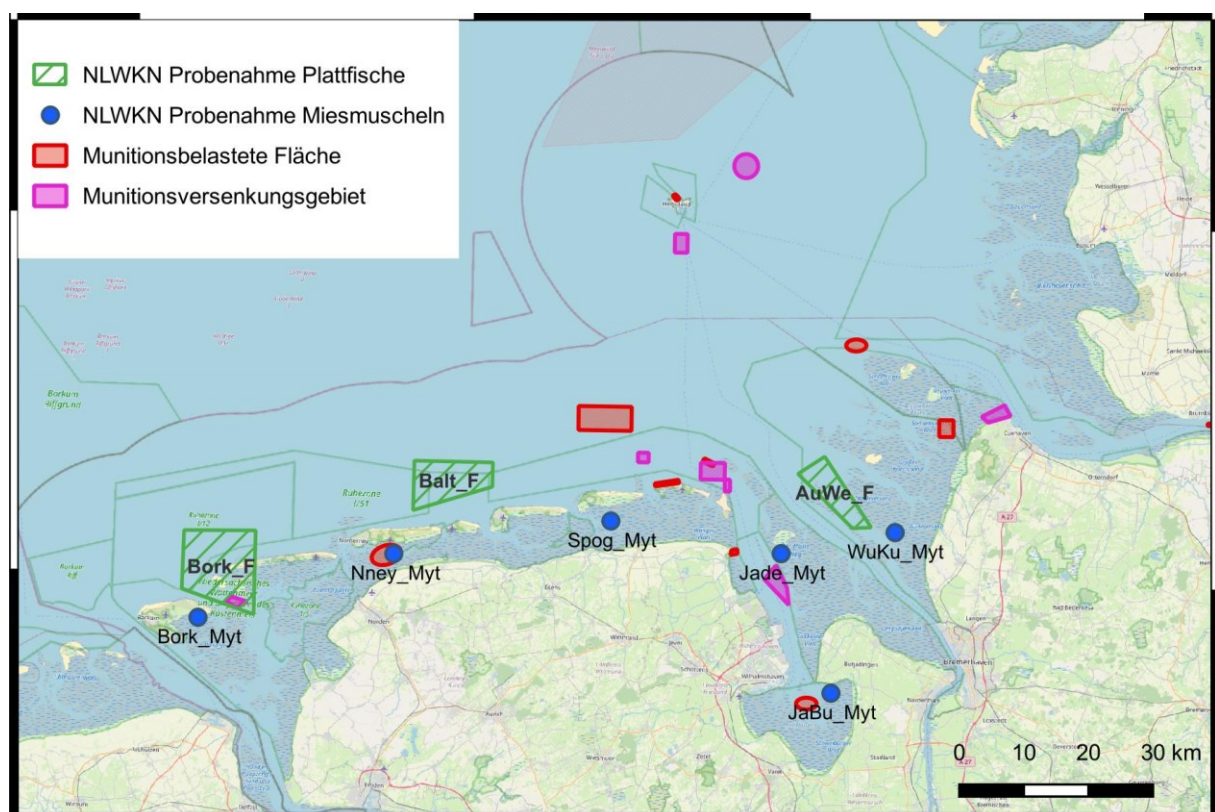
Im August erfolgte die planmäßige Sammlung von Miesmuscheln und Sediment an den Standorten Wurster Watt, Jade/Mellum, Jadebusen und Norderney. Im September erfolgten die Probennahmen in der Region Spiekeroog und zusätzlich in der Region Jadebusen. Aufgrund schlechter Wetterverhältnisse wurden die Muscheln und die Sedimente im Bereich Borkum erst im Oktober gesammelt. Die beprobten Standorte sind in Abbildung 10 dargestellt. Abbildung 11 zeigt Aufnahmen von den erfolgten Probennahmen an allen sechs Standorten (von links nach rechts, von oben nach unten): Wurster Watt, Jade/Mellum, Norderney, Jadebuse, Spiekeroog und Borkum. Auf den Aufnahmen ist zu erkennen, dass auf einigen Muschelbänken die pazifische Felsenauster (*Crassostrea gigas*) deutlich dominiert. Die Miesmuscheln stecken dort tief zwischen den aufrechtstehenden Austern und halten sich mit Hilfe ihrer Byssusfäden an den

Austern fest, sowohl als Klumpen, als auch einzeln, was auf den Bildern nicht immer gut zu erkennen ist.

Es wurden pro Station 20 Miesmuscheln gesammelt, die nach Möglichkeit eine Größe von 5–7 Zentimetern aufwiesen. Die Muscheln wurden ohne Hälterung sofort in PE-Beutel verpackt und umgehend bei -20 °C eingefroren. Die Sedimentproben wurden von der Oberfläche bis ca. 5 Zentimeter Tiefe oberflächlich genommen und je Probe 50 bis 100 Gramm schnellstmöglich zur Konservierung bei -20 °C eingefroren. Im November 2020 erfolgte die Lieferung von Miesmuschel- und Sedimentproben an das UKSH.

Der NLWKN hat zudem Plattfische aus dem Juli 2019 zur Aufarbeitung aus dem Routinemonitoring zur Verfügung gestellt. Diese wurden im Juni 2020 zum Teil gemeinsam mit Mitarbeitenden des NLWKN präpariert. Dabei wurden von 100 Fischen über 500 Einzelproben entnommen. Zudem wurden 34 Fische tiefgefroren im Ganzen überlassen. Die Entnahme einzelner Proben erfolgte dann zu einem späteren Zeitpunkt in Kiel, ebenso wie die Extraktion des Gewebematerials und die Untersuchungen auf STV mittels GC-MS/MS. Weitere Einzelheiten können dem Kapitel 4 „Untersuchungen zur möglichen Anreicherung von STV im marinen Nahrungsnetz“ entnommen werden.

Abbildung 10: Stationen der Sammlung von Miesmuscheln und Sedimentproben durch das NLWKN im Sommer/Herbst 2020 und Herbst 2022 sowie die Fangregionen von Plattfischen im Juli 2019



Myt = Miesmuscheln, F = Plattfisch, Bork = Borkum, Nney = Norderney, Spog = Spiekeroog, Jade = Jade/Mellum, JaBu = Jadebusen, WuKu = Wurster Nordseeküste, AuWe = Außenweser, Balt = Baltrum.

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Abbildung 11: Probennahmen von Miesmuscheln und Sediment in Niedersachsen. Die Probennahmen erfolgten zwischen August und September 2020 (von links nach rechts, von oben nach unten: Wurster Watt, Jade/Mellum, Norderney, Jadebusen, Spiekeroog und Borkum.



Quelle: NLWKN

Durchführung im Jahr 2022

Da im Jahr 2021 für das UKSH keine Probennahme erfolgte, wurde diese vom NLWKN im Sommer und Herbst 2022 nachgeholt. Die Probennahme von Miesmuscheln und Sediment erfolgte an denselben Stationen wie im Jahr 2020 (Abbildung 10) und mit gleicher Vorgehensweise. Die Stationen Norderney und Jadebusen wurden im August beprobt, Spiekeroog im September, Wurster Watt im November, Jade/Mellum und Borkum im Dezember. Abbildung 12 zeigt Aufnahmen der Probennahme an den sechs Stationen.

Abbildung 12: Beprobung von Sediment und Miesmuscheln in Niedersachsen. Die Probennahmen erfolgten zwischen August und Dezember 2022 (von links nach rechts, von oben nach unten: Wurster Watt, Jade/Mellum, Norderney, Jadebusen, Spiekeroog und Borkum.



Quelle: NLWKN

3.1.3 Probennahme Schleswig-Holstein

Planung und Durchführung Probennahme Ostsee

Das Landesamt für Umwelt (LfU) konnte Miesmuscheln aus ihrer Sammlung für das Routinemonitoring aus der Flensburger Innenförde zur Analysierung auf STV aus den Jahren 2020 und 2021 zur Verfügung stellen. Im Jahr 2020 wurde die Probennahme am 5. Oktober und im Jahr 2021 am 7. November durchgeführt. Die Muscheln wurden jeweils mit Hilfe eines Schleppnetzes entnommen. In 2020 stammten die Miesmuscheln aus einer Tiefe von 4,8 bis 12,7 Metern. Die Schleppzeit betrug neun Minuten. Im Jahr 2021 betrug die Schleppzeit vier Minuten in einer Tiefe von 5,1 bis 6,2 Metern. Vor dem Einfrieren wurden die Muscheln 16,5 Stunden (2020) bzw. 24 Stunden (2021) gehältert. Eine Entnahme von Sedimentproben an den Muschelstationen gehört normalerweise nicht zum Routinemonitoring des LfU, trotzdem konnte im Jahr 2020 ebenfalls am 5. Oktober eine Sedimentprobe aus der Flensburger Förde entnommen werden. Dies war in 2021 leider nicht möglich. Der Grund liegt darin, dass es teilweise sehr schwierig ist, eine Sedimentprobe aus dem Gebiet der Flensburger Förde zu bekommen, wenn ein großes Muschelvorkommen vorliegt. Meistens ist dann der Greifer für die Sedimentproben nur mit Muscheln und Muschelschalen gefüllt und auch mehrfache Wiederholungen führen nicht zum Erfolg. Tritt eine solche Situation ein, können keine Sedimentproben entnommen werden, da der Aufwand zu groß ist.

Planung und Durchführung Probennahme Nordsee

Die jährliche Probennahme im Jahr 2020 auf Helgoland erfolgte bereits vor den Planungen für dieses Arbeitspaket. Leider war keine ausreichend große Menge an Miesmuscheln übrig, um sie für die Analysierung auf STV zur Verfügung zu stellen. Ebenso konnte keine Sedimentprobe genommen werden, da die Muscheln von Hand im Hafenbecken gesammelt werden. Auch im

Jahr 2021 konnten keine Muscheln aus dem Probennahmegebiet Helgoland zur Verfügung gestellt werden und auch keine Sedimentprobe entnommen werden.

3.2 Analytische Methoden

3.2.1 Aufarbeitung der Probenmaterialien

Im Folgenden werden die Aufarbeitungsmethoden der verschiedenen Matrices (Muscheln und Sedimente) beschrieben. Die Aufarbeitung umfasst im Wesentlichen die Isolierung und Trocknung des Untersuchungsmaterials sowie die Extraktion möglicher STV aus dem Probenmaterial und sonstige Vorbereitungsschritte vor der analytischen Messung und Auswertung mittels GC-MS/MS und LC-MS/MS.

Sedimente

Für die Extraktion möglicher STV wurden 100 g ± 0,2 g Sediment in Zentrifugengefäße eingewogen. Nach Zugabe von 250 ml bidestilliertem Wasser wurden die Proben 15 Minuten lang im Ultraschallbad behandelt. Die Sedimente wurden anschließend 80 Minuten lang bei 10 °C und 230 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden mit Hilfe von Papierfaltensfiltern filtriert. Anschließend wurden die Filtrate in einer Vakuumkammer auf Macherey-Nagel™ Chromabond™ Easy Säulen gegeben. Die Säulen wurden anschließend im Vakuum getrocknet und mit 4 ml Acetonitril extrahiert. Mittels eines Rotations-Vakuumkonzentrator (Martin Christ™ RVC 2-25 CDplus™) wurden die Proben im Vakuum auf ein Volumen von 600 µL eingengt, in 1,5 mL Braunglasfläschchen überführt und bis zur GC-MS/MS Messung bei -20 °C gelagert.

Für die Messung mittels LC-MS wurden 250 µL der fertig aufgearbeiteten Sedimentproben in Acetonitril mit 750 µL Wasser (LC-MS Qualität, versetzt mit 1 mM Ammoniumacetat) verdünnt und durch 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter in 1,5 mL Braunglasvials mit Septumdeckel gegeben und bei -20 °C bis zur Messung gelagert.

Muscheln

Zur Vorbereitung der Extraktion wurden die Muschelschalen vom Weichkörper entfernt und das Muschelfleisch von jeweils drei Muscheln zu einer Probe vereinigt. Insgesamt wurden somit je Probennahmestandort neun Muscheln analysiert. Mit Hilfe einer Martin Christ™ Alpha 2-4 LSCplus™ LSCplus Gefriertrocknungsanlage wurde das Muschelfleisch im Anschluss getrocknet. Das natürlicherweise in den Muschelgeweben vorkommende Wasser, wie auch das noch vorhandene Atemwasser, könnte ansonsten die nachfolgende Analytik stören. Zum einen reagiert die GC-MS/MS empfindlich auf Restwasser im aufgearbeiteten Probenmaterial. Zum anderen sollen die STV im Gewebe erfasst werden und wässrige Bestandteile hätten somit einen verdünnenden Effekt. Dieser verdünnende Effekt gilt als Störgröße, der die Nachweisgrenze der STV erhöhen würde.

Nach der Gefriertrocknung wurden alle Proben wie folgt aufgearbeitet:

Je 0,5 g getrocknetes Muschelgewebe wurden in 15 mL Probenröhrchen eingewogen und mit 5 mL Acetonitril versetzt. Die Aufarbeitung wurde wie unter 2.1.1.1 beschrieben mit jeweils einer Unterprobe je Probenpool durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mittels GC-MS/MS (siehe 2.1.1.1) direkt analysiert oder bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde jede Probe mindestens doppelt gegen eine externe Standardreihe gemessen.

Für die Messung mittels LC-MS/MS wurden 250 µL der fertig aufgearbeiteten Muschelproben in Acetonitril mit 750 µL Wasser (LC-MS Qualität, versetzt mit 1 mM Ammoniumacetat) verdünnt und durch 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter in 1,5 mL Braunglasvials mit Septumdeckel gegeben und bei -20 °C bis zur Messung gelagert.

Plattfische

Die Einzelheiten zur Aufarbeitung der Plattfische können dem Kapitel 4.2.1.1 zum Arbeitspaket 3 „Untersuchungen zur möglichen Anreicherung von STV im marinen Nahrungsnetz“ entnommen werden.

3.2.2 Probenanalyse mittels GC-MS/MS

Die Messung der Proben erfolgte im Secondary Reaction Monitoring – Modus (SRM) mittels Thermo Fisher™ TSQ™ 8000 EVO Tandem Quadrupol Massenspektrometer, gekoppelt mit einem Thermo Fisher™ TRACE™ 1310 Gaschromatographen. Zur Trennung der Analyten wurde eine Thermo Fisher™ TG-5MS Amine GC-Säule (15 m * 0,25 cm; 0,25 µm Filmdicke) verwendet. Helium diente als Trägergas, Argon als Kollisionsgas. Die erhaltenen Spektren wurden aufgezeichnet und mit Hilfe der Software Chromeleon 7.2 der Firma Thermo Fisher analysiert.

Die Nachweisgrenzen (Limit of Detection, LoD) und Quantifizierungsgrenzen (Limit of Quantification, LoQ) wurden mittels gespikter Matrixproben bestimmt. Diese sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen verschiedener Sprengstofftypischer Verbindungen (STV) mittels GC-MC/MC (stand Oktober 2021)

STV	Sediment		Muscheln	
	LoD [ng/kg]	LoQ [ng/kg]	LoD [ng/g d.w.]	LoQ [ng/g d.w.]
1,3-DNB	0,8	2,6	0,03	0,10
2,4-DNT	0,2	0,5	0,04	0,12
TNT	0,4	1,3	0,20	0,68
4-ADNT	0,2	0,8	0,02	0,07
2-ADNT	0,2	0,8	0,02	0,08

1,3-DNB = 1,3-Dinitrobenzol; 2,4-DNT = 2,4-Dinitrotoluol; TNT = 2,4,6-Trinitrotoluol, 4-ADNT = 4-Amino-2,6-dinitrotoluol; 2-ADNT = 2-Amino-4,6-dinitrotoluol; ng/g d.w. = Nanogramm je Gramm Trockenmasse

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Sedimente

Jeweils 1 µL der erhaltenen Extrakte aus den Sedimenten wurden mit Hilfe eines Split-/splitless Injektors (SSL) für die Messungen aufgetragen. Die Injektion erfolgte im Splitless-Modus auf Quarzwolle-Liner (230 °C Injektortemperatur). Die Ofentemperatur wurde nach 0,2 min mit 30 °C*min⁻¹ von 100 auf 220 °C erhöht, nach weiteren 0,3 min zum Ausheizen schwerflüchtiger Verbindungen mit 80 °C*min⁻¹ auf 280 °C erhöht und für 1,0 min gehalten (Gesamtlaufzeit 6,25 min).

Muscheln

Von den Muschelextrakten wurden jeweils 5 µL unter Verwendung eines Kaltaufgabesystems (PTV) bei 70 °C auf einen Quarzwolle-Liner aufgegeben und das Lösungsmittel im Trägergasstrom entfernt. Die Analyten wurden anschließend durch Erhöhung der Injektortemperatur (5 °C*s⁻¹ auf 240°C) auf die Säule aufgebracht. Die Initialtemperatur des Ofens von 100 °C wurde für 1,0 min gehalten, anschließend mit 35 °C*min⁻¹ auf 220 °C erhöht und nach 0,7 min bis zum Ende der Gesamtmesszeit (6,99 min) mit 70 °C*min⁻¹ bei 280 °C ausgeheizt.

Plattfische

Die Einzelheiten zur Analysierung mittels GC-MS/MS können dem Kapitel 4.2.2.1 zum Arbeitspaket 3 „Untersuchungen zur möglichen Anreicherung von STV im marinen Nahrungsnetz“ entnommen werden.

3.2.3 Probenanalyse mittels LC-MS/MS

Aufgrund seines hohen Schmelzpunkts (205 °C) ist RDX (Hexogen; 1,3,5-Trinitroperhydro-1,3,5-triazin) mit gaschromatographisch gekoppelten Methoden nur schwer nachweisbar. HMX (Oktogen; 1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-tetrazocan) zersetzt sich bei etwa 280 °C und ist daher mit diesen Methoden ebenfalls nicht nachweisbar. Für den Nachweis von RDX und HMX in messfertigen Proben bis in den Spurenbereich (Konzentrationen von fg/µl) sind daher tandem-massenspektrometrische Methoden erforderlich, die eine zweifelsfreie Identifizierung und Quantifizierung in diesen Konzentrationsbereichen ermöglichen. Aus diesem Grund werden flüssig-chromatografisch gekoppelte Methoden verwendet, z. B. die EPA-Methode 8330.

Gemessen wurde mit einem QTrap5500 Tripple-Quadrupol-Massenspektrometer unter Verwendung einer Turbo V ESI-Ionenquelle. Das MS war mit einer UHPLC gekoppelt, die aus einer Shimadzu Nexera LC-40D XS quaternären Pumpe mit Entgaser, einem Agilent G1316A Säulenofen und einem CTC HTS PAL Autosampler mit einem Cool Stack (5 °C) und einem VICI Cheminert 6-Port Injektionsventil, ausgestattet mit einer 5 µL Probenschleife, bestand. Die Trennung wurde auf einer RESTEK Raptor Biphenyl 1,8 µm Säule (150 mm * 2,1 mm) mit Vorsäule durchgeführt. Weitere Säulentypen (u.a. C-18 und Acclaim E2 Sprengstoffsäulen von Thermo Fisher) wurden getestet, jedoch konnte mit diesen eine Basislinientrennung der ADNTs nicht erreicht werden, was ihre Quantifikation behindert. Der Lösungsmittelgradient und die Ofentemperatur wurden auf die Trennung der ADNTs hin optimiert. Die Messung beginnt mit einer 5-minütigen isokratischen Phase mit einem Verhältnis von 40 % Wasser (mit 1 mM Ammoniumacetat) und 60 % Methanol bei 0,25 mL/min und 35 °C, welche dann bis zur 6. Minute auf 95 % Methanol erhöht und sechs Minuten lang beibehalten wurde. Nach Beendigung der Messung wurde das ursprüngliche Verhältnis für sieben Minuten wiederhergestellt. Die Verwendung von Acetonitril als organische Phase, sowie Ammoniumformiat statt Ammoniumacetat wurden ebenfalls getestet, jedoch im Vergleich zum beschriebenen Programm als unzureichend hinsichtlich der Trennleistung verworfen.

Die Retentionszeiten und SRM-Übergänge sind in Tabelle 5 angegeben. Die Spektren wurden in Sciex Analyst 1.7.2 aufgenommen und in Sciex MultiQuant 3.0.3 ausgewertet.

Tabelle 5: LC-MS/MS Retentionszeiten und Übergänge

Verbindung	Retentionszeit [min]	Vorläuferion (m/z)	Quantifizierungsion (m/z)	Kollisionsenergie (eV)
RDX	2.39	281.0	46.0	-33
HMX	2.11	355.0	46.0	-38
TNT	9.04	226.0	46.0	-50
4-ADNT	4.36	196.0	149.0	-19
2-ADNT	4.59	196.0	46.0	-56

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Bestimmung der Nachweisgrenzen der LC-MS/MS-Methoden

Die gerätespezifischen Nachweisgrenzen (LODs) wurden wie in Bünning et al. (2021) beschrieben unter Verwendung von Lösungsmittelstandards gemäß der Kalibrierstandardmethode EUR 28099 DE bestimmt. Die auf die Säulen aufgetragenen Volumina betragen 5 µL, festgelegt durch die Größe der verwendeten Probenschleife. Die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde auf das 3,3-fache der LOD festgelegt. Die LODs und LOQs sind mit dem jeweiligen Bestimmtheitsmaß (R^2) in Tabelle 6 aufgeführt. Je näher R^2 am Wert 1 liegt, umso dichter liegen die Daten an der jeweils ermittelten Regressionsgeraden (Abb. 13). Die Linearität der Methoden zwischen 0,1 und 50 ng/mL wurde somit bestätigt (Tab. 6 und Abb. 13).

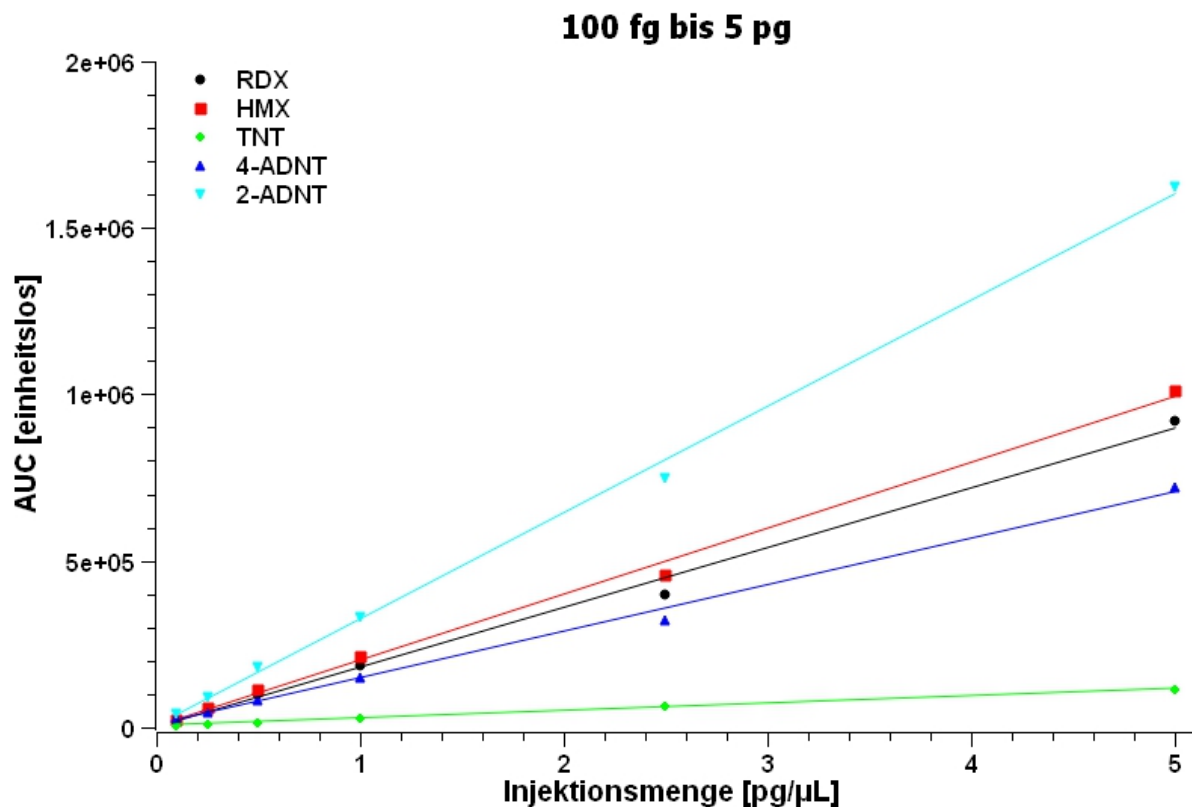
Eine weitere Absenkung der Nachweisgrenze ist durch Verwendung einer Probenschleife mit 10 oder 20 µL Volumen möglich, wodurch es jedoch zu einer schnelleren Verschmutzung des Gerätes und einer niedrigeren Obergrenze des linearen Bereiches kommt.

Tabelle 6: Gerätespezifische Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen (LoD und LoQ) der GC-MS/MS und LC-MS/MS-Methoden

STV	GC-MS/MS SSL			GC-MS/MS PTV			LC-MS/MS		
	LoD [fg/µL]	LoQ [fg/µL]	R^2	LoD [fg/µL]	LoQ [fg/µL]	R^2	LoD [fg/µL]	LoQ [fg/µL]	R^2
1,3-DNB	333	1099	0,9444	32	105	0,9644	-	-	-
2,4-DNT	77	254	0,9968	10	33	0,9934	-	-	-
RDX	-	-	-	-	-	-	97	320	0,9856
HMX	-	-	-	-	-	-	87	287	0,9884
TNT	152	502	0,9879	47	155	0,9878	131	430	0,9730
4-ADNT	95	314	0,9951	8	26	0,9959	124	412	0,9764
2-ADNT	103	341	0,9943	11	37	0,9919	83	274	0,9893

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Abbildung 13: Regressionsgeraden zur Bestimmung der Nachweisgrenzen für Injektionen von 100 fg bis 5 pg verschiedener sprengstofftypischer Verbindungen mittels LC-MS/MS.



Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Probenvorbereitung (alle Matrices)

Für die Messung mittels LC-MS/MS wurden 250 µL der fertig aufgearbeiteten Biota- und Sedimentproben in Acetonitril mit 750 µL Wasser (LC-MS Qualität, versetzt mit 1 mM Ammoniumacetat) verdünnt und durch 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter in 1,5 mL Braunglasvials mit Septumdeckel gegeben und bei - 20 °C bis zur Messung gelagert.

3.3 Ergebnisse Arbeitspaket 2

3.3.1 Chemische Analytik

3.3.1.1 Mecklenburg-Vorpommern

Sedimente

In den vom IfAÖ gesammelten Sedimenten aus den Regionen Wismar-Bucht, Poel, Unterwarnow und Warnemünde aus 2020/2021 konnten keine Hinweise auf das Vorhandensein von Sprengstofftypischen Verbindungen gefunden werden (TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT, 1,3-DNB). Die im Herbst 2021 gesammelten Sedimentproben enthalten ebenfalls keine STV (TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT, 1,3-DNB).

Muscheln

In den Miesmuschelproben der Sammlung Herbst 2020/Frühjahr 2021 der Regionen Wismar-Bucht, Poel, Unterwarnow und Warnemünde ergaben sich keine Hinweise auf das Vorhandensein von STV (TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT, 1,3-DNB). Auch in den im Herbst 2021

gesammelten Miesmuscheln und Zebrauscheln konnten keine STV (TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT, 1,3-DNB) detektiert werden.

3.3.1.2 Niedersachsen

Sedimente

In den gesammelten Sedimenten aus dem Jahr 2020 konnten an fünf der sieben Standorte Sprengstofftypische Verbindungen nachgewiesen werden (Tab. 7). Bis auf eine Probe, die im August 2020 bei Spiekeroog entnommen wurde, liegen die Konzentrationen jedoch unterhalb des Limits of Quantification (LoQ). Für 1,3-Dinitrobenzol (1,3-DNB) bedeutet dies, dass die Konzentrationen zwischen 0,8 und kleiner 2,6 ng/kg Sediment, für TNT zwischen 0,4 und kleiner 1,3 ng/kg, 4-Amino-2,6-dinitrotoluol (4-ADNT) zwischen 0,2 und kleiner 0,8 ng/kg und 2-Amino-4,6-dinitrotoluol (2-ADNT) 0,2 und kleiner 0,8 ng/kg sind (Tab. 4). Die im August 2020 entnommene Probe im Jadebusen enthält als einzige 2- und 4-ADNT oberhalb des Limits of Quantification (Tab. 7).

In den im Jahr 2022 gesammelten Sedimenten konnten zum Teil ebenfalls STV nachgewiesen werden (Tab. 7). Die gemessenen Konzentrationen lagen im Spurenbereich von maximal ca. 1 ng/kg getrocknetem Sediment. In der Sedimentprobe aus der Region Jadebusen konnte TNT und 4-ADNT detektiert werden sowie in der Probe aus der Region Norderney. In der Probe der Region Jade/Mellum wurde TNT im genannten Konzentrationsbereich gefunden. Der TNT Metabolit 2-ADNT wurde oberhalb des LoD aber unterhalb der Quantifizierungsgrenze in den Sedimentproben aus der Region Jadebusen, Norderney und Borkum detektiert. Die Proben aus der Region Wurster Watt und Spiekeroog zeigten keine Hinweise auf STV.

Tabelle 7: Ergebnisse der STV Analytik der Sedimentproben aus Niedersachsen von 2020 und 2022

Standort	Datum	1,3-DNB	2,4-DNT	TNT	4-ADNT	2-ADNT	RDX	HMX
Norderney	08/20	-	-	> LoD < LoQ	> LoD < LoQ	> LoD < LoQ	*	*
Borkum	10/20	> LoD < LoQ	-	-	> LoD < LoQ	> LoD < LoQ	*	*
Wurster Küste	08/20	-	-	-	-	-	*	*
Spiekeroog	09/20	-	-	-	-	-	*	*
Jadebusen	08/20	-	-	> LoD < LoQ	~ 1 ng/kg	< 1 ng/kg	*	*
Jadebusen	09/20	-	-	> LoD < LoQ	-	-	*	*
Jade/Mellum	08/20	-	-	-	> LoD < LoQ	> LoD < LoQ	*	*
Norderney	08/22	<LoD	<LoD	~1 ng/kg	~1 ng/kg	> LoD < LoQ	<LoD	<LoD
Borkum	12/22	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	> LoD < LoQ	<LoD	<LoD
Wurster Küste	11/22	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
Spiekeroog	09/22	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
Jadebusen	08/22	<LoD	<LoD	~1 ng/kg	~1 ng/kg	> LoD < LoQ	<LoD	<LoD
Jade/Mellum	12/22	<LoD	<LoD	~1 ng/kg	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD

>LoD <LoQ = STV oberhalb des Detektionslimits nachgewiesen, jedoch unterhalb der Quantifizierungsgrenze (siehe Tabelle 4); - = keine STV detektierbar oder unterhalb des Detektionslimits (LoD); <LoD = Messsignal unterhalb des LoD (siehe Tabelle 4); ~ = auf- bzw. abgerundeter Wert (siehe Tabelle 4); * = keine Messung durchgeführt.

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Miesmuscheln

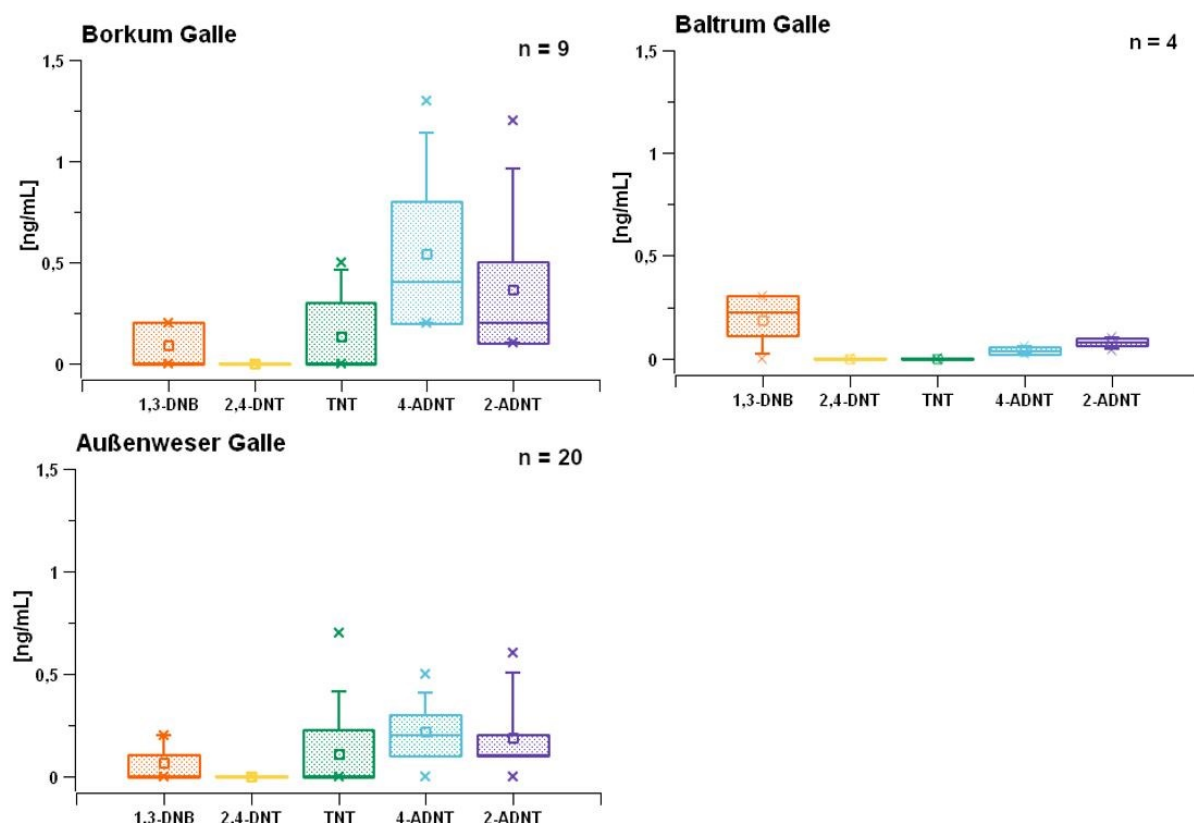
Die aufgearbeiteten Muscheln aus Niedersachsen von 2020 wurden zweimal jeweils doppelt an der GC-MS/MS gemessen. Die Ergebnisse deuten nicht auf das Vorhandensein von STV (TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT, 1,3-DNB) in den Proben hin.

Die Miesmuscheln aus 2022 wurden sowohl mittels GC-MS/MS als auch an der LC-MS/MS auf das Vorhandensein von STV untersucht. Es konnten keine Hinweise auf STV (TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT, 1,3-DNB, RDX, HMX) in den untersuchten Miesmuscheln festgestellt werden.

Plattfische

Es wurden insgesamt 33 Filet- und Galleproben auf STV untersucht. Davon stammen neun Proben aus dem Fanggebiet Borkum, vier aus dem Gebiet seeseitig der Insel Baltrum und 20 aus der Fangregion Außenweser (Abb. 10). In den Galleproben der Region Borkum konnte 1,3-DNB, TNT sowie die TNT-Metabolite 2- und 4-ADNT gemessen werden (Abb. 14). Die gemessenen Höchstkonzentrationen betragen 0,25 ng/ml 1,3-DNB, 0,5 ng/ml TNT, 1,25 ng/ml 4-ADNT und 1,2 ng/ml 2-ADNT. Die Galleproben der Plattfische aus der Region Baltrum enthielten 2- und 4-ADNT deutlich unterhalb von 0,25 ng/ml und 1,3-DNB in einer Größenordnung von ca. 0,25 ng/ml (Abb. 14). Die in der Außenweser gefangenen Plattfische enthielten in ihrer Gallenflüssigkeit bis zu 0,25 ng/ml 1,3-DNB, 0,75 ng/ml TNT und 0,4 ng/ml bzw. 0,5 ng/ml 4- und 2-ADNT (Abb. 14).

Abbildung 14: STV-Konzentrationen in Galleproben von im Jahr 2019 gefangenen Plattfischen in Niedersachsen

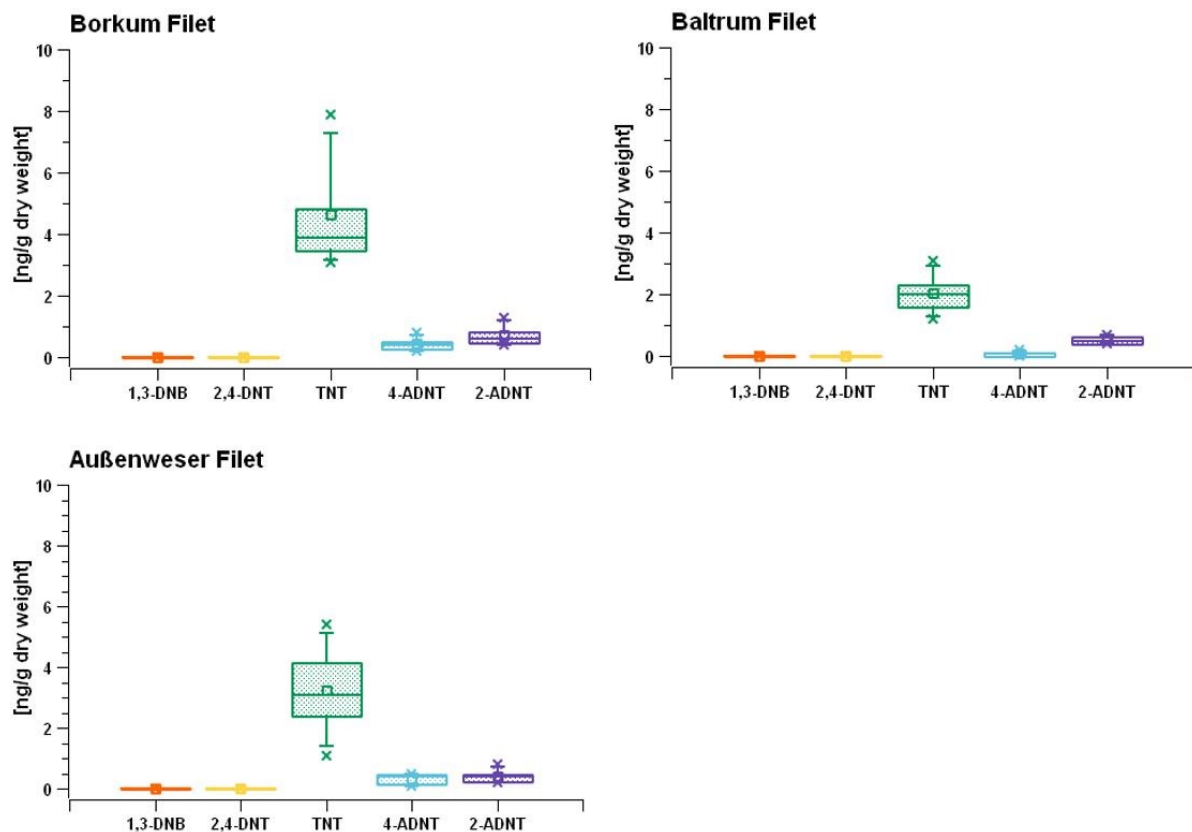


Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

In den Filetproben der Plattfische konnten ebenfalls Rückstände von STV gemessen werden. Die TNT-Metabolite 2- und 4-ADNT wurden in allen drei Fangregionen in Konzentrationen von

maximal 1 ng/g Trockengewicht gemessen (Abb. 15). TNT wurde dagegen in den Fischen des Fanggebiets Borkum mit bis zu 8 ng/g gemessen, in den Fischen aus der Baltrumer Region bis zu 3 ng/g und dem Bereich Außenweser bis zu 6 ng/g (Abb. 15). Nach dem Trocknen reduzierte sich das Gewicht der Proben auf $20,4 \pm 1,9$ % des Feuchtgewichtes (Minimalwert: 15,2 %, Maximalwert 28,8 %, n = 81 Fische).

Abbildung 15: STV-Konzentrationen in Fischfilet von im Jahr 2019 gefangenen Plattfischen in Niedersachsen



Borkum n = 9, Baltrum n = 4, Außenweser n = 20

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

3.3.1.3 Schleswig-Holstein

Sedimente

Die Sedimentprobe aus der Flensburger Innenförde des Jahres 2020 enthielt keine messbaren STV-Konzentrationen (TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT, 1,3-DNB).

Miesmuscheln

In den Miesmuscheln der Flensburger Innenförde aus den Jahren 2020 und 2021 konnten keine STV (TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT, 1,3-DNB) nachgewiesen werden.

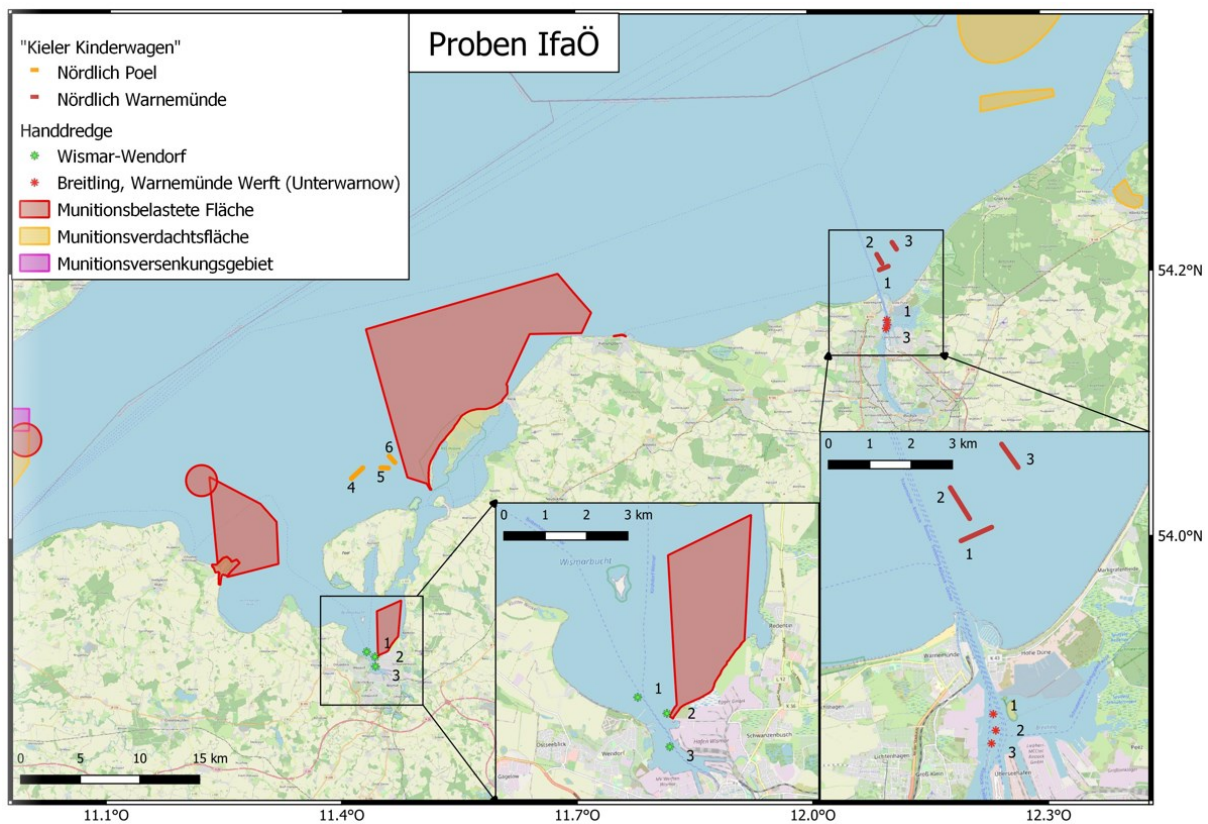
3.3.2 Identifizierung von Hot-Spots

3.3.2.1 Mecklenburg-Vorpommern

Auch wenn in den Proben aus Mecklenburg-Vorpommern aktuell keine STV gefunden wurden, so ist durch Abgleich mit dem Munitionskataster AmuCad zu erkennen, dass die Probennahmeorte Wismar und nördlich der Insel Poel in unmittelbarer Nähe

Munitionsbelasteter Gebiete liegen (Abb. 16). Die Insel Poel liegt sogar zwischen zwei belasteten Flächen mit einer Größe von mehreren Quadratkilometern. Hier ist bei allen Flächen zu vermuten, dass die Munitionsbelastung über die ausgewiesenen Gebiete hinausgeht, da es sich hierbei um ehemalige Schießgebiete handelt. Bei Wismar-Wendorf befindet sich der Bereich der ehemaligen Norddeutschen Dornierwerke GmbH, die während des Zweiten Weltkrieges bombardiert wurden. Nach Kriegsende wurden sie 1945 gesprengt. Bis ungefähr 1990 wurde dieses Gebiet als Truppenübungsplatz genutzt mit zusätzlichem Beschuss des angrenzenden Flachwasserbereichs. Es besteht daher die Möglichkeit einer Belastung mit Bomben, Wurf- und Panzergranaten sowie Infanterie- und Flakmunition (Böttcher et al., 2011). Es ist somit nicht auszuschließen, dass in zukünftig gesammelten Proben Rückstände von STV gefunden werden.

Abbildung 16: Darstellung der Probennahmeorte in Mecklenburg-Vorpommern im Jahr 2020/21 und der Munitionsflächen des Munitionskatasters AmuCad

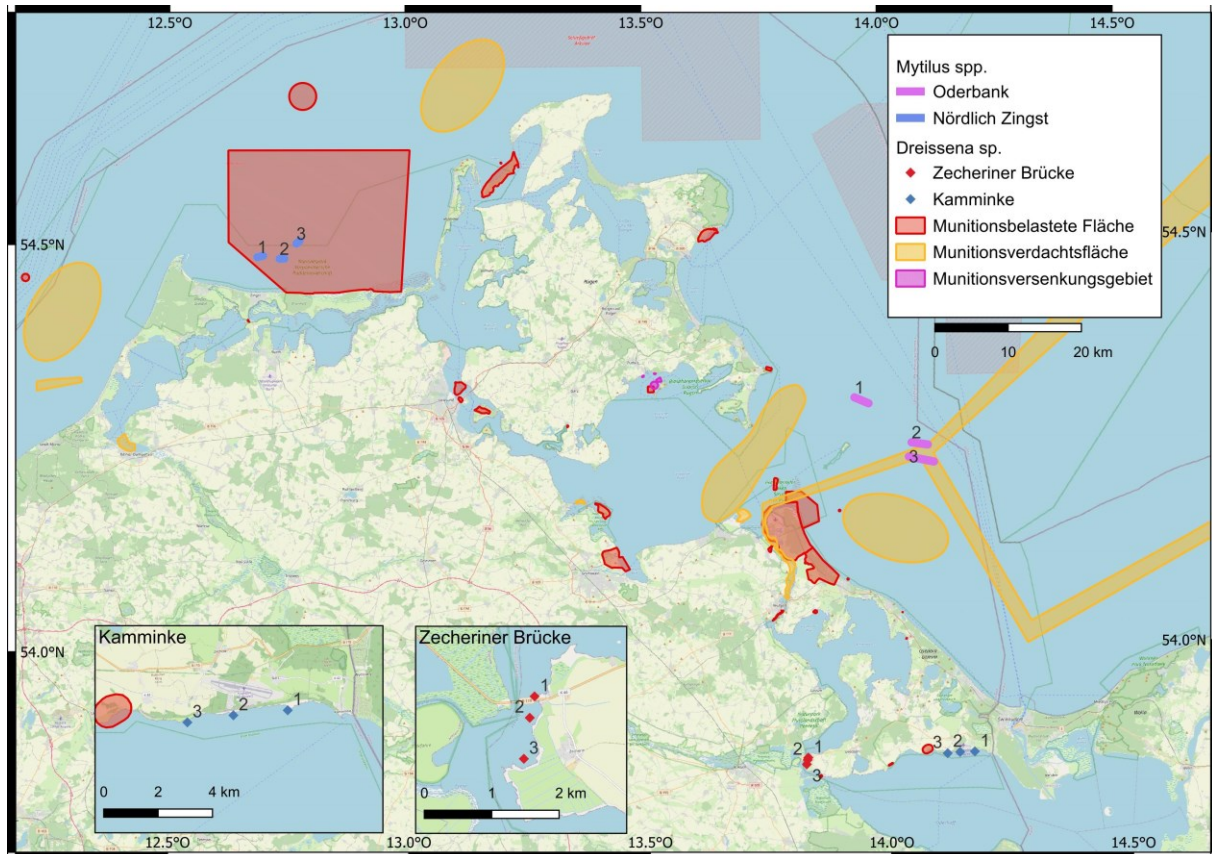


Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Das im Jahr 2021 beprobte Gebiet „Nördlich Zingst“ liegt mitten in einer munitionsbelasteten Fläche (Abb. 17). Das Gebiet entspricht den in alten Unterlagen bekannt gegebenen Grenzen der damaligen Schießgebiete, für die bei Schießbetrieb Warnungen ausgesprochen wurden, bzw. sogar ein Einfahr- oder Einflugverbot bestand (Böttcher et al., 2011). Untersuchungen zur Belastung mit Altmunition sowie der tatsächlichen flächenmäßigen Ausdehnung sind bisher nicht erfolgt. Es ist jedoch mit Abwurfmunition aller Art zu rechnen, auch Verklappungen in diesem Bereich können nicht ausgeschlossen werden (Böttcher et al., 2011). Die Probennameregion „Oderbank“ liegt zum Teil in einer Munitionsverdachtsfläche (Abb. 17). Diese markiert die Zufahrtswege zum Versenkungsgebiet östlich von Bornholm (Böttcher et al., 2011). In der Nähe der Beprobungsstellen „Kamminke“ liegt die munitionsbelastete Fläche Dargen Hafen, jedoch ohne weitere Angaben zu möglichen Munitionsvorkommen (Böttcher et al., 2011).

Zusammenfassend konnten daher für die untersuchten Ostseeregionen in Mecklenburg-Vorpommern bisher keine Hot-Spots identifiziert werden.

Abbildung 17: Probennahmeorte in Mecklenburg-Vorpommern im Herbst 2021 und die lokalen Munitionsgebiete des Munitionskatasters AmuCad



Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

3.3.2.2 Niedersachsen

Die Ergebnisse zeigen, dass in den Sedimenten und Plattfischen der Niedersächsischen Nordseeküste STV detektiert werden konnten. Abbildung 18 zeigt eine Übersicht der Probennahmeorte aus Niedersachsen mit den aus dem Munitionskataster AmuCad bekannten munitionsbelasteten Flächen, Verdachtsflächen und Munitionsversenkungsgebieten.

Im Fischfanggebiet Borkum liegt das Munitionsversenkungsgebiet „NSW01L Ems, Osterems“ (Böttcher et al., 2011). Die Wassertiefe beträgt in diesem Gebiet bis zu 15 Meter und hat eine Größe von ungefähr 275 ha (Böttcher et al., 2011). Munition von den westlichen Inseln Borkum, Juist und Norderney und aus der Stadt Emden sind in diesem Gebiet versenkt worden. Genaue Angaben sind jedoch nicht bekannt. Es gibt unter anderem Hinweise auf 2.000 t Minen sowie Granaten, Bomben, Torpedos, Panzerfäuste, Kleinmunition sowie Teller- und Seeminen (Böttcher et al., 2011). Im Bereich Osterems besteht bei allen Aktivitäten am Meeresgrund die konkrete Gefahr, ungewollt mit Kampfmitteln in Kontakt zu kommen (Böttcher et al., 2011). Gerade bei bekannten Versenkungsgebieten ist damit zu rechnen, dass sich auch außerhalb der deklarierten Flächen Munitionsvorkommen auffinden lassen, da es während des Verklappens der Altmunition, zum Beispiel durch lokal ansässige Fischer, meistens auch zum so genannten „On-Route Dumping“ gekommen ist. Auf den Wasserwegen zwischen Festland und den

ausgewiesenen Versenkungsgebieten wird somit auch immer wieder Altmunition gefunden. Das wird auch verstärkt für dieses Versenkungsgebiet bei der Insel Borkum angenommen. Daher kann auch in der Sammelregion der Miesmuscheln um Borkum (Bork_Myt_1) sowie im Fanggebiet der Plattfische zwischen den Inseln Borkum und Juist das Auftreten von Munitionsaltlasten nicht ausgeschlossen werden. Abgleiche mit den Munitionsfunden der Jahre 2019 und 2020 bestätigen dies (BLANO, 2023). So wurden im November 2019 beim Offshore-Windpark Borkum Riffgrund 2 Munitionskisten sowie zwei britische Raketen 25 lbs gefunden. Im Juli 2020 wurden zudem im selben Gebiet eine britische Grundmine und ein weiteres Munitionsteil unter Einsatz eines Blasenschleiers vor Ort gesprengt sowie zwei weitere britische Raketen 25 lbs gefunden. Des Weiteren wurden in 2019 und 2020 Waffenteile, Sprenggranatpatronen, Minen-Druckzünder und zwei 100 kg schwere Munitionsteile im nördlichen Wattgebiet der Insel Juist gefunden. Die Funde lagen dabei außerhalb von bekannten munitionsbelasteten Flächen oder Versenkungsgebieten. Durch voranschreitende Korrosion könnten somit in diesen beiden Untersuchungsgebieten zukünftig STV in die Miesmuscheln und andere Biota übergehen, so wie es schon in diesem Arbeitspaket in Sedimentproben und Plattfischen nachgewiesen wurde. Plattfische halten sich vorzugsweise am Meeresgrund auf und sind verhältnismäßig ortstreu. Sie enthielten die höchsten STV-Konzentrationen, die in diesem Arbeitspaket gemessen wurden, was sich durch die Nähe zum Munitionsversenkungsgebiet „Ems, Osterems“ erklären ließe.

In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass der beprobte Standort Norderney (Miesmuscheln) direkt in einem als belastete Fläche deklarierten Gebiet liegt. Laut Böttcher et al. (2011) kommt es in der Region zu kleineren Häufungen von Munition. Zum Beispiel wurden Splitterbomben im Watt gefunden. STV konnten in Muscheln aus diesem Gebiet bisher nicht nachgewiesen werden, jedoch zum Großteil in Spuren unterhalb der Quantifizierungsgrenze in den entsprechenden Sedimentproben. Plattfische, die im nördlich von Norderney gelegenen Gebiet Baltrum gefangen wurden, enthalten die geringsten STV-Konzentrationen in Galle und Filet, die in diesem Arbeitspaket gemessen wurden. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür ist, dass innerhalb des Fanggebiets direkt keine größeren Munitionsvorkommen bekannt sind, jedoch sind auch hier Munitionsfunde zu vermelden (BLANO 2020). Des Weiteren könnten sich die hier gefangenen Fische auch durchaus temporär in den nahe gelegenen mit Munition belasteten Gebieten Norderney und nördlich Spiekeroog (Abb. 18) aufgehalten haben.

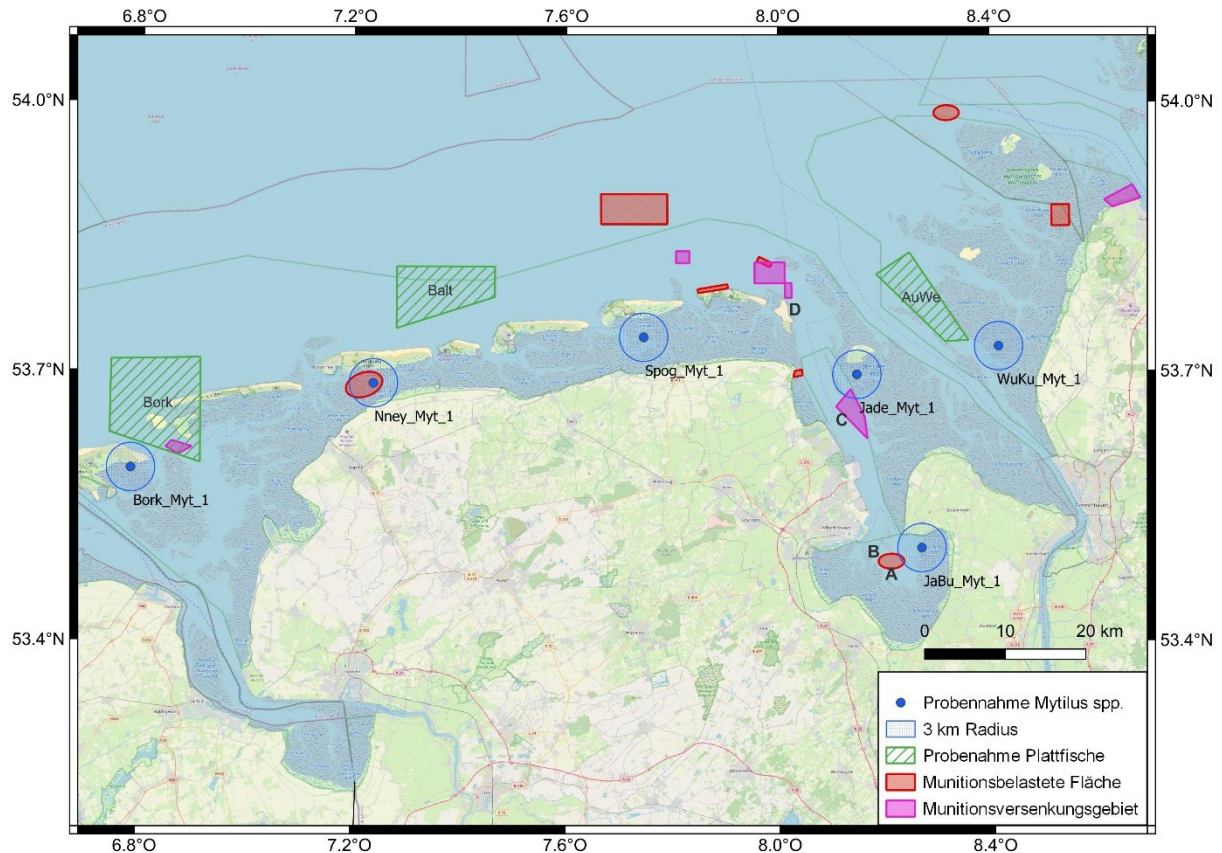
Die Sammelregion Jadebusen und Jade/Mellum überlappen ebenfalls mit einem munitionsbelasteten Gebiet bzw. einem bekannten Munitionsversenkungsgebiet (Böttcher et al., 2011). Es wird geschätzt, dass sich in diesem Gebiet zwischen 650.000 und 1,2 Millionen Tonnen konventioneller Munition befinden, der größte Teil davon in der Munitionsdeponie Hooksielplate (Abb. 18 Gebiet C und Abb. 7 Gebiet C) (Böttcher et al., 2011). In den Sedimentproben der nahe gelegenen Sammelregion Jade/Mellum wurden die TNT-Metabolite 2- und 4-ADNT im nicht quantifizierbaren Spurenbereich gefunden. Die Miesmuscheln waren frei von STV. In diesem Gebiet ist aber zukünftig mit einer zunehmenden Freisetzung von STV aufgrund der fortschreitenden Korrosion von Munitionskörpern zu rechnen. Die fortschreitende Korrosion würde auch das zunehmende Vorkommen von STV in Miesmuscheln der Umweltprobenbank des Bundes erklären (siehe Kapitel 2), die in Eckwarderhörne gesammelt wurden, was in der Nähe des Sammelgebietes JaBu_Myt_1 liegt. In den in diesem Arbeitspaket analysierten Miesmuscheln aus der Region Jadebusen konnten zwar keine STV nachgewiesen werden, jedoch wurden hier die höchsten STV-Konzentrationen der analysierten Sedimentproben detektiert, auch wenn sich diese im Spurenbereich von ca. 1 ng/kg befinden. Die sich in der Nähe befindende munitionsbelastete Fläche „Jade, Innere Jappensand“ (Abb. 18 Gebiet A und Abb. 7 Gebiet A) enthält nach aktuellen Erkenntnissen zwar erheblich weniger Munition als das Versenkungsgebiet Hooksielplate, jedoch wurden auch hier Großsprengkörper

wie Wasserbomben gefunden (Böttcher et al., 2011). Auch wurden in unmittelbarer Nähe der Sammelstelle, zum Beispiel zwischen 2006 und 2007, Bomben und Rauchbomben geborgen (Warmke, 2022), was auch zukünftig nicht ausgeschlossen werden kann. STV in Sediment und Muscheln könnten auch durch gezielte Sprengungen von Minen und Bomben, zum Beispiel auf der Sandbank Jappensand, einem Gebiet in unmittelbarer Nähe des Probennahmegebiets (Abb. 18 Gebiet B und Abb. 7 Gebiet B), erklärt werden (Warmke, 2022). So wurden zum Beispiel im April 2011 104 Wasserbomben vom Typ MK11/MK6 im nördlichen Teil der Jappensandbucht gefunden und gezielt gesprengt (Böttcher et al., 2011). Auch Munitionssprengungen auf anderen Sandbänken in der Nähe der Jadebucht können zu einem kurzfristigen Anstieg der Konzentration von STV in den Muschelproben der Umweltprobenbank des Bundes (siehe Kapitel 2) wie auch in diesem Arbeitspaket gesammelten Miesmuscheln führen, da das kontaminierte Wasser mit dem Einsetzen der Flut in den Jadebusen gedrückt wird. So werden auf der Minsener Oog (Abb. 18 Gebiet D und Abb. 7 Gebiet D) seit einigen Jahren gezielt Munitionskörper gesprengt (persönliche Kommunikation mit den Verantwortlichen im Jahr 2021), wie z. B. im Jahr 2014, als auf der Minsener Oog 24 Ankertauminen gezielt gesprengt wurden (Böttcher et al., 2014). Ankertauminen enthalten jeweils bis zu 350 kg Sprengstoff (Böttcher et al., 2011). Gezielte Sprengungen könnten auch die Ursache für die unterschiedlich hohen STV-Konzentrationen in den beiden Sedimentproben der Region Jadebusen aus dem Jahr 2020 sein. Diese wurden im Abstand von einem Monat gesammelt, unterscheiden sich jedoch in ihrem Gehalt an STV deutlich. So wurden beispielsweise im September 2020 nördlich der Insel Wangerooge drei deutsche Ankertauminen und eine US-Wasserbombe an der Luft gesprengt sowie Sprengstoff, eine Panzerfaust, Sprenggranaten und weitere Munitionsteile (insgesamt mindestens 41 Stück) durch den Kampfmittelbergungsdienst entsorgt. Im Oktober wurden im selben Gebiet 13 Ankertauminen an der Luft gesprengt (BLANO, 2023). Auch wurden in 2019 und 2020 Munitionsfunde außerhalb der ausgewiesenen munitionsbelasteten Flächen und Versenkungsgebieten gemeldet, wie zum Beispiel nördlich von Schillig, was zum Zustromgebiet in den Jadebusen gehört. Dort wurden beispielsweise im Juli 2020 69 Munitionsteile (73,5 kg) durch den Kampfmittelbeseitigungsdienst entfernt (BLANO, 2023). Im Oktober 2020 wurden bei der Insel Mellum über 444 Munitionsobjekte wie verschiedene Arten von Granaten und Patronen geborgen (BLANO, 2023).

In den Plattfischen aus dem Fanggebiet Außenweser wurden die zweithöchsten STV-Konzentrationen in Galle und Filet gemessen. Hier befinden sich zwar direkt im Fanggebiet keine bekannten größeren Munitionsvorkommen, jedoch könnten sich die Fische auch zeitweise in mit Munition belasteten Gebieten aufgehalten haben. In Abbildung 18 ist erkennbar, dass im Umkreis von ca. 20 Kilometern vom Fanggebiet entfernt zwei Munitionsversenkungsgebiete liegen sowie eine munitionsbelastete Fläche.

In den Sammelregionen Wurster Nordseeküste und der Insel Spiekeroog befinden sich in einem Umkreis von mindestens drei Kilometern bisher keine bekannten Altmunitionsflächen. Trotzdem wurden in 2019 bei Spiekeroog verschiedene Munitionsteile gefunden, wie zum Beispiel Treibladungsgebilde und Sprenggranatenpatronen. Auch wurden im April 2020 im nördlichen Wattgebiet der Insel Wangerooge über 540 Munitionsobjekte durch den niedersächsischen Kampfmittelbeseitigungsdienst entsorgt. In den Miesmuscheln und Oberflächensedimentproben konnten hier jedoch keine STV nachgewiesen werden.

Abbildung 18: Übersicht der beprobten Gebiete in Niedersachsen mit den Daten des Munitionskatasters AmuCad



Bork = Borkum, Nney = Norderney, Spog = Spiekeroog, Jade = Jade/Mellum, JaBu = Jadebusen, WuKu = Wurster Watt, Balt = Baltrum, AuWe = Außenweser, A = munitionsbelastete Fläche „Jade, Innere Jappensand“, B = nördlicher Teil der Sandbank Jappensand, C = Munitionsversenkungsgebiet „Jade, Hooksielplate“, D = Minsener Oog.

Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Zusammenfassend konnte durch die Untersuchungen in den Bereichen der Niedersächsischen Nordsee gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen Munitionsvorkommen und dem Auftreten von STV in Sediment und Biota besteht. Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse kristallisieren sich im Bereich der Niedersächsischen Nordsee mehrere Hot Spots bezüglich der Freisetzung von STV heraus. Dazu zählen die Regionen im Bereich der Jade und des Jadebusens sowie die Ostfriesischen Inseln, hier vor allem Borkum und Baltrum. Da bisher nur in diesen wenigen Regionen Miesmuscheln und Sediment genommen bzw. Plattfische gefangen wurden, könnten bei einer räumlichen Ausdehnung der Probennahmegebiete möglicherweise noch weitere Hot Spots identifiziert werden.

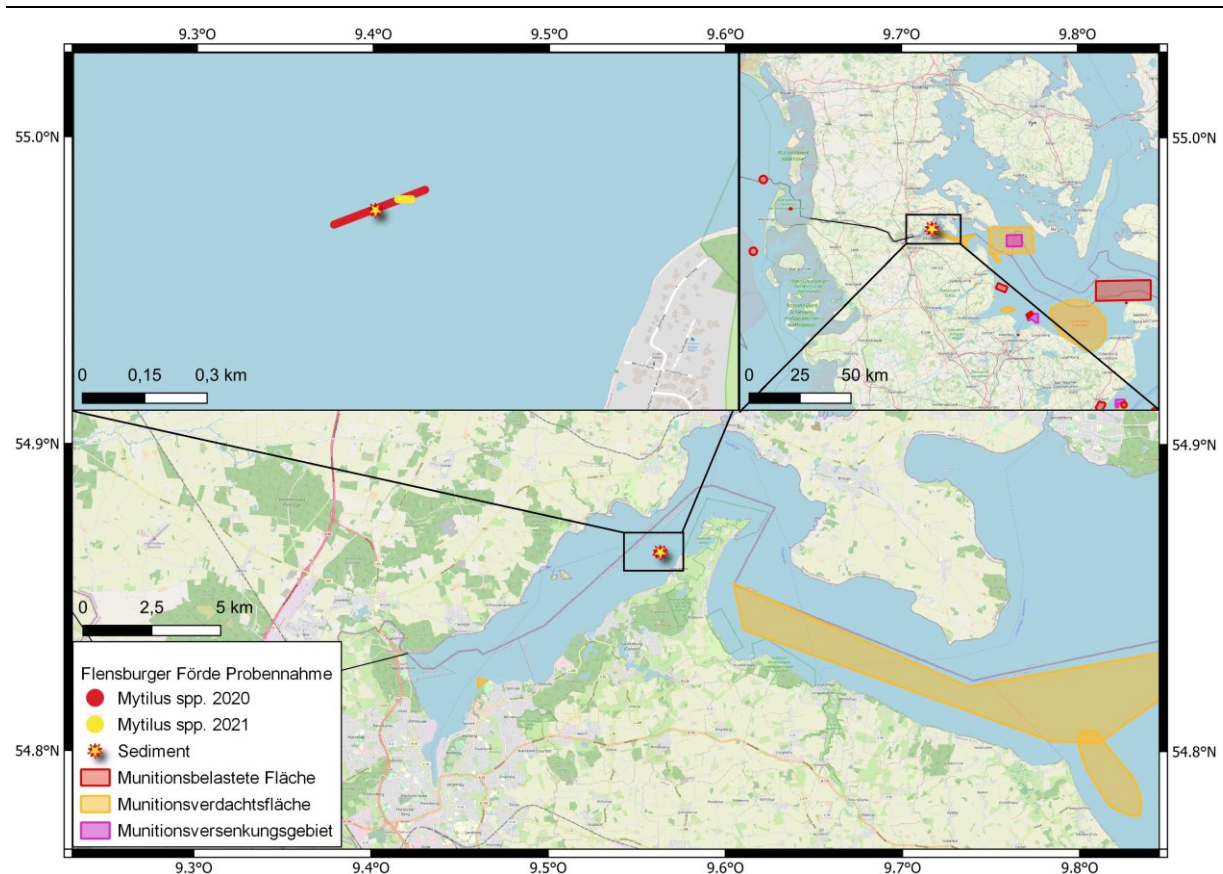
3.3.2.3 Schleswig-Holstein

Das Probennahmegebiet für Miesmuscheln und Sedimentproben in der Flensburger Förde liegt nicht in unmittelbarer Nähe einer mit Munition belasteten Fläche oder eines Versenkungsgebiets (Abb. 19). Die Probennahmeregion wird von einer von Glücksburg ausgehenden Landzunge abgeschirmt. Östlich dieser Landzunge befindet sich zwar eine größere Munitionsverdachtsfläche aber ohne nähere Angaben zu möglichen Munitionsvorkommen. In der nahegelegenen Geltinger Bucht wurden gegen Ende des Zweiten Weltkriegs mehrere U-Boote versenkt. Diese hatten zum Zeitpunkt des Versenkens Munition an Bord geladen, die aber teilweise schon vorher über Bord geworfen und in der Bucht versenkt worden war (Böttcher et

al., 2011). Trotz zahlreicher Bergungsmaßnahmen sind weitere Munitionsvorkommen wahrscheinlich.

Da die im Rahmen des Projekts untersuchten Miesmuschel- und Sedimentproben lediglich aus einem Gebiet der schleswig-holsteinischen Ostsee stammen, konnten somit an dieser Stelle keine Hot-Spot Identifizierung stattfinden. Aus dem vom BMBF geförderten Projekt UDEMM (Umweltmonitoring für die Delaboration von Munition im Meer) ist jedoch bekannt, dass im Munitionsversenkungsgebiet Kolberger Heide bei Kiel STV in Wasser, Biota und gezielt exponierten Miesmuscheln nachgewiesen werden konnten (Appel et al., 2018; Beck et al., 2022, 2019; Gledhill et al., 2019; Maser and Strehse, 2020; Strehse et al., 2017; UDEMM, 2019). Dieses Gebiet in der schleswig-holsteinischen Ostsee kann somit als Hot-Spot bezeichnet werden. Des Weiteren konnte TNT in allen Wasserproben, die entlang der deutschen Ostseeküste im Oktober 2021 genommen wurden, mit einer mittleren Konzentration von 3 ng/L gemessen werden, was ein Vorkommen von STV auch außerhalb bekannter Versenkungsgebiete und munitionsbelasteter Flächen belegt (Esposito et al., 2023).

Abbildung 19: Darstellung der Probennahmepositionen für Miesmuscheln und Sediment in der Flensburger Förde mit den im Umkreis liegenden Munitionsflächen aus dem Munitionskataster AmuCad



Quelle: eigene Darstellung, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

3.4 Bewertung und Empfehlungen Arbeitspaket 2

3.4.1 Allgemeine ökotoxikologische Bewertung

Aus Laborstudien ist bekannt, dass STV, vor allem TNT und seine Metabolite, akute und chronische negative Effekte auf verschiedene marine Spezies haben. Auf Fische bezogen konnten

der Literatur beispielhaft folgende Daten für akut toxische Auswirkungen entnommen werden: Koske et al. (2019) hat für Zebrafischembryonen für TNT eine LC_{50} von 4,5 mg/L ermittelt sowie 13,4 mg/L für 2-ADNT und 14,4 mg/L für 4-ADNT. Für den Augenfleck-Leierfisch (*Synchiropus ocellatus*) hat Nipper et al. (2001) eine LOEC von 10,8 mg/L TNT, bezogen auf das Überleben der Fischlarven, beschrieben. Juhasz and Naidu (2007) veröffentlichten für den Roten Trommler (*Sciaenops ocellatus*) für TNT eine EC_{50} von 8,2 mg/L und für den Edelstein-Kärpfling (*Cyprinodon variegatus*) eine EC_{50} von 2,3 mg/L TNT bezogen auf die Fischmortalität. Talmage et al. (1999) veröffentlichten für vier Fischarten in ihrem Review LC_{50} -Konzentrationen im Bereich von 0,8 mg/L bis 3,7 mg/L TNT. Die Autoren sind sich in ihren Publikationen unabhängig voneinander einig, dass Fische mit zu den sensibelsten Organismen gegenüber einer Exposition mit STV gehören.

Für eine ökotoxikologische Bewertung müssen jedoch auch die tatsächlichen in der marinen Umwelt gemessenen STV-Konzentrationen der verschiedenen Kompartimente berücksichtigt werden. Die im Arbeitspaket 2 gemessenen Konzentrationen in niedersächsischen Sedimentproben lagen bei maximal 1 ng/kg Sediment. Die ebenfalls aus Niedersachsen untersuchten Plattfische wiesen in der Galle STV Konzentrationen von unter einem Nanogramm je Milliliter auf, im Filet derselben Fische Betrag der STV Gehalt maximal 8 ng/g (Trockengewicht). Lotufo et al. (2010a) haben in einer Laborstudie gezeigt, dass juvenile Elritzen (*Cyprinodon variegatus*) zu mehr als 90 % eine viertägige Exposition mit 7 mg/kg TNT gespickten Sediment überleben. Erst bei einer TNT-Konzentration von 340 mg/kg im Sediment starben innerhalb von 24 Stunden alle Fische, was deutlich oberhalb der in diesem Arbeitspaket gemessenen STV-Konzentrationen in den Sedimentproben liegt. Eine direkte Extrapolation von Laborstudien bei verhältnismäßig hohen STV-Konzentrationen sollte aber nur mit Vorsicht erfolgen, da bisher nur wenig über Langzeiteffekte niedriger Konzentrationen bekannt ist und bisher auch nur die Toxizität von Einzelsubstanzen betrachtet wurde. Negative Effekte auf Flora und Fauna können somit nicht pauschal ausgeschlossen werden. Koske et al. (2019) konnten zum Beispiel zeigen, dass TNT und die Metabolite 2- und 4-ADNT die DNA von Zebrafischembryonen schon bei deutlich niedrigeren Wasserkonzentrationen schädigen. Die Schädigung war bei allen drei Substanzen schon bei der niedrigsten getesteten Konzentration signifikant (0,1 mg/L für TNT und 1 mg/L für jeweils 2- und 4-ADNT). Es ist somit nicht ausschließbar, dass bereits bei noch niedrigeren Konzentrationen DNA-Schäden auftreten können als im Versuch von Koske et al. (2019) eingesetzt wurden. Mariussen et al. (2018) untersuchten die Auswirkungen von TNT auf juvenile Atlantische Lachse (*Salmo salar*). Die Fische wurden 48 Stunden gelöstem TNT mit einer Anfangskonzentration von 1 mg/L ausgesetzt. Am Ende des Expositionsversuch war die Sterblichkeit der Fische im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Bei allen Lachsen, auch jenen die das Experiment überlebt hatten, wurden schwere Blutungen im Rückenmuskulgewebe in der Nähe der Wirbelsäule sowie Auswirkungen auf Blutparameter wie Glukose, Harnstoff, Hämatokrit und Hämoglobin festgestellt. Die Autoren schlussfolgerten, dass alle Fische bei einer Verlängerung des Expositionszeitraums an den schweren Auswirkungen des TNT gestorben wären. STV-Analysen in der Galle von Plattfischen, die am Rande des Munitionsversenkungsgebietes Kolberger Heide gefangen wurden zeigen, dass 2- und 4-ADNT in einem ähnlichen Konzentrationsbereich gemessen wurden wie in diesem Arbeitspaket (Koske et al., 2020). In der Kolberger Heide wurden direkt an einem Brocken Schiesswolle TNT-Konzentrationen mit bis zu 3 mg/L detektiert (Beck et al., 2019). In einer im Labor durchgeführten Studie konnten Lotufo et al. (2010b) zeigen, dass die Hälfte juveniler Elritze (*Cyprinodon variegatus*) eine zehntägige Exposition mit 2,3 und 2,5 mg/L TNT versetztem Wasser nicht überleben. Im Oktober 2021 wurden innerhalb des Munitionsversenkungsgebiets Kolberger Heide mittlere TNT-Konzentration von 7,5 ng/L gemessen, wobei der höchste Wert 51,5 ng/L betrug (Esposito et al., 2023). Interessanterweise konnte an denselben Fischen aus

der Kolberger Heide gezeigt werden, dass trotz der niedrigen STV-Konzentrationen in der Galle die Plattfische einen schlechteren Gesundheitsstatus aufwiesen als jene aus Vergleichsgebieten (Straumer and Lang, 2019). Die Fische wiesen zum Beispiel eine höhere Rate an Leberknoten und -Tumoren auf (Straumer and Lang, 2019). Beck et al. (2022) konnten ebenfalls STV im Spurenbereich in Muskel, Leber, Niere und Galle von Plattfischen nachweisen, die in der Kolberger Heide gefangen wurden. Auch konnten 2- und 4-ADNT in der Galle von Plattfischen detektiert werden, die in der Nähe eines Schiffswracks gefangen wurden, das Munition an Bord geladen hat (Maser et al., 2023b). Im Filet dieser Fische wurden ebenfalls TNT, 2- und 4-ADNT im niedrigen Nanogrammbereich gemessen. Die Auswirkungen der gesundheitlichen Auswirkungen auf diese Fische stehen zurzeit noch aus. Wasserproben, die in der Nähe des Schiffswracks in der belgischen Nordsee genommen wurden, wiesen selbst in ca. 22 Meter Entfernung zum Wrack noch STV-Konzentrationen von bis zu 35 ng/L auf. Ebenso konnten in allen zwölf Sedimentproben, die bis zu ungefähr 20 Meter vom Schiffswrack entfernt genommen wurden, STV in einer Gesamtkonzentration von ca. 20 ng/kg (Maser et al., 2023b) nachgewiesen werden.

Auch Miesmuscheln werden durch STV im Wasser negativ beeinträchtigt. Strehse et al. (2020) und Schuster et al. (2021) konnten beispielsweise zeigen, dass antioxidative Schutzmechanismen der Miesmuscheln durch TNT verstärkt angesprochen werden, was auf oxidativen Stress innerhalb eines Organismus schließen lässt. Langfristig kann dies subletale Effekte zur Folge haben kann. Die hier in den beiden Expositionsstudien eingesetzten STV-Konzentrationen konnten bereits in der marinen Umwelt in einem Munitionsversenkungsgebiet im Wasser, direkt an einem Brocken Schiesswolle, gemessen werden (Beck et al., 2019). Auch Rosen und Lotufo (2007a) konnten bei ähnlichen Wasserkonzentrationen zeigen, dass innerhalb von 48 Stunden nur 24 % und 16 % der Muschelebryonen im Vergleich zur Kontrolle (79 %) überlebten. Die eingesetzten TNT-Konzentrationen betragen jeweils 1 mg/L bzw. 1,5 mg/L. In den in diesem Arbeitspaket untersuchten Muscheln konnten keine STV-Rückstände im Gewebe gemessen werden. Ein Grund dafür könnte eine verhältnismäßig schnelle Ausscheidung der entsprechenden Verbindungen sein (Lotufo et al., 2016). Da aber TNT und dessen Metabolite kanzerogen und mutagen sind, können auch niedrige Gewebekonzentrationen über längere oder kürzere wiederkehrende Zeiträume wie auch Kurzzeitexpositionen, zum Beispiel nach Sprengungen, Krebs in marinen Organismen auslösen, wie es sich bereits bei Fischen anzudeuten scheint.

Muscheln gelten bezogen auf STV als weniger empfindliche Organismen. Diesbezüglich gibt es jedoch kaum publizierte Studien im Vergleich zu jenen für verschiedene Fischarten. Rosen und Lotufo (2007a) ermittelten für TNT folgende LC₅₀- und EC₅₀-Konzentrationen für die Mittelmeer-Miesmuschel (*M. galloprovincialis*): 19,5 mg/L für das adulte Überleben, 6,57 mg/L für Funktionseinschränkungen der Byssusfäden und 0,75 mg/L bezogen auf die embryonale Entwicklung.

Die in diesem Arbeitspaket untersuchten Miesmuscheln und Plattfische unterscheiden sich in den gefundenen STV Konzentrationen. In den Miesmuscheln konnten in keinem der untersuchten Regionen von Nord- und Ostsee STV gefunden werden. Die Plattfische wiesen STV Konzentrationen von maximal ca. 1 ng/ml Galle und maximal 8 ng/g (Trockengewicht) im Filet auf. Die Unterschiede zwischen den Spezies basieren auf mehreren möglichen Gründen. Muscheln und Fische unterscheiden sich im Fett-, Eiweiß- und Wassergehalt. Klieschen bestehen zu ca. 80 % aus Wasser und enthalten ca. 1,6 g je 100 g essbaren Fischanteil (bezogen auf das Filet) sowie ca. 17 g Eiweiß (bezogen auf 100 g Filet)¹⁰. Miesmuscheln enthalten ca. 90 % Wasser

¹⁰ www.fischlexikon.eu

und, je nach Quelle, ca. 2 g Fett und ca. 11 g Eiweiß. Auch wenn diese Unterschiede gering sind, können diese zu unterschiedlichen STV Konzentrationen im Gewebe führen, zumal sich Nahrungsaufnahme, Metabolismus, generelle Speicherfähigkeit von (Schad)-Stoffen sowie Ausscheidungsmechanismen zwischen den Spezies entsprechend unterscheiden. Ein großer Unterschied besteht zudem in der jeweiligen Mobilität der Arten. Muscheln sind sessil und verlassen somit ihren Standort in der Regel nicht. Fische hingegen haben einen erheblich größeren Bewegungsradius, zudem sind Gebiete, in denen sie sich schützend zurückziehen können, von entsprechender Relevanz. Muscheln hingegen benötigen lediglich ein Substrat, an das sie sich anheften können. Wenn eine Muschel somit nicht von Anfang an beispielsweise in einem mit Munition belasteten Gebiet ansässig ist, ist die Wahrscheinlichkeit auch deutlich geringer, dass sie im Laufe ihres Lebens mit größeren Mengen an STV in Kontakt kommt. Fische hingegen können sich, je nach Bewegungsradius, in unterschiedlichen belasteten Gebieten lang- oder kurzfristig aufhalten und somit anderen STV Konzentrationen ausgesetzt sein als Muscheln. Die Unterschiede der STV Konzentrationen in Fischfilet und Fischgalle hängen ebenfalls eng mit der Stoffaufnahme der Fische zusammen. Galle enthält Ausscheidungsprodukte endogenen und exogenen Ursprungs, die im Fisch metabolisiert wurden. Aus diesem Grund lassen sich vor allem TNT Metabolite wie 2- und 4-ADNT in der Galle detektieren und weniger die Ausgangssubstanz TNT. Da hingegen wurde im Verhältnis mehr TNT im Filet gemessen als die Metabolite. Hier spielt die zur Atmung genutzte Wasseraufnahme über die Kiemen eine zentrale Rolle. Das Wasser und darin gelöster Sauerstoff, aber auch entsprechende enthaltene Schadstoffe, gelangen über die Kiemen in das Muskelgewebe, was einen besonders hohen Sauerstoffverbrauch hat. Somit gelangt im Wasser enthaltenes TNT ebenfalls direkt ohne vorherige Metabolisierung in den Muskel. Dies wurde zum Beispiel durch Mariussen et al. (2018) in einem Laborversuch beobachtet.

Das UBA hat eine vorläufige $UQN_{\text{marine water, eco}}$ von 0,2 $\mu\text{g/L}$ errechnet, wobei diese einen langfristiger Standard darstellt, ausgedrückt als jährliche durchschnittliche Konzentration und normalerweise basierend auf Daten zur chronischen Toxizität (Schudoma et al., 2022). Die vorläufige $UQN_{\text{marine water, sed.}}$ wird vom UBA mit 200 $\mu\text{g/kg}$ angegeben (Schudoma et al., 2022). Da bis dato nur in der Kolberger Heide in der Ostsee sowie an einem Schiffswrack in der belgischen Nordsee Umweltkonzentrationen für Wasser und Sediment publiziert wurden, kann eine ökotoxikologische Bewertung unter Hinzuziehung der vorläufigen UQNs nur bedingt erfolgen. Bis auf die direkt an Schießwolle gemessenen Konzentrationen von 3 mg/L in der Ostsee in der Kolberger Heide (Beck et al., 2019) liegen alle bisherigen gemessenen Konzentrationen unterhalb der vorläufigen UQNs.

Das toxische Potential von RDX scheint deutlich geringer zu sein als das von TNT und seinen Metaboliten. Trotzdem konnten in Studien auch für RDX Beeinträchtigungen von Meeresorganismen nachgewiesen werden, beispielsweise auf die Reproduktion von Polychaeten (Lotufo et al., 2017). Die Konzentrationen für akute toxische Wirkungen liegen abhängig vom untersuchten Organismus zwischen 2,4 und mehr als 75 mg/L (zusammengefasst in Beck et al., (2018)). Auch wurden für RDX genotoxische Effekte nachgewiesen (Inouye et al., 2009). Subletale Effekte wurden ab 1,8 mg/L beschrieben (zusammengefasst in Beck et al., (2018)). Für HMX konnten bisher keine toxischen Wirkungen gezeigt werden. Auch scheint es keine genotoxischen Eigenschaften zu haben (Beck et al., 2018).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass EC_{50} - und LC_{50} -Konzentrationen keine Aussagen über chronische Effekte zulassen und auch UQN nur dann zur Bewertung herangezogen werden können, wenn ausreichend Messungen in der Wassersäule vorgenommen wurden. So können selbst beim Vorliegen von niedrigen Wasserkonzentrationen deswegen trotzdem langfristige Schädigungen des Ökosystems nicht ausgeschlossen werden, da es nicht uneingeschränkt

möglich ist von einer im Wasser gemessenen Konzentrationen auf die tatsächliche Schadstoffbelastung in einem Organismus zu extrapolieren. Immerhin ist jedoch bekannt, dass TNT-Konzentrationen in Wasser von 0,8 mg/L bereits für Fische tödlich sein können und 0,75 mg/L die embryonale Entwicklung von Miesmuscheln empfindlich stören. Auch subletale Konzentrationen können langfristig dazu beitragen, dass sich marine Organismen in der embryonalen oder juvenilen Phase nicht ausreichend entwickeln können und unter Umständen das adulte und somit auch reproduktionsfähige Alter nicht erreichen, was unter Umständen langfristig gesehen Auswirkungen auf die jeweiligen Populationen haben kann. Gerade in Munitions-hot-spots könnte dies zu einer Beeinträchtigung der lokalen Ökosysteme führen und sollte in jedem Fall zukünftig streng mit Hilfe einer engmaschigen Monitoringstrategie überwacht werden (siehe 3.4.3). Am empfehlenswertesten wäre es zudem, die entsprechenden Gebiete zeitnah und großflächig der Munitionsaltlasten zu beräumen.

3.4.2 Abschätzung der Umweltgefährdung

3.4.2.1 Mecklenburg-Vorpommern

Da eine genaue Einschätzung der Munitionsvorkommen bisher nicht möglich war, kann aktuell auch nicht abgeschätzt werden, ab wann und in welchen Konzentrationen STV zukünftig in Sediment sowie Flora und Fauna übergehen könnten. Da im Vergleich zur Nordsee die Strömungen im Bereich der Ostsee deutlich schwächer ausgeprägt sind, was in den küstennahen Regionen im Besonderen auch die Tidenströmung betrifft, muss jedoch, je nach individuellen Munitionsvorkommen, zukünftig mit der Bildung von lokalen Hot-Spots gerechnet werden, da der Wasseraustausch und folglich die Verteilung gelöster STV deutlich langsamer vonstattengeht.

3.4.2.2 Niedersachsen

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurden STV bisher nur in Sediment- und Fischproben (Galle und Filet) im Spurenbereich gemessen, jedoch nicht in Muscheln. In Muscheln aus der niedersächsischen Region Eckwarderhörne der Umweltprobenbank des Bundes konnten in den letzten Jahren STV nachgewiesen werden, jedoch lagen diese im nicht-quantifizierbaren Bereich (siehe 2.2.2.1 Tabelle 3). Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass man nicht zwangsläufig davon ausgehen kann, dass die Abwesenheit von STV in Muscheln, wie in diesem Arbeitspaket bisher beobachtet, auch bedeutet, dass STV nicht zu anderen Zeitpunkten in den Muscheln lang oder kurzfristig auffindbar sind. Denn die in denselben Probennahmegebieten entnommenen Sedimentproben weisen, wenn aktuell auch nur im Spurenbereich, auf eine STV-Kontamination im Umfeld der Miesmuscheln hin.

Die in den Plattfischen gemessenen STV Konzentrationen (TNT, 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT, 1,3-DNB) liegen im niedrigen, größtenteils einstelligen Nanogramm je Milliliter-Bereich (Galle) bzw. je Gramm Filet. Wie unter 3.4.1 dargestellt, gehören Fische mit zu den sensibelsten Organismen gegenüber STV Expositionen. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gemessenen Konzentrationen in den Fischen auch in diesen Bereichen bereits negative Auswirkungen haben. Untersuchungen von Koske et al. (2020) und Straumer und Lang (2019) an Plattfischen, die in der Nähe des Munitionsversenkungsgebiet Kolberger Heide gefangen wurden, wiesen entsprechend höhere Raten an Leberknoten und -Tumoren auf, als Fische aus einem Referenzgebiet.

Eine Abschätzung der Umweltgefährdung gestaltet sich zum jetzigen Zeitpunkt zudem schwierig, da die Ableitungen von akuten und chronischen toxischen Effekten auf Meeresorganismen aus Laborstudien stammen, in denen zum Teil mit deutlich höheren STV-

Konzentrationen in Wasser und/oder Sediment gearbeitet wurde als jene, die in diesem Arbeitspaket in Sediment, Fischen und Muscheln gemessen wurden.

Es ist jedoch als wahrscheinlich anzusehen, dass auch die Munitionskörper im Bereich der Niedersächsischen Nordsee in Zukunft weiter rosten werden und es somit zu einer verstärkten Freisetzung von STV in die Meeresumwelt kommen kann. Dies zeigen bereits durchgeführte Untersuchungen, zum Beispiel im Munitionsversenkungsgebiet Kolberger Heide in der Nähe von Kiel (Appel et al., 2018) oder auch die Ergebnisse aus Arbeitspaket 1. Das Fortschreiten der Korrosion könnte sogar in Zukunft noch durch den Klimawandel und der daraus resultierenden Erwärmung der Meere schneller als bisher voranschreiten (Scharsack et al., 2021). Gezielte Sprengungen von Munitionskörpern im Wasser oder auf Sandbänken könnten in den entsprechenden Gebieten zusätzlich zu einer kurzzeitigen Erhöhung von STV in der Wassersäule führen. Falls größere Bruchstücke der Sprengstoffe bei einer Detonation nicht umgesetzt werden sollten, könnten diese auch über eine längere Zeit auf dem Meeresgrund oder einer Sandbank verbleiben und somit ebenfalls zu einer erhöhten Aufnahme von STV in Sediment und Biota führen (Maser and Strehse, 2020; Strehse et al., 2017).

3.4.2.3 Schleswig-Holstein

Eine Abschätzung der Umweltgefährdung aufgrund der in diesem Projekt erhaltenen Ergebnisse ist für Schleswig-Holstein nicht möglich, da lediglich wenige Proben ausschließlich aus der Flensburger Förde zur Verfügung standen. Auch kann die Hälterung von Miesmuscheln für die STV-Analytik ungünstig sein und zu falsch negativen Ergebnissen führen. Die Ergebnisse aus UDEMM (2019) und weiteren Forschungsprojekten zeigen jedoch eine Gefährdung der marinen Ökosphäre durch erhöhte STV-Konzentrationen in Hot-Spot Gebieten (Kapitel 3.3.2) sowie eine ubiquitäre Belastung der Ostsee mit Spuren von STV auch außerhalb munitionsbelasteter Gebiete (Esposito et al., 2023).

Durch das Voranschreiten der Korrosion der Munitionshüllen kann somit langfristig nicht ausgeschlossen werden, dass die STV-Konzentrationen sowohl in den Hot-Spot Gebieten mit hohem Munitionsvorkommen, wie auch in der gesamten schleswig-holsteinischen Ostsee und möglicherweise auch der schleswig-holsteinischen Nordsee im Wasser weiter steigen und somit auch negative Auswirkungen auf die marine Flora und Fauna zunehmen werden. Zudem darf in der Beurteilung der Umweltgefährdung durch STV auch nicht außer Acht gelassen werden, dass STV nicht die einzige Schadstoffquelle darstellen. Im Zusammenspiel mit anderen Schadstoffen wie beispielsweise Arzneistoffrückständen und Pflanzenschutzmitteln könnten auch vermeintlich niedrige STV-Konzentrationen, die unterhalb der Wirkschwelle einer Einzelsubstanz liegen, durch den so genannten „Cocktail-Effekt“ additiv trotzdem einzelne oder Gruppen von marinen Spezies gefährden.

3.4.3 Monitoringempfehlungen für STV

Die Ergebnisse der Arbeitspakete 1 und 2 zeigen, dass STV aus im Meer liegender Altmunition austreten und sich in der Meeresumwelt in Sediment, Miesmuscheln und Plattfischen detektieren lassen. Die Gründe für den Übertritt sprengstofftypischer Verbindungen in die Meeresumwelt sind vor allem das Voranschreiten der Korrosion der Metallhüllen der unterschiedlichen Munitionstypen. Sprengungen Unterwasser aber auch auf Sandbänken können zudem zu kurzfristigen erhöhten Einträgen von STV in die marine Ökosphäre führen. Um eine langfristige Überwachung einer möglichen Zunahme von STV in der Meeresumwelt zu gewährleisten, sowie kurzfristige erhöhte Einträge durch Sprengungen oder mögliche Einträge durch Bergungsmaßnahmen zu erkennen, sind entsprechende Monitoringstrategien zwingend erforderlich.

3.4.3.1 Allgemeines räumliches Monitoring

Die 2008 in Kraft getretene Europäische Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie (MSRL 2008/56/EG) fordert alle Mitgliedsstaaten auf, einen guten Zustand der Meeresumwelt anzustreben und zu erhalten sowie künftige Verschlechterung zu vermeiden. Regelmäßige Probennahmen im Rahmen von (Routine-) Monitoringprogrammen für verschiedene Arten von Schadstoffen sind somit bereits in den Überwachungsstrategien der Länder fest etabliert. Hier würde es sich anbieten die im Rahmen des Routinemonitoring gesammelten Proben auch auf STV entsprechend mit zu analysieren. Als Leitsubstanz wäre TNT zu empfehlen, da es mengenmäßig den größten Anteil als sekundärer Sprengstoff in konventioneller Munition ausmacht. Zudem konnte TNT bereits in den deutschen Anteilen der Ostsee nachgewiesen werden (Esposito et al., 2023). Für das Routinemonitoring würden sich Wasserproben anbieten, da sie verhältnismäßig einfach zu sammeln, aufzuarbeiten und zu analysieren sind. Ein mögliches Vorgehen ist zum Beispiel in Bünning et. (2021) und dem „Practical Guide for Environmental Monitoring of Conventional Munitions in the Seas“ des UDEMM Projekts (UDEMM, 2019) beschrieben worden. Hier eignen sich sowohl GC- wie auch LC-MS/MS zur Analysierung. Da aufgrund des kanzerogenen und mutagenen Potential von TNT und seinen Metaboliten bisher keine allgemeinen Grenzwerte zur Humantoxizität sowie bisher nur vorläufige UQN erarbeitet wurden, sollten die gewählten Methoden der Probenaufarbeitung und -Analysierung Messgenauigkeiten im Spurenbereich ermöglichen. Technisch möglich sind bis dato Quantifizierungen für TNT im zweistelligen Pikogramm je Liter bzw. Femtogramm je Milliliter Bereich (Bünning et al., 2021). Die Aufarbeitung und Analysierung der aus dem Monitoring erhaltenen Proben kann von entsprechend technisch ausgestatteten Laboratorien nach Etablierung der benötigten Methoden durchgeführt werden.

Um einen möglichen Übertritt von STV in die marine Ökosphäre zu überwachen würde es sich zudem anbieten neben Wasser auch Biotaprobe zu analysieren. Vor allem Plattfische und Miesmuscheln haben sich als gut geeignet erwiesen, wie die Ergebnisse in Kapitel 2 und 3 belegen. Auch hier können die im Rahmen des Routinemonitorings gesammelten Organismen entsprechend auf STV hin analysiert werden. Aufgrund metabolischer Prozesse in den Organismen sollten neben TNT auch die beiden Hauptmetabolite 2- und 4-ADNT analysiert werden. Anforderungen an die Analytik sowie Aufarbeitungsmethoden können beispielsweise Kapitel 2, 3 und 4 entnommen werden.

Neben dem allgemeinen räumlichen Monitoring bietet es sich zudem an auch Hot Spots, zum Beispiel Munitionsversenkungsgebiete sowie bekannte belastete Gebiete, in regelmäßigen Abständen zu überwachen. Dies dient der Früherkennung eines möglicherweise verstärkten Austretens von STV aus rostenden Munitionskörpern. Umfang und zeitlicher Abstand eines Monitorings sollten je nach Menge der vor Ort befindlichen Munition sowie ihres äußeren Zustands entsprechend vorgenommen werden. Auch hier bieten sich Wasserproben und das Analysieren von Biota an. Da das Fischen in vielen Versenkungsgebieten oder auch in der Nähe von Schiffswracks nicht immer möglich ist und das Vorkommen von vor Ort lebender Biota sehr variabel sein kann, bietet sich hier ein aktives Monitoring mit Miesmuscheln an. Muscheln haben sich seit Jahrzehnten in vielen Monitoringstudien und -Programmen als sehr gut geeigneter Bioindikator erwiesen (Strehse and Maser, 2020). Zudem sind sie ebenfalls sehr gut für den Nachweis von STV geeignet (Appel et al., 2018; Strehse et al., 2023, 2017). Detaillierte Monitoringstrategien sind zum Beispiel im „Practical Guide for Environmental Monitoring of Conventional Munitions in the Seas“ des UDEMM Projekts (UDEMM, 2019) beschrieben worden. Neben einem aktiven Biomonitoring bietet sich auch der Einsatz von Passivsammlern an (Maser et al., 2023b; Rosen et al., 2022).

3.4.3.2 Bergungsbegleitendes Monitoring

Hier muss zwischen zwei verschiedenen Szenarien unterschieden werden: Zum einen der Sprengung von Munition im Meer direkt im Wasser oder auf Sandbänken und zum anderen das großflächige Beräumen mit Hilfe von Bergungstechniken.

Bei Sprengungen (High und Low Order), unabhängig ob diese direkt im Wassere oder auf Sandbänken erfolgen, sollten vor der Sprengung in jedem Fall Sedimentproben genommen werden. Hier bietet es sich an Probenstranssekte in jeder Himmelsrichtung zu nehmen. Die Abstände sollten unter Berücksichtigung der Beladungsstärke des Munitionsobjekts genommen werden, zum Beispiel 0 Meter, 0,5 Meter, 1 Meter, etc. Eventuell sind Entfernungen von bis zu 20 Meter oder mehr zum Munitionsobjekt sinnvoll. Sollte eine Sprengung Unterwasser erfolgen, empfiehlt sich zudem das Nehmen von Wasserproben. Diese sollten ebenfalls in allen vier Himmelsrichtungen am Objekt erfolgen und ggf. einen Abstand von mehreren Metern haben. Hier ist vor allem Strömungsrichtung und -stärke mit ausschlaggebend. Auch können bei Unterwassersprengungen vor und nach der Sprengung Miesmuscheln und Passivsammler ausgebracht werden. Ein detailliertes Vorgehen für mögliche Begleituntersuchungen von Sprengungen können Maser et al. (2023a) entnommen werden.

Um die Umweltverträglichkeit von Bergungsmaßnahmen zu begleiten bieten sich zwei Monitoringstrategien an: Zum einen sollte ein mögliches Austreten von STV in die marine Ökosphäre mit Hilfe eines aktiven Biomonitorings mit Miesmuscheln überwacht werden. Das ist zu empfehlen, da Wasserproben alleine immer nur eine Momentaufnahme darstellen und Miesmuscheln jedoch als Langzeitindikator dienen können. Empfehlenswert ist zudem eine Ergänzung durch Passivsammler. Muscheln und Passivsammler sollten unabhängig von den tatsächlichen Räumaktivitäten immer über einen konstanten Zeitraum von mehreren Wochen bis zu maximal drei Monaten im entsprechenden Gebiet immer an den gleichen Positionen exponiert werden. Der Umfang des Monitorings richtet sich nach der Größe des Gebiets sowie dem Umfang der durchgeführten Räummaßnahmen. Während der Durchführung der Räummaßnahmen, sowie direkt davor, sollten zum Beispiel in der Nähe der zu beräumenden Objekte oder der Räuminstrumente Wasserproben genommen werden und Passivsammler ausgebracht werden. Diese Methoden geben einen schnellen und direkten Aufschluss darüber, ob und in welchem Umfang STV durch die Räumaktivitäten freigesetzt werden. Weitere Details zu den hier beschriebenen Methoden können zum Beispiel folgenden Publikationen entnommen werden: Maser et al. (2023a), Maser at. (2023b), Raupers et al. (2023) sowie dem „Practical Guide for Environmental Monitoring of Conventional Munitions in the Seas“ des UDEMM Projekts (UDEMM, 2019). Anforderungen an die Analytik sind in Bünning et al. (2021) beschrieben.

4 Arbeitspaket 3 – Untersuchungen zur möglichen Anreicherung von STV im marinen Nahrungsnetz

4.1 Planungen und Durchführungen der Probennahmen

Die Probenbereitstellungen für die Untersuchungen zur möglichen Anreicherung der STV im marinen Nahrungsnetz wurden durch das UBA initiiert. Dazu wurden Gespräche mit dem Institut Dr. Nowak GmbH & Co. KG in Ottersberg sowie der Tierärztlichen Hochschule Hannover geführt. Dies führte zur Bereitstellung von Flundern sowie verschiedener Gewebeproben von Eiderenten, Seehunden und Schweinswalen. Des Weiteren hatte die Umweltprobenbank angeboten, frisch gesammelte Gallenblasen von Aalmuttern zur Verfügung zu stellen.

4.1.1 Plattfische

Die Gruppe der Plattfische kommt in allen Weltmeeren vor und zeichnet sich durch eine benthische Lebensweise aus. Sie ernähren sich von am Meeresboden lebenden wirbellosen Tieren und sind vergleichsweise ortstreu. Zu ihnen zählen wichtige Speisefische wie Scholle, Kliesche und Flunder.

Planung

Direkt im ersten Quartal des Jahres 2020 wurden mit dem Institut Dr. Nowak GmbH & Co. KG in Ottersberg erfolgreiche Gespräche zur Bereitstellung von Flundern durchgeführt. Aus der im Juli 2019 erfolgten Probennahme im Rahmen des Routine-Monitorings im Auftrag des NLWKN, wurden Flundern zur Verfügung gestellt. Diese wurden nach der Probennahme im Ganzen eingefroren und vom NLWKN nicht weiter benötigt. Die Fische wurden in den Fanggebieten Baltrum, Borkum und Außenweser gefangen (Abbildung 10). Eingeteilt wurden die Fische in zwei Fangklassen: < 24 cm und > 24 cm.

Durchführung

Im Juni 2020 wurden zusammen mit Mitarbeitenden des Instituts Dr. Nowak in Ottersberg die Flundern aufgearbeitet. Nach Dokumentation von Größe und Gewicht wurden die Fische geöffnet und das Geschlecht bestimmt. Die männlichen Fische wurden nach der Geschlechtsbestimmung im Ganzen, die weiblichen nach Entnahme von Muskelfleisch, Kopf und Leber, zur Probennahme zwei Mitarbeitenden des Instituts für Toxikologie übergeben. Aus den weiblichen Fischen wurden Muskelfleisch, Niere, Milz und, soweit vorhanden, Galle entnommen, aus den männlichen darüber hinaus Leber und Kiemen. Die Proben wurden innerhalb von 60 Minuten nach der Entnahme eingefroren und ins UKSH verbracht und bis zur weiteren Verarbeitung eingelagert. Insgesamt wurden innerhalb von drei Tagen von 100 Fischen über 500 Einzelproben entnommen. Weitere 34 Fische wurden tiefgefroren im Ganzen überlassen. Die Begleitdaten der Fische, sowie die Informationen zu den Fanggebieten wurden vom Institut Dr. Nowak und dem NLWKN dem Institut für Toxikologie zur Verfügung gestellt.

4.1.2 Eiderenten

Eiderenten (Abb. 2) gehören zu den Entenvögeln und leben in Europa vor allem in Skandinavien. Eiderenten sind für das Projekt insofern interessant, da sie sich von nicht pflanzlicher Nahrung ernähren. Zu ihrer Nahrung gehören hauptsächlich bis zu 40 Millimeter große Muscheln wie Miesmuscheln und Dreikantmuscheln (binnenlandig), die sie im Ganzen fressen, wie auch Fische, Schnecken und Krebstiere. Nur während der Brutzeit ernähren sich Weibchen auch vegetabil. Miesmuscheln werden von den Enten auf dem Wattboden gesucht und ausgegraben oder im Wasser ertaucht. Durch ihren kräftigen Schnabel sind die Enten in der Lage

Miesmuscheln von ihrem Standort abzureißen. In der Regel tauchen sie nach Muscheln in bis zu sechs Metern Tiefe, sind aber auch in der Lage, deutlich größere Tiefen zu ertauchen (Svensson et al., 2023). Die Muscheln werden mit den Schalen gefressen und im starken Kaumagen der Eiderente geknackt. Somit sind Eiderenten ein wichtiger mariner Predator und bilden einen Teil des marinen Nahrungsnetzes ab, zudem bereits nachgewiesen werden konnte, dass Miesmuscheln STV in ihrem Gewebe bei entsprechender Exposition enthalten können (Appel et al., 2018; Strehse et al., 2017). Eiderenten sind verhältnismäßig standorttreue Tiere. Einige überwintern sogar in ihren Brutrevieren, der überwiegende Teil nutzt allerdings separate Mauser- und Überwinterungsquartiere, wobei jedoch vorwiegend nur kurze Strecken zurückgelegt werden. Eiderenten dienen nur wenigen Tieren als Nahrung (Svensson et al., 2023).

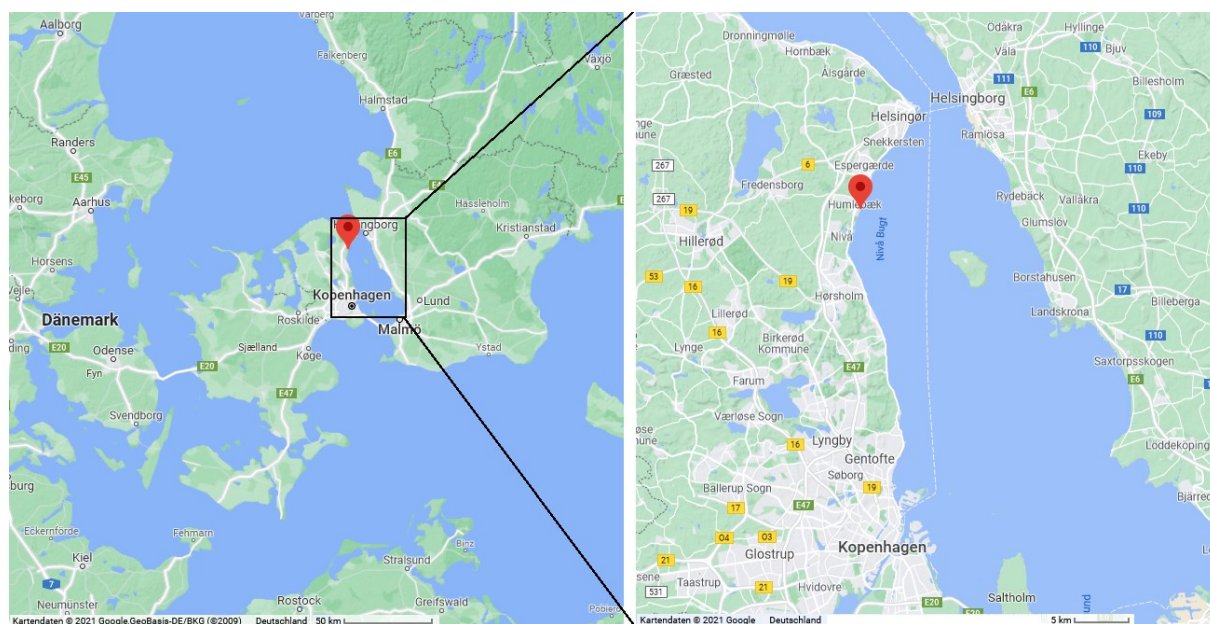
Planung

Am 2. September 2020 fand eine Webkonferenz mit der Tierärztlichen Hochschule Hannover und dem Institut für Toxikologie statt, um erste Details der Probennahme und Übergabe von Eiderenten zu besprechen. Die Gespräche wurden am 29. September bei einem Besuch des ITAW in Büsum fortgesetzt. Im März 2021 wurde zwischen dem UKSH und der Tierärztlichen Hochschule Hannover ein Vertrag zur Bereitstellung von Gewebeproben von Eiderenten aus Dänemark für chemische Rückstandsanalysen geschlossen. Der Vertrag beinhaltete die Obduktion, Histologie, Probenentnahme und Versand von zweimal 25 Eiderenten. Neben Gewebeproben von Eiderenten aus dänischem Beifang (Ostsee) sollten auch frische Beifänge aus Deutschland untersucht werden.

Durchführung

Die Tierärztlichen Hochschule Hannover hat im September 2021 dem Institut für Toxikologie Probenmaterial von 25 Eiderenten (*Somateria mollissima*) aus dänischem Beifang übergeben. Die Enten stammten aus den Jahren 2017 bis 2019 und wurden von Fischern aus der Region Sletten Havn zur Verfügung gestellt (Abbildung 20). Die Enten wurden in der Regel 24 bis 72 Stunden nach dem Auffinden unterhalb von 0 °C gelagert und anschließend bei -20 °C tiefgefroren. Da es sich um Beifang handelt, konnte der genaue Todeszeitpunkt der Enten jedoch nicht bestimmt werden. Auch konnte nicht nachverfolgt werden, in welchem Gebietsabschnitt sich die Enten zum Todeszeitpunkt und davor exakt aufgehalten haben. Da die Enten Beifang aus Stellnetzfischerei waren, ist jedoch anzunehmen, dass sich die Enten längerfristig im Øresund aufgehalten hatten.

Abbildung 20: Fangregion der dänischen Eiderenten (2017 – 2019)



Der Hafen Sletten Havn befindet sich unterhalb der roten Markierung.

Quelle: www.google.de/maps abgerufen am 20.10.2021

Die Tiere wurden zum ITAW nach Büsum transportiert und dort bei -20 °C gelagert. Für die Sektion wurden die jeweiligen Eiderenten ca. 48 Stunden vor Sektionsdatum bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach der Aufnahme der Grunddaten und Vermessung der Tiere sowie der pathologischen Beurteilung aller Organe (Tab. 8) wurden die Gewebeproben in Plastiktüten verpackt und erneut bei -20 °C eingefroren. Folgende Gewebe bzw. Flüssigkeiten wurden für die toxikologische Untersuchung auf STV entnommen: Aus allen Individuen wurden Proben von Leber, Niere, Gehirn und Muskel entnommen. Bei sechs Enten konnte zudem Gallenflüssigkeit entnommen werden.

Tabelle 8: Basisdaten der zur Verfügung gestellten Eiderenten

Individuum	Funddatum	Geschlecht	Alter	Ernährungszustand
1	24.01.2017	männlich	juvenil	moderat
2	24.01.2017	weiblich	subadult	moderat
3	05.04.2017	männlich	unreif	moderat
4	05.04.2017	weiblich	adult	gut
5	05.04.2017	männlich	subadult	moderat
6	05.04.2017	männlich	adult	gut
7	03.11.2017	weiblich	juvenil	schlecht
8	10.01.2018	männlich	adult	schlecht
9	19.01.2018	männlich	adult	schlecht
10	19.01.2018	weiblich	adult	schlecht

Individuum	Funddatum	Geschlecht	Alter	Ernährungszustand
11	19.01.2018	weiblich	adult	gut
12	19.01.2018	männlich	subadult	moderat
13	19.01.2018	weiblich	adult	gut
14	23.03.2018	weiblich	subadult	gut
15	06.09.2018	männlich	juvenil	gut
16	27.11.2018	männlich	adult	gut
17	07.12.2018	männlich	adult	sehr schlecht
18	07.12.2018	männlich	juvenil	schlecht
19	18.01.2019	männlich	adult	moderat
20	06.02.2019	männlich	adult	moderat
21	13.02.2019	männlich	adult	moderat
22	27.02.2019	männlich	adult	moderat
23	27.02.2019	weiblich	adult	gut
24	28.02.2019	weiblich	adult	gut
25	nicht bekannt	weiblich	adult	gut

Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, UKSH. Angepasst nach Schick et al. (2022).

4.1.3 Aalmuttern (Galle)

Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) (Abb. 2) sind auch für das Arbeitspaket 3 interessant, da sie für küstennahe marine Ökosysteme sowohl ein guter Akkumulations- wie auch Wirkungsindikator darstellen. Sie sind verhältnismäßig standorttreu und weit verbreitet. Die Aalmutter kann bis zu 10 Jahre alt werden. Auch in Hinblick auf die Abbildung der marinen Nahrungskette spielen sie eine wichtige Rolle, da sie sich hauptsächlich von wirbellosen Bodentieren ernähren, unter anderem auch von Miesmuscheln. Die Aalmutter dient auf der anderen Seite größeren Fischen, Seevögeln, Tümmelern und Robben als Nahrung.

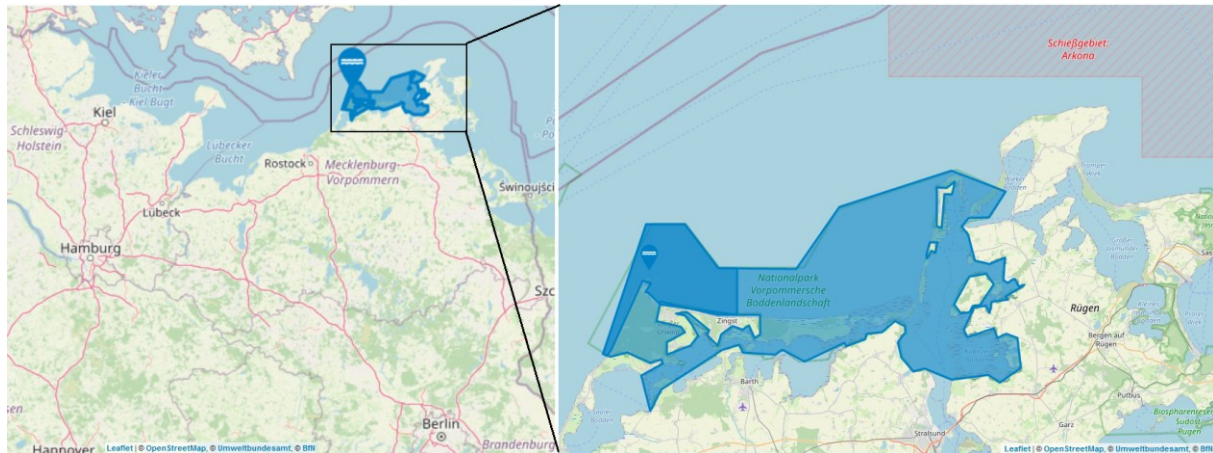
Planung

Ergänzend zu den Aalmutterproben der Umweltprobenbank des Bundes, die bereits für Arbeitspaket 1 zur Verfügung gestellt und analysiert wurden (siehe Kapitel 2.2.2.2), bestand das Angebot frische Aalmutter-Gallenblasen von der Sammlung im Sommer 2021 zu erhalten.

Durchführung

Ende Juni 2021 erfolgte die Sammlung von Aalmuttern in der Ostseeregion Darßer Ort (Abbildung 21). Von 49 Aalmuttern wurden die Gallenblasen im Ganzen entnommen, einzeln verpackt und in Flüssigstickstoff gelagert. Der Versand erfolgte auf Trockeneis. Die weitere Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Abbildung 21: Probennahmegebiet „NP Vorpommersche Boddenlandschaft“ für Aalmuttern der UPB. Neben dem Probennahmegebiet sind auch Teile des nahegelegenen Schießgebiet „Arkona“ dargestellt



In blau dargestelltes Gebiet markiert das Probennahmegebiet „NP Vorpommersche Boddenlandschaft“.

Quelle: www.umweltprobenbank.de abgerufen am 21.10.2021

4.1.4 Seehunde und Schweinswale

Die zu der Familie der kleinen Zahnwale gehörenden Schweinswale (Abb. 2) leben vorwiegend in Küstennähe und sind in allen Ozeanen zu finden. Auch in der Elbe werden seit 2013 immer wieder Schweinswale gesichtet. In Deutschland ist der Schweinswal die einzige Walart und ist vom Aussterben bedroht. Die Lebenserwartung der Schweinswale soll bis zu 22 Jahre betragen, jedoch wird meistens nur ein Alter von 12 bis 15 Jahren erreicht. können Sie ernähren sich vorwiegend von Fisch, aber auch von Krebstieren und Kopffüßern. In Bezug auf Munition im Meer sterben zudem immer wieder Schweinswale an den Folgen von Unterwassersprengungen, da die Schall- und Druckwellen massive Schäden auf das sensible Gehör der Tiere verursachen (Siebert et al., 2022).

Der Seehund (Abb. 2) ist eine in allen nördlich-gemäßigten Meeren vorkommende Robbenart. Je nach Geschlecht werden diese ca. 20 bis 35 Jahre alt, wobei Weibchen in der Regel ein höheres Lebensalter erreichen als Männchen. Jüngere Seehunde ernähren sich von Weich- und Krebstieren, während ausgewachsene Tiere ausschließlich Fisch verzehren wie zum Beispiel Plattfische.

Schweinswale und Seehunde zählen in Bezug auf das marine Nahrungsnetz zu den Spitzenprädatoren. Chemische Einflüsse in den Meeren könnten sich vorwiegend auf die Endglieder der Nahrungskette auswirken, wozu auch Fische, Vögel, Wale und Robben zählen. So wird zum Beispiel vermutet, dass die Summe von verschiedenen toxischen anthropogenen Stoffen in Nord- und Ostsee einen Einfluss auf den Rückgang des Populationsbestandes der Schweinswale hat (Schulze, 1996). Auch bei Seehunden ist bekannt, dass diese durch Umweltschadstoffe massiv geschädigt werden können, was sich beispielsweise in verminderter Immunabwehr oder Unfruchtbarkeit äußert (Siebert et al., 2012).

Planung

Das für die Untersuchungen in diesem Arbeitspaket benötigte Probenmaterial wurde von der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Dieses stammt aus Totfunden des Strandungsnetzes von Schleswig-Holstein¹¹. Es wurde sich gemeinsam darauf verständigt, dass

¹¹ <https://www.seehundstation-friedrichskoog.de/strandungsnetzwerk/>

die Untersuchungen ein möglichst großes Spektrum der beiden Tierspezies bezogen auf die Fundorte, Alter und Geschlecht abdecken sollen.

Durchführung

Im Juni 2022 wurden 74 Einzelproben durch die Tierärztliche Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Die Seehunde und Schweinswale wurden auf den Inseln Sylt und Fehmarn sowie in der Flensburger Förde und der Kieler- und Lübecker Bucht gefunden. Die Einzelheiten zu den Probenarten, Fundort, Geschlecht, Alter, Funddatum und Erhaltungszustand der Tiere können den Tabellen 9 (Seehunde) und Tabelle 10 (Schweinswale) entnommen werden.

Tabelle 9: Übersicht der erhaltenen Proben aus Seehunden (*Phoca vitulina*) und zugehörnde Begleitdaten

Tier Nr.	Organe	Fundort/ Datum	Geschlecht	Alter	Erhaltungszustand
1	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur	Eckernförder Bucht, Noer (Ostsee) Februar 2021	weiblich	vorjährig	gut erhalten
2	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Eckernförder Bucht, Aschau (Ostsee) Januar 2021	männlich	mehrfährig	sehr frisch
3	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Lübecker Bucht, Travemünde (Ostsee) September 2020	weiblich	mehrfährig	gut erhalten
4	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur	Lübecker Bucht, Scharbeutz (Ostsee) Mai 2017	weiblich	vorjährig	frisch
5	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur	Lübecker Bucht, Travemünde (Ostsee) März 2011	weiblich	vorjährig	gut erhalten
6	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Sylt, Westerland (Nordsee) Juni 2020	weiblich	mehrfährig	gut erhalten
7	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Sylt, Kampen (Nordsee) Juli 2020	männlich	mehrfährig	sehr frisch
8	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Sylt, Kampen (Nordsee) Mai 2020	männlich	mehrfährig	frisch
9	Nieren Leber und Gallenwege	Sylt, List, Ost (Nordsee)	weiblich	mehrfährig	gut erhalten

Tier Nr.	Organe	Fundort/ Datum	Geschlecht	Alter	Erhaltungszustand
	Skelettmuskulatur Urin	März 2020			
10	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Sylt, Hörnum West (Nordsee) März 2019	männlich	mehrfährig	frisch

Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, UKSH

Tabelle 10: Übersicht der erhaltenen Proben aus Schweinswalen (*Phocoena phocoena*) und zugehörige Begleitdaten

Tier Nr.	Organe	Fundort/ Datum	Geschlecht	Alter	Erhaltungszustand
1	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur	Sylt, Kampen (Nordsee) März 2021	weiblich	adult	frisch
2	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Sylt, Hindenburgdamm (Nordsee) Februar 2020	männlich	juvenil	sehr frisch
3	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur	Sylt, Westerland (Nordsee) Dezember 2019	männlich	adult	frisch
4	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Sylt, Archsum (Nordsee) Dezember 2019	männlich	adult	sehr frisch
5	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Sylt, Westerland (Nordsee) Oktober 2017	männlich	adult	frisch
6	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Flensburger Förde (Ostsee) Juli 2021	weiblich	adult	sehr frisch
7	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur	Kieler Bucht, Heidkate (Ostsee) Juni 2021	weiblich	adult	sehr frisch
8	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Lübecker Bucht, Timmendorfer Strand (Ostsee) November 2018	männlich	adult	sehr frisch

Tier Nr.	Organe	Fundort/ Datum	Geschlecht	Alter	Erhaltungszustand
9	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Fehmarn, Staberhuk (Ostsee) Februar 2018	männlich	adult	frisch
10	Nieren Leber und Gallenwege Skelettmuskulatur Urin	Flensburger Förde (Ostsee) November 2017	männlich	adult	sehr frisch

Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, UKSH

4.2 Analytische Methoden

Im Folgenden werden die Aufarbeitungen der verschiedenen Spezies (Flundern, Aalmuttern, Eiderenten, Schweinswale, Robben) erläutert. Dazu gehört im Wesentlichen die Beschreibung der Präparationsschritte der einzelnen zu untersuchenden Organe. Die Aufarbeitung umfasst die Isolierung der jeweiligen Organe, Zerkleinerung und ggf. Trocknung des Gewebematerials, sowie die Extraktion möglicher STV aus dem Probenmaterial und sonstige Vorbereitungsschritte vor der analytischen Messung und Auswertung mittels GC-MS/MS und LC-MS/MS. Die Etablierung geeigneter Aufarbeitungsmethoden sowie die Ermittlung der optimalen Messparameter für die GC-MS/MS sowie LC-MS/MS sind ein wesentlicher Bestandteil dieses Arbeitspaketes.

4.2.1 Aufarbeitung der Proben

Aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der zu untersuchenden Spezies, sind individuelle Aufarbeitungsmethoden nötig. Zudem ist die Extraktion von STV sehr von den Eigenschaften der einzelnen Gewebe abhängig. Dazu zählen die Gewebestruktur wie Binde- oder Muskelgewebe, der Fettgehalt oder ob es sich um Körperflüssigkeiten wie Galle handelt. Dies hat einen erheblichen Einfluss darauf, wie stark mögliche STV in den Zellen der jeweiligen Gewebe gebunden sind und wie gut sich diese aus ihnen extrahieren lassen.

4.2.1.1 Plattfische

Die Gewebeproben der Plattfische wurden durch Mitarbeiter des Instituts für Toxikologie am Limnologischen Institut Dr. Nowak aus Fischen, die im Rahmen des Routinemonitorings des NLWKN gefangen wurden, entnommen. Alle Flundern wurden durch Mitarbeiter des Instituts Dr. Nowak aufgetaut, vermessen und gewogen. Anschließend wurde auf der Blindseite der Fische die Haut oberhalb der Leber entfernt. Über einen Schnitt Richtung Schwanzflosse wurde das Geschlecht der Fische bestimmt (Abbildung 22). Zehn weiblichen Individuen aus jedem Fanggebiet und jeder Größenklasse wurden für das „Routinemonitoring auf Schadstoffe in Biota“ Kopf, Leber sowie ein Filet entnommen und anschließend dem Institut für Toxikologie zur weiteren Verwendung übergeben (Abbildung 23). Alle männlichen Fische, sowie die überzähligen weiblichen Individuen, wurden nach der Geschlechts-, Größen und Gewichtsdocumentation mit allen Geweben der Präparation durch Mitarbeitende des Instituts für Toxikologie ebenfalls zur Verfügung gestellt.

Abbildung 22: Männliche Flunder. Das Gewebe über der Leber wurde bereits entfernt, der Schnitt Richtung Schwanzflosse dient der Geschlechtsbestimmung



Quelle: Tobias Bünning, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler

Abbildung 23: Weibliche Flunder. Kopf, Leber und ein Filet wurden durch das Institut Dr. Nowak für das Monitoring des NLWKN entnommen, der Rest dem Institut für Toxikologie zur eigenen Probennahme übergeben



Quelle: Tobias Bünning, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler

Galle

Bei allen Individuen mit optisch erkennbarer gefüllter Gallenblase wurde diese vorsichtig mit einer Kanüle punktiert, die Gallenflüssigkeit mit einer Glasspritze entnommen, in 1,5 mL große Mikroreaktionsgefäße gegeben, gewogen und bei -20 °C eingefroren. Die Menge der gewonnenen Galle schwankte jedoch erheblich. Während bei den 35 untersuchten, im Fanggebiet Außenweser gefangenen Fischen, lediglich 7 Individuen keine sichtbare Gallenblase aufwiesen, hatte der überwiegende Teil der Fische eine sichtbare Gallenblase, die mehr als 100 mg Gallenflüssigkeit enthielt (Spitzenwert 720 mg Gallengewicht). Aus den 17 Fischen der Klasse 1 (< 24 cm) im Fanggebiet Baltrum konnten nur insgesamt 250 mg Galle aus 13 Fischen gewonnen werden; aus den 11 Fischen der Klasse 2 (> 24 cm) enthielten sogar nur zwei Fische eine Galle. Im Fanggebiet Borkum wurde bei 17 Fischen der Klasse 1 nur drei Mal mehr als 100 mg, und drei Mal >50 mg Galle gewonnen. Alle anderen Individuen enthielten keine sichtbare Gallenblase. Bei den Individuen der Klasse 2 konnte jedoch bei 13 von 17 Fischen Gallenflüssigkeit gewonnen werden, bei 7 sogar mehr als 100 mg.

Zur Aufarbeitung der Galle wurde die Methode von Ek et al. (2006) adaptiert. Dazu wurden 25 µL Gallenflüssigkeit in ein 1,5 mL großes Mikroreaktionsgefäß pipettiert und mit 900 Einheiten (U) β-Glucuronidase (*Helix pomatia*) in 100 µL wässrigen Acetatpuffer (pH zwischen 4,5 und 5; vor jedem Einsatz erneut geprüft) versetzt. Die Behandlung mit β-Glucuronidase ist ein übliches Verfahren zur Gesamtbilanzierung von Stoffen, die über die Leber ausgeschieden werden. In den meisten Spezies werden im Phase-II- Metabolismus in der Leber Glucuronsäure-Konjugate gebildet und über die Galle in den Darm ausgeschieden. Die Behandlung mit β-Glucuronidase führt in diesem Fall zur Spaltung von STV-Glucuroniden in die ursprünglichen STV-Monosubstanzen und Glucuronsäure. Somit können diese STV in der GC-MS/MS und LC-MS/MS Analyse detektiert werden. Zusätzlich wurden zu einigen der Proben je 0,25 ng Isotopenstandard zugegeben (¹³C-1,3DNB, ¹³C,¹⁵N-TNT, 4-ADNT-d5, 2-ADNT-d5; 2,5 µL eines 100 ng/mL Standards in Acetonitril). Über Nacht (16 – 20 h) erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 300 rpm in einem Eppendorf Thermomixer Compact. Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss. Bei einigen der Proben war eine deutliche Farbänderung zu erkennen, von blassen Grün- oder Brauntönen hin zu kräftigem Dunkelgrün. Eine flüssig-flüssig Extraktion mit n-Hexan, wie von Ek et al. (2006) beschrieben, wurde getestet. Da die etablierten GC-Methoden jedoch nicht auf Hexan als GC-Lösungsmittel hin optimiert sind, wurde das n-Hexan im Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand mit Acetonitril aufgenommen. Es konnten mit dieser Methode jedoch keine zufriedenstellenden Rückgewinnungsraten der Standards erhalten werden.

Alternativ wurde eine Extraktion der STV aus der Galle mittels Festphasenextraktion entwickelt. Hierzu wurde nach der Inkubation 300 µL Bidest-Wasser zur Probe pipettiert und diese auf 1 mL/ 30 mg Chromabond Easy Säulen (Macherey Nagel) gegeben. Anschließend wurden 500 µL Bidest-Wasser in die Mikroreaktionsgefäße gegeben, für 10 Sekunden auf einem Vortex-Mischer gemischt und auf die Säulen gegeben. Weitere 500 µL wurden nach dem Durchlaufen zum Waschen der Säulen auf diese gegeben. Anschließend wurde 15 min im Vakuum getrocknet und die Säulen mit zweimal 100 µL und einmal 50 µL Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde in ein 1,5 mL GC-Braunglasfläschchen mit Septumdeckel und einem 250 µL Einsatz überführt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

Zur Absenkung der Nachweisgrenzen war es sinnvoll, statt des Ansatzes mit 25 µL einen Ansatz mit der vierfachen Menge (100 µL Galle, 3600 U Glucuronidase) zu wählen. Problematisch ist jedoch, dass von vielen Individuen nur eine sehr geringe Menge Galle vorhanden war. Daher wurden folgende Poolproben hergestellt: Fanggebiet Außenweser drei Poolproben (je zwei Poolproben mit jeweils Galle von zwei Fischen der Größenklasse 1 und eine Poolprobe mit zwei

Fischen der Größenklasse 2), Fanggebiet Baltrum drei Poolproben mit der Galle von Fischen der Größenklasse 1 (Poolprobe 1 aus der Gallenflüssigkeit von vier Fischen, Poolprobe 2 und 3 mit jeweils Galle von drei Fischen).

Filet

Jedem Individuum wurde jeweils ein Filet entnommen. Hierzu wurde mittels eines Filetmessers von der Wirbelsäule Richtung Rückenflosse an den Gräten entlang geschnitten und in einem Schnitt die Haut vom Filet gelöst. Die Filets wurden in beschriftete 100 mL Schraubdeckelgefäße gegeben, gewogen und bei -20 °C eingefroren (Abbildung 24).

Abbildung 24: Entnahme des Filets aus einem weiblichen Individuum. Anschließend wurde das Filet in das unten rechtsstehende Probengefäß überführt



Quelle: Tobias Bünning, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler

Zur Aufarbeitung wurden die Filets geteilt und jeweils eine Hälfte gefriergetrocknet (Trockengewicht = 22 ± 4 % Feuchtgewicht). Die andere Hälfte dient als Rückstellmuster für gegebenenfalls weitere oder wiederholende Untersuchungen. Die gefriergetrockneten Proben wurden im Mörser homogenisiert, jeweils $1 \text{ g} \pm 0,02 \text{ g}$ eingewogen, mit 5 mL Acetonitril und 1 ng Isotopenstandard (^{13}C -1,3DNB, ^{13}C , ^{15}N -TNT, 4-ADNT-d5, 2-ADNT-d5; 10 μL eines 100 ng/mL Standards in Acetonitril) versetzt und eine Minute lang mit einem Vortexmixer gemischt. Nach der Zentrifugation (10 min bei 4100 rpm; 4 °C) wurde der Überstand abdekantiert, mit 50 mL Bidest-Wasser verdünnt und über 3 mL/200 mg Chromabond Easy Säulen (Macherey Nagel)

gegeben. Die Säulen wurden im Vakuum getrocknet und mit 3 x 1 mL Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde mittels Rotations-Vakuumkonzentrator Martin Christ RVC 2-25 CDplus im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingeengt und in 1,5 mL GC-MS Braunglasfläschchen überführt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

Kiemens

Bei den männlichen und den verbliebenen weiblichen Individuen der Fanggebiete und Klassen wurden die Kiemen im Ganzen aus dem Kopf heraus präpariert. Nach Entfernung des umliegenden Gewebes wurden sie im Ganzen in ein Zentrifugenröhrchen überführt, gewogen und bei -20 °C eingefroren.

Zur Aufarbeitung wurden je zwei Kiemenblätter entnommen, gefriergetrocknet und mit Acetonitril extrahiert. Das Trockengewicht betrug 26 ± 4 % vom Feuchtgewicht. Das Extrakt wurde mittels Rotations-Vakuumkonzentrator Martin Christ RVC 2-25 CDplus im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingeengt und in 1,5 mL GC-MS Braunglasfläschchen überführt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Eine Messung konnte im Rahmen der Projektlaufzeit jedoch nicht durchgeführt werden.

Leber

Bei allen mit Leber zur Verfügung gestellten Individuen wurde diese zuerst entfernt, um uneingeschränkten Zugang zu den anderen Organen zu gewährleisten. Hierzu wurde diese am Rand mit einer Pinzette angehoben und das nicht zur Leber gehörende Gewebe (u.a. Blutgefäße und Bindegewebe) mittels Sektionsschere durchtrennt. Die Lebern wurden in vorbeschriftete 15 mL Zentrifugenröhrchen gegeben, gewogen und bei -20 °C eingefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert. Bisher konnte noch keine Aufarbeitung erfolgen.

Niere

Die Kopfniere der Fische wurde durch Auskratzen direkt in ein beschriftetes Zentrifugenröhrchen (15 mL) überführt, gewogen und bei -20 °C eingefroren. Bisher konnte noch keine Aufarbeitung erfolgen.

Milz

Die Milz wurde in ein beschriftetes Mikroreaktionsgefäß überführt, gewogen und bei -20 °C eingefroren. Bisher konnte noch keine Aufarbeitung erfolgen.

4.2.1.2 Eiderenten

Die Entnahme der zu untersuchenden Organe erfolgte durch Mitarbeitende der Tierärztlichen Hochschule Hannover am ITAW in Büsum. Es wurden von 25 Tieren Proben von Leber, Niere, Muskel, Fett und Gehirn entnommen. Von sechs der Tiere konnte zudem Galle gewonnen werden. Aufgrund der für die GC-Methode problematische Matrix, wurde von einer Aufarbeitung der Fett-Proben abgesehen und diese nicht weiter untersucht. Für die anderen Probenmatrices wurden die für die Plattfische entwickelten Methoden adaptiert. Die Methodenentwicklung erfolgte an den sechs Enten, von denen Galle vorhanden war. Tabelle 11 fasst die Aufarbeitungsmethoden der einzelnen Proben je Eiderente zusammen. Die Details zu den genauen Aufarbeitungsschritten können den jeweiligen nachfolgenden Abschnitten entnommen werden.

Tabelle 11: Übersicht der Probenvorbereitungsmethoden der untersuchten Gewebe aus Eiderenten

Individuum	Leber	Niere	Muskel	Gehirn	Galle	Individuum	Leber	Niere	Muskel	Gehirn	Galle
1	*	*	*			14	*	*	*		
2	* β-PV	* β-PV	*	*	β-PV β-HP	15	* β-PV	* β-PV	*	*	β-PV β-HP
3	*	*	*			16	* β-PV	* β-PV	*	*	β-PV β-HP
4	*	*	*			17	*	*	*		
5	*	*	*			18	*	*	*		
6	*	*	*			19	*	*	*		
7	*	*	*			20	*	*	*		
8	*	*	*			21	*	*	*		
9	* β-PV	* β-PV	*	*	β-PV β-HP	22	*	*	*		
10	*	*	*			23	* β-PV	* β-PV	*	*	β-PV β-HP
11	*	*	*			24	*	*	*		
12	*	*	*			25	*	*	*		
13	* β-PV	* β-PV	*	*	β-PV β-HP						

* = gefriergetrocknet, β-PV = behandelt mit β-Glucuronidase aus *Patella vulgata*, β-HP = behandelt mit β-Glucuronidase aus *Helix pomatia*

Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, UKSH. Angepasst nach Schick et al. (2022).

Muskel

Zur Aufarbeitung wurden 8 – 13 g frisches Muskelgewebe in Bechergläser eingewogen und gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Proben wurden im Mörser homogenisiert, jeweils 1 g ± 0,02 g eingewogen, mit 5 mL Acetonitril und 1 ng Isotopenstandard (¹³C-1,3DNB, ¹³C,¹⁵N-TNT, 4-ADNT-d5, 2-ADNT-d5; 10 µL eines 100 ng/mL Standards in Acetonitril) versetzt und eine Minute im Vortexmischer gemischt. Nach Zentrifugation (10 min bei 4100 rpm; 4 °C) wurde der Überstand abdekantiert, mit 50 mL Wasser verdünnt und über 3 mL/200 mg Chromabond Easy Säulen (Macherey Nagel) gegeben. Die Säulen wurden im Vakuum getrocknet und mit 3 x 1 mL Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde mittels Rotations-Vakuumkonzentrator Martin Christ RVC 2-25 CDplus im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingeeengt und in 1,5 mL GC-MS Braunglasfläschchen überführt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

Galle

100 µL Galle wurde in ein 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß pipettiert und mit 3600 Einheiten β-Glucuronidase (*Helix pomatia*) in 400 µL wässrigen Acetatpuffer (pH 4,8) versetzt. Zusätzlich wurden zu den Proben je 1 ng Isotopenstandard zugegeben (¹³C-1,3DNB, ¹³C,¹⁵N-TNT, 4-ADNT-d5, 2-ADNT-d5; 10 µL eines 100 ng/mL Standards in Acetonitril). Über Nacht (16 – 20 h) erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 300 rpm in einem Thermomixer Compact der Firma

Eppendorf. Die Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss. Nach der Inkubation wurden 1 mL Bidest-Wasser zur Probe pipettiert und diese auf 3 mL/ 200 mg Chromabond Easy Säulen (FA Macherey Nagel) gegeben. Fünfmal 1 mL Bidest-Wasser wurden in die Mikroreaktionsgefäße gegeben, für 10 Sekunden auf einem Vortex-Mischer gemixt und auf die Säulen gegeben. Anschließend wurde 15 min im Vakuum getrocknet und die Säulen mit dreimal 1 mL Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde mittels Rotations-Vakuumkonzentrator Martin Christ RVC 2-25 CDplus im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingengt und in 1,5 mL GC-MS Braunglasfläschchen überführt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

Zusätzlich wurde noch ein zweiter Ansatz mit der β -Glucuronidase aus *Patella vulgata* in analoger Aufarbeitung durchgeführt.

Leber

Für die Lebern wurden zwei verschiedene Aufarbeitungen durchgeführt. Für die erste Methode wurde von allen Individuen zwischen 1,0 und 1,3 g Leber eingewogen, gefriergetrocknet und im Mörser homogenisiert. Anschließend wurden 0,2 g des Leberpulvers mit 2 mL Acetonitril und 1 ng Isotopenstandard versetzt (^{13}C -1,3DNB, $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -TNT, 4-ADNT-d5, 2-ADNT-d5; 10 μL eines 100 ng/mL Standards in Acetonitril). Nach 60-sekündiger Durchmischung auf einem Vortex-Mischer wurden die Probe für 30 Minuten im Ultraschallbad extrahiert, erneut mit dem Vortex-Mischer gemixt und 10 min bei 4 °C und 4100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit Bidest-Wasser auf 20 mL verdünnt und auf 3 mL/ 200 mg Chromabond Easy Säulen (FA Macherey Nagel) gegeben, mit 3 mL Bidest-Wasser gewaschen, im Vakuum getrocknet und mit 3 mL Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde mittels Rotations-Vakuumkonzentrator Martin Christ RVC 2-25 CDplus im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingengt und in 1,5 mL GC-MS Braunglasfläschchen überführt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

In einem zweiten Ansatz wurden 0,1 frische, homogenisierte Leber in einem Mikroreaktionsgefäß mit 3600 Einheiten β -Glucuronidase (*Helix pomatia*) in 400 μL wässrigen Acetatpuffer (pH 4, 8), sowie 1 ng Isotopenstandard (^{13}C -1,3DNB, $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -TNT, 4-ADNT-d5, 2-ADNT-d5; 10 μL eines 100 ng/mL Standards in Acetonitril) versetzt und über Nacht (16 h) bei 37 °C und 300 rpm in einem Eppendorf Thermomixer Compact inkubiert. Nach Zentrifugation (13, 000 rpm bei 4 °C) wurde der Überstand auf 3 mL/ 200 mg Chromabond Easy Säulen (FA Macherey Nagel) gegeben, die Mikroreaktionsgefäße dreimal mit 1 mL Bides-Wasser aufgefüllt und das Wasser ebenfalls auf die Säulen gegeben. Nach Trocknung im Vakuum wurden die Säulen mit 3 mL Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde mittels Rotations-Vakuumkonzentrator Martin Christ RVC 2-25 CDplus im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingengt und in 1,5 mL GC-MS Braunglasfläschchen überführt und bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

Niere

Die Aufarbeitung der Nierenproben erfolgte analog der Leberproben. Für die Gefrier Trocknung wurden 1 – 1,35 g Gewebe eingewogen und gefriergetrocknet. Anschließend wurden 0,1 g der gemörserten Probe mit 1 mL Acetonitril und 1 ng Isotopenstandard versetzt (^{13}C -1,3DNB, $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -TNT, 4-ADNT-d5, 2-ADNT-d5; 10 μL eines 100 ng/mL Standards in Acetonitril). Nach 60-sekündiger Durchmischung auf einem Vortex-Mischer wurden die Probe für 30 Minuten im Ultraschallbad extrahiert, erneut im Vortex-Mischer gemixt und 10 min bei 4 °C und 4100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit Bidest-Wasser auf 10 mL verdünnt und auf 3 mL/ 200 mg Chromabond Easy Säulen (FA Macherey Nagel) gegeben, mit 3 mL Bidest-Wasser gewaschen, im Vakuum getrocknet und mit 3 mL Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde mittels Rotations-Vakuumkonzentrator Martin Christ RVC 2-25 CDplus im Vakuum auf ein Volumen von

1 mL eingeeengt und in 1,5 mL GC-MS Braunglasfläschchen überführt. Diese wurden bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

0,1 g der frischen Nieren wurden zusätzlich nach der oben beschriebenen Aufarbeitungsmethode für frischen Leberproben durch Inkubation mit 3600 U Glucuronidase aufbereitet.

Gehirn

Die Aufarbeitung der Gewebeproben aus den Gehirnen erfolgte analog der Aufarbeitung der gefriergetrockneten Nierenproben.

4.2.1.3 Aalmuttern (Galle)

Von den 49 Gallenblasen aus Aalmuttern enthielten lediglich vier Gallenblasen Gallenflüssigkeit. Die Aufarbeitung der Galle erfolgte analog der Aufarbeitung der für Plattfischgalle beschriebenen Methode. Die Galleflüssigkeiten wurden mit β -Glucuronidase aus *Helix pomatia* versetzt und bei 37 °C für 20 Stunden in einem Thermomixer inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben auf Chromabond Easy-Säulen aufgegeben. Die Säulen wurden dreimal mit je 500 μ L Wasser gespült und 15 min im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde fünfmal mit 50 μ L Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde in Braunglasflaschen überführt und per GC-MS/MS gemessen.

4.2.1.4 Seehunde und Schweinswale

Urin

Der bei -20 °C gelagerte Urin wurde bei +4 °C aufgetaut und bis zur Verarbeitung auf Eis gelagert. Vor dem Beginn der Probenpräparation wurden die einzelnen Proben für eine Minute mittels Vortexmischer gemischt. Für die Aufarbeitung wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet.

Methode 1: Als Vorversuch wurde nach der in Koske et al. (2020) beschriebenen Methode gearbeitet: Je dreimal 250 μ L jeder Urinprobe wurden in je ein 1,5 mL Eppendorfgefäß pipettiert und mit 240 μ L Acetonitril und 10 μ L eines 250 ng/mL $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -TNT-Standards versetzt. Die einzelnen Proben wurden mit je 500 μ L Wasser (LC-MS Grade, 2,5 mM Ammoniumacetat) verdünnt, in 2 mL Spritzen aufgezogen und durch einen 0.22 μ m Filter in 1,5 mL Braunglasvials gegeben. Die Messung erfolgte mittels LC-MS/MS.

Methode 2: Es wurde die Methode der Behandlung der Proben mittels Glucuronidase von Sabbioni et al. (2005) adaptiert: Je zwei Aliquots (500 μ L) von jeder Probe wurden in 2 mL Eppendorf-Gefäße mit 500 μ L Natriumacetatpuffer versetzt. Hinzu pipettiert wurden 40 μ L eines 250 g/mL Standards von $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -TNT, 4-ADNT-d5 und 2-ADNT-d5. Nachdem die Proben für 30 Sekunden gevortext worden waren, wurden zu Aliquot 1 5000 Einheiten (50 μ L) β -Glucuronidase HP-2 (*Helix Pomatia*) und zu Aliquot 2 10.000 Einheiten β -Glucuronidase H-1, (gelöst in 50 μ L Puffer) gegeben. Die Proben wurden abgedeckt für 22 Stunden bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Je zwei Blindproben pro Glucuronidase wurden mit 500 μ L Puffer statt Urin verarbeitet. Die Aufarbeitung erfolgte mittels Festphasenextraktion über Chromabond Easy Säulen (1 ml, 30 mg). Nach Konditionierung mit 300 μ L Reinstwasser, 600 μ L Methanol und 300 μ L Reinstwasser wurden die Proben auf die noch feuchten Säulen pipettiert. Die Probengefäße wurden zweimal mit 500 μ L Reinstwasser aufgefüllt und ebenfalls auf die Säulen gegeben. Die Elution erfolgte mit insgesamt 250 μ L Acetonitril. Die eluierten Proben wurden in 300 μ L Braunglas-Probenvials für die Messung mittels GC-MS/MS gegeben. 50 μ L der Probe wurden in ein zweites 300 μ L Braunglasvial übertragen und mit 150 μ L Wasser (LC-MS Grade, 215 mM Ammoniumacetat) zur Messung mittels LC-MS/MS verdünnt.

Muskelfleisch

Die Muskelfleischproben von Schweinswalen und Seehunden wurden tiefgefroren in 100 mL Einwegprobengefäße überführt und gefriergetrocknet. Das mittlere Trockengewicht betrug für Seehunde $27,3 \pm 4,4$ % vom Feuchtgewicht, bei Schweinswalen $28,3 \pm 3,3$ % (Tab. 12). Das getrocknete Fleisch wurde von Hand mittels Spatel und Mörser zerkleinert. Je Probe wurden 4 Aliquots zu 500 mg in 15 mL Sarstedt-Probenröhrchen überführt, mit 10 ng $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -TNT-Standard (40 μL einer 250 ng/mL-Lösung in Acetonitril) sowie 4 mL Acetonitril versetzt und eine Minute mit Hilde eines Vortexmixer gemischt. Nach Zentrifugation (10 min bei 4100 rpm; 4 °C) wurde der Überstand abdekantiert, mit 40 mL Wasser verdünnt und über 3 mL/200 mg Chromabond Easy Säulen (Macherey Nagel) gegeben. Die Säulen wurden im Vakuum getrocknet und mit 3 x 1 mL Acetonitril eluiert. Das Eluat wurde mittels Rotations-Vakuumkonzentrator (Martin Christ RVC 2-25 CDplus) im Vakuum auf ein Volumen von 1 mL eingengt und in 1,5 mL GC-MS Braunglasfläschchen überführt. Je 250 μL der Lösungen wurden in Braunglasvials mit 750 μL Wasser (LC-MS Grade, 2,5 mM Ammoniumacetat) für die Messung mittels LC-MS/MS verdünnt.

Tabelle 12: Frisch- und Trockengewichte der Muskelproben aus Seehund und Schweinswal

Probe	frisch [g]	trocken [g]	Restgewicht [%]	MW Restgew. [%]	StAbw. [%]
Seehund 1	19,650	6,307	32,1		
Seehund 2	19,110	4,688	24,5		
Seehund 3	14,618	4,182	28,6		
Seehund 4	15,544	4,541	29,2		
Seehund 5	18,538	2,891	15,6		
Seehund 6	18,796	4,827	25,7		
Seehund 7	17,299	4,844	28,0		
Seehund 8	10,944	3,158	28,9		
Seehund 9	13,338	4,090	30,7		
Seehund 10	13,512	4,064	30,1		
				27,3	4,4
Wal 11	9,691	2,019	20,8		
Wal 12	7,836	2,225	28,4		
Wal 13	8,006	2,311	28,9		
Wal 14	22,484	6,162	27,4		
Wal 15	15,839	4,439	28,0		
Wal 16	12,633	3,667	29,0		
Wal 17	13,072	4,608	35,3		

Probe	frisch [g]	trocken [g]	Restgewicht [%]	MW Restgew. [%]	StAbw. [%]
Wal 18	17,492	4,937	28,2		
Wal 19	9,164	2,679	29,2		
Wal 20	12,151	3,357	27,6		
				28,3	3,3

MW Restgew. = Mittelwert Restgewicht, StAbw. = Standardabweichung

Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Leber und Niere

Die Organteile wurden auf Eis aufgetaut, mit Skalpell und Messer zerteilt und etwa 10 g in 15 ml Sarstedt-Röhrchen überführt. Es erfolgte eine Homogenisierung mit einem Ultraturrax der Firma IKA Labortechnik. Jeweils 100 mg des Homogenats wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 3.600 U β -Glucuronidase (*Helix pomatia* Typ H-1, Sigma-Aldrich®; Merck, Darmstadt, DE) in 500 μ L Natriumacetatpuffer (pH 4,8) mit zusätzlich 500 μ L Natriumacetatpuffer versetzt und über Nacht auf einem Thermomixer inkubiert (37 °C, 300 rpm). Chromabond Easy SPE-Säulen wurden mit 300 μ L Aqua bidest, 600 μ L Methanol und erneut 300 μ L Aqua bidest gespült und im Vakuum getrocknet. Zu jeder Probe wurden 400 μ L Aqua bidest gegeben und gemischt. Anschließend wurden die Proben für eine Minute bei 11.600 rpm zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde auf die Säulen gegeben und ein Druck von 100 mbar angelegt. Zum im Reaktionsgefäß verbliebenen Gewebepellet wurden 500 μ L Aqua bidest gegeben und das Pellet resuspendiert. Anschließend wurde erneut bei 11.600 rpm für eine Minute zentrifugiert und der Überstand mit 100 mbar auf die Säulen aufgetragen. Das Gewebepellet wurde erneut mit 500 μ L Aqua bidest versetzt und zusätzlich 20 μ L Standardlösung (250 ng/ml $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ TNT; Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA) zugegeben und gemischt sowie eine Minute bei 11.600 rpm zentrifugiert und mit 100 mbar auf die Säulen aufgetragen. Die Säulen wurden mit 500 μ L Aqua bidest bei 100 mbar gespült und anschließend bei 200 mbar getrocknet. Zum Eluieren der Analyten wurden jeweils 250 μ L Acetonitril auf die Säulen gegeben und ein Druck von 50 mbar eingelegt. Das Eluat wurde in 1,5 ml Tubes aufgefangen und anschließend in Braunglasvials mit Glasinlet transferiert sowie mit PTFE-Septumschraubdeckeln verschlossen. Für die Messung an der LC-MS/MS wurden 150 μ L LC-Grade-Wasser mit 1 mM Ammoniumacetat in einem zweiten Vial mit Inlet vorgelegt und 50 μ L des Eluats hinzugegeben.

4.2.2 Probenanalyse mittels GC-MS/MS und LC-MS/MS

4.2.2.1 GC-MS/MS

Die Messung der Proben erfolgte im Selected Reaction Monitoring – Modus (SRM) mittels Thermo Fisher TSQ 8000 EVO Tandem Quadrupol Massenspektrometer, gekoppelt mit einem Thermo Fisher TRACE1310 Gaschromatographen. Zur Trennung der Analyten wurde eine Thermo Fisher TG-5MS Amine GC-Säule (15 m * 0,25 cm; 0,25 μ m Filmdicke) verwendet. Helium diente als Trägergas, Argon als Kollisionsgas. Die erhaltenen Spektren wurden aufgezeichnet und analysiert mit Hilfe der Software Chromeleon 7.2 der Firma Thermo Fisher.

Zur Messung aller Proben wurde die in Bünning et al. 2021 beschriebene Messmethode für gefriergetrocknete Muschelproben unter Verwendung eines Kaltaufgabesystems mit einem Injektionsvolumen von 5 μ L auf Quarzwolle-Liner verwendet. Nach Injektion bei 70 °C wurde das Lösungsmittel im Trägergasstrom entfernt. Die Analyten wurden anschließend durch

Erhöhung der Injektortemperatur ($5\text{ °C}\cdot\text{s}^{-1}$ auf 240 °C) auf die Säule aufgebracht. Die Initialtemperatur des Ofens von 100 °C wurde für $1,0\text{ min}$ gehalten, anschließend mit $35\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ auf 220 °C erhöht und nach $0,7\text{ min}$ bis zum Ende der Gesamtmesszeit ($6,99\text{ min}$) mit $70\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ bei 280 °C ausgeheizt.

4.2.2.2 LC-MS/MS

Genutzt wurde ein Sciex QTrap5500 Tandem-Quadrupol Massenspektrometer mit einer Turbo V ESI Ionenquelle, gekoppelt mit einem Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)-System, bestehend aus einer Shimadzu Nexera LC-40D XS quaternären Pumpe mit Vierkanal-Inline-Entgaser, einem Agilent 1200 G1316A Säulenofen und einem CTC HTS PAL Autosampler mit gekühlter Probenaufbewahrung ("Cool Stack") und einem VICI Cheminert 6-Port Injektor mit $5\text{ }\mu\text{L}$ Probenschleife. Für die Trennung der Analyten wurden RESTEK Raptor Biphenyl $1,8\text{ }\mu\text{m}$ UHPLC-Säulen ($150\text{ mm} \times 2,1\text{ mm}$) mit Vorsäule verwendet. Die Aufnahme der Chromatogramme erfolgte in Sciex Analyst 1.7.2, zur Auswertung wurde Sciex MultiQuant 3.0.3 eingesetzt. Das UHPLC-Programm für die Trennung startete mit einer isokratischen Phase (5 min) mit einem Lösungsmittelverhältnis von 40% Wasser (mit $2,5\text{ mM}$ Ammoniumacetat) und 60% Methanol bei einem Fluss von $0,25\text{ mL/min}$ und einer Ofentemperatur von 35 °C . Anschließend wurde bis Minute 6 auf 95% Methanol erhöht und dies bis zum Ende der Messung für weitere sechs Minuten aufrechterhalten. Nach Abschluss der Messung wurde für sieben Minuten das anfängliche Lösungsmittelverhältnis wiederhergestellt. Die Messung der STV erfolgte im Selected-Reaction-Monitoring-Verfahren (SRM). Die entsprechenden Übergänge sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: LC-MS/MS Retentionszeiten und SRM-Übergänge der untersuchten STV

Verbindung	Retentionszeit [min]	Vorgängerion [m/z]	Quantitationsion [m/z]	Kollisionsenergie [eV]
RDX	2.39	281.0	46.0	-33
HMX	2.11	355.0	46.0	-38
TNT	9.04	226.0	46.0	-50
4-ADNT	4.36	196.0	149.0	-19
2-ADNT	4.59	196.0	46.0	-56

Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Plattfische

Wie bereits in Kapitel 3.3.1.2 beschrieben wurden insgesamt 33 Filet- und Galleproben auf STV untersucht. Davon stammen neun Proben aus dem Fanggebiet Borkum, vier aus dem Gebiet bei der Insel Baltrum und 20 aus der Fangregion Außenweser (Abb. 10). In den Galleproben der Region Borkum konnte 1,3-DNB, TNT sowie die TNT-Metabolite 2- und 4-ADNT nachgewiesen werden (Abb. 14). Die gemessenen Höchstkonzentrationen betragen hier $0,25\text{ ng/ml}$ 1,3-DNB, $0,75\text{ ng/ml}$ TNT, $1,25\text{ ng/ml}$ 4-ADNT und $1,2\text{ ng/ml}$ 2-ADNT. Die Galleproben der Plattfische aus der Region Baltrum enthielten 2- und 4-ADNT deutlich unterhalb von $0,25\text{ ng/ml}$ und 1,3-DNB in einer Größenordnung von ca. $0,25\text{ ng/ml}$ (Abb. 14). Die in der Außenweser gefangenen Fische enthielten in ihrer Gallenflüssigkeit bis zu $0,25\text{ ng/ml}$ 1,3-DNB, $0,75\text{ ng/ml}$ TNT und $0,4\text{ ng/ml}$ bzw. $0,5\text{ ng/ml}$ 4- und 2-ADNT (Abb. 14).

In den Filetproben der Plattfische konnten ebenfalls Rückstände von STV gemessen werden. Die TNT-Metabolite 2- und 4-ADNT wurden in allen drei Fangregionen in Konzentrationen von maximal 1 ng/g Trockengewicht gemessen (Abb. 15). TNT wurde dagegen in den Fischen des Fanggebiets Borkum mit bis zu 8 ng/g gemessen, in den Fischen aus der Baltrumer Region bis zu 3 ng/g und dem Bereich Außenweser bis zu 6 ng/g (Abb. 15). Nach dem Trocknen reduzierte sich das Gewicht der Proben auf $20,4 \pm 1,9$ % des Feuchtgewichtes (Minimalwert: 15,2 %, Maximalwert 28,8 %, n = 81 Fische).

4.3.2 Eiderenten

Im Rahmen dieses Arbeitspakets konnten folgende Nachweisgrenzen für die aus Eiderenten stammenden Gewebe (Leber, Niere, Muskel, Gehirn) und Körperflüssigkeiten (Galle) etabliert werden (Tab. 14):

Tabelle 14: Nachweisgrenzen (LoD) und Bestimmungsgrenzen (LoQ) der untersuchten STV pro Gramm präpariertem Gewebe bzw. Milliliter Galle aus Eiderenten und Aalmutter (Galle). Es wurde mittels GC-MS/MS (splittless) gemessen.

STV	Leber [ng/g f.w.]		Niere [ng/g f.w.]		Galle [ng/mL]		Muskel [ng/g t.w.]		Gehirn [ng/g f.w.]	
	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ
1,3-DNB	0,3	1,1	0,3	1,1	0,3	1,1	0,3	1,1	0,3	1,1
2,4-DNT	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,4
TNT	0,5	1,6	0,5	1,6	0,5	1,6	0,5	1,6	0,5	1,6
4-ADNT	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3
2-ADNT	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1	0,4

Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

In den 25 untersuchten Eiderenten konnten in keinem der Gewebe 1,3-DNB, 2,4-DNT, TNT, 4-ADNT oder 2-ADNT nachgewiesen werden.

Alle Ergebnisse der Untersuchungen wurden im November 2022 im Journal „Toxics“ offen zugänglich veröffentlicht (Schick et al., (2022)): Schick, L.A.; Strehse, J.S.; Bünning, T.H.; Maser, E.; Siebert, U. Energetic Compounds in the Trophic Chain—A Pilot Study Examining the Exposure Risk of Common Eiders (*Somateria mollissima*) to TNT, its Metabolites, and By-Products. *Toxics* 2022, 10, 685. <https://doi.org/10.3390/toxics10110685> und sind in Kapitel 4.4.2 wiedergegeben.

4.3.3 Aalmuttern (Galle)

In keiner der vier Gallenproben konnten 1,3-DNB, 2,4-DNT, TNT, 4-ADNT, 2-ADNT nachgewiesen werden. Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen der einzelnen STV entsprechen denen in Tabelle 14 unter Galle angegebenen.

4.3.4 Seehunde und Schweinswale

Es wurden von den Schweinswalen und Seehunden jeweils zweimal zwei Aliquots der Muskelproben nach der unter 4.2.1.4 beschriebenen Methode aufgearbeitet und mittels LC-MS/MS gemessen. Von Leber und Niere der beiden Spezies stand jeweils eine Probe je Individuum zur Verfügung. In keinem der Gewebe konnten Hinweise auf Rückstände von STV gefunden werden (Tab. 15).

In einem Vorversuch wurden Teilmengen von allen Urinproben aus Schweinswalen und Seehunden vereinfacht aufgearbeitet. Hierzu wurde die Methode von Koske et al. (2020) zur Extraktion von STV aus Galle adaptiert und entsprechend alle Urinproben mit Acetonitril, Wasser und 2,5 mM Ammoniumacetat versetzt und direkt in Braunglasvials überführt und vermessen. In den nach dieser Methode aufgearbeiteten Proben konnten keine Hinweise auf STV gesehen werden. Das übrige Probenmaterial wurde anschließend mit beiden Glucuronidasen wie unter 4.2.1.4 Methode 2 beschrieben aufgearbeitet. Auch hier konnten keine STV detektiert werden (Tab. 15). Die Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen der einzelnen STV können Tabelle 16 entnommen werden.

Tabelle 15: Ergebnisse der STV Analytik der Untersuchten Gewebe und Körperflüssigkeiten aus Seehunden und Schweinswalen

Probe	Urin		Muskulatur		Niere		Leber und Gallenwege	
	GC-MS	LC-MS	GC-MS	GL-MS	GC-MS	LC-MS	GC-MS	LC-MS
Seehund 1	-	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Seehund 2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Seehund 3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Seehund 4	-	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Seehund 5	-	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Seehund 6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Seehund 7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Seehund 8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Seehund 9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Seehund 10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Wal 11	-	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Wal 12	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Wal 13	-	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Wal 14	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Wal 15	-	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Wal 16	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Wal 17	-	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Wal 18	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Wal 19	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Wal 20	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

<LOD = Messsignal unterhalb des Detektionslimits, - = keine Probe oder zu wenig Probenmaterial für eine Messung vorhanden.

Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Tabelle 16: Nachweisgrenzen (LoD) und Bestimmungsgrenzen (LoQ) der untersuchten STV pro Gramm präpariertem Gewebe bzw. Milliliter Urin aus Seehunden und Schweinswalen, für Messungen mittels GC-MS/MS und LC-MS/MS

STV/Gerät	Leber [ng/g f.w.]		Niere [ng/g f.w.]		Urin [ng/mL]		Filet [ng/g d.w.]	
	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ	LoD	LoQ
1,3-DNB GC-MS (splitless)	0,7	2,2	0,7	2,2	0,7	2,2	0,3	1,1
2,4-DNT GC-MS (splitless)	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,1	0,3
TNT GC-MS (splitless)	0,3	1,0	0,3	1,0	0,3	1,0	0,2	0,5
4-ADNT GC-MS (splitless)	0,2	0,6	0,2	0,6	0,2	0,6	0,1	0,3
2-ADNT GC-MS (splitless)	0,2	0,7	0,2	0,7	0,2	0,7	0,1	0,3
RDX LC-MS	0,19	0,64	0,19	0,64	0,19	0,64	0,10	0,32
HMX LC-MS	0,17	0,57	0,17	0,57	0,17	0,57	0,09	0,29
TNT LC-MS	0,26	0,86	0,26	0,86	0,26	0,86	0,13	0,43
4-ADNT LC-MS	0,25	0,82	0,25	0,82	0,25	0,82	0,12	0,41
2-ADNT LC-MS	0,17	0,55	0,17	0,55	0,17	0,55	0,08	0,27

Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

4.4 Ergebnisbewertung Arbeitspaket 3

4.4.1 Allgemeine Bewertung der etablierten Methoden zur Gewebeaufarbeitung und Messtechnik

Für die Aufarbeitung von Gallenproben wurden zwei verschiedene β -Glucuronidasen getestet (aus *Helix pomatia* und *Patella vulgata*). Hinsichtlich der Effizienz der beiden Glucuronidasen wurde kein Unterschied festgestellt, so dass beide Enzyme gleichwertig eingesetzt werden können. Zur Methodevaluierung wurde zudem auch nach der von Koske et al. (2020) angewendeten Methode aufgearbeitet. Die Methode unterscheidet sich vor allem dadurch, dass keine Glucuronidase zur Spaltung von STV-Glucuronsäure-Konjugaten verwendet wurde. Die Methode erscheint für unsere Analytik als weniger geeignet, da keine Trennung der STV-Glucuronsäure-Konjugate erfolgt. Aufgrund einer Vielzahl von möglichen STV-Konjugaten, die zum Teil alle nicht in ihrer Struktur bekannt sind, besteht die Gefahr, dass bestimmte

Glucuronsäurederivate der STV nicht als solche vom Massenspektrum erkannt werden und somit nicht in die Quantifizierung mit einfließen, was zu einer verminderten gemessenen Konzentration führen würde.

Auf die Plattfische bezogen musste festgestellt werden, dass oft nur sehr wenig Gallenflüssigkeit vorhanden war, bei vielen Fischen sogar gar keine. Für eine aussagekräftige Aufarbeitung mussten Proben mehrerer Fische gepoolt werden. Diese lassen konkret somit leider keine Rückschlüsse auf die gemessenen STV Konzentrationen in einzelnen Individuen zu.

Die Evaluierung der Methoden erfolgte mittels Zugabe geringer Mengen Isotopenstandards zu den Proben am Anfang des Aufarbeitungsprozesses. Diese sind klar messbar. Damit wurde sichergestellt, dass die während des Aufarbeitungsprozesses möglicherweise verloren gegangenen Konzentrationen an STV trotzdem erfasst werden. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die entsprechenden STV tatsächlich vollständig aus dem jeweiligen Gewebe extrahiert wurden.

Allgemeine Schwierigkeit der Methodenentwicklung in diesem Arbeitspaket: Bis auf Plattfische waren keine Positivproben vorhanden, die Methodenentwicklung und -optimierung erfolgte somit blind.

4.4.2 Bewertung der auftretenden STV-Konzentrationen in den verschiedenen Tierspezies im Hinblick auf eine mögliche Anreicherung von STV und Umbauprodukten im Nahrungsnetz

In den in Arbeitspaket 2 untersuchten Miesmuscheln und Zebramuscheln konnten keine STV detektiert werden, ebenso nicht in den in diesem Arbeitspaket 3 untersuchten Eiderenten und Gallen von Aalmuttern. Auch die untersuchten Seehund- und Schweinswalproben enthielten keine Hinweise auf eine mögliche Belastung mit STV. Es konnten TNT und dessen Metabolite 2- und 4-ADNT sowie 1,3-DNB bisher nur in Fischfilet und/oder Fischgalle von Plattfischen aus der Nordsee detektiert werden. In den Miesmuscheln der Umweltprobenbank aus Nord- und Ostsee (Arbeitspaket 1) konnten in Proben verschiedener Jahrgänge Spuren von 2- und 4-ADNT sowie 1,3-DNB unterhalb der Detektions- oder Quantifizierungsgrenze gefunden werden.

Der Begriff Bioakkumulation bezeichnet die Aufnahme eines Stoffes aus der Umwelt und die Anreicherung in einem Organismus (UBA, 2016). Die Stoffaufnahme kann dabei über verschiedene Wege erfolgen. Bei Wasserorganismen kann die Aufnahme über Kiemen und Haut aus dem umgebenden Wasser oder bei benthischen Lebewesen über das sie umgebende Sediment heraus erfolgen. Eine Aufnahme geschieht auch über das Fressen, zum Beispiel von Sedimentpartikeln. Durch die Bioakkumulation eines Stoffes kann dieser den aufnehmenden Organismus selbst direkt schädigen, wenn der Stoff eine für den Organismus schädliche Konzentration erreicht. Auf der anderen Seite kann es zu einer Weitergabe des Stoffes in der Nahrungskette kommen, wenn kontaminierte Organismus gefressen werden (UBA, 2016). Dieser Vorgang wird als Biomagnifikation bezeichnet. Top-Prädatoren an der Spitze einer Nahrungskette, wie auch der Mensch, können so durch einen Schadstoff gefährdet werden.

Das mögliche Ausmaß einer Bioakkumulation kann näherungsweise durch das Anreicherungsverhältnis einer Substanz im Organismus gegenüber der Konzentration in der Umwelt beschrieben werden. Für einige stark akkumulierende chemische Substanzen wurden zum Teil Anreicherungsfaktoren bis zum Faktor 100.000 beobachtet (UBA, 2016). Dies bedeutet, dass ein Organismus eine Chemikalie aus der Umwelt aufnimmt und reichert diese im Körper bis zum 100.000-fachen der Umweltkonzentration an (UBA, 2016). Eine wichtige Kenngröße ist hierbei der n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $\log K_{ow}$ einer Substanz. Ab einem $\log K_{ow}$ von etwa 4 wird davon ausgegangen, dass eine Substanz bioakkumulierend ist. Der $\log K_{ow}$

beträgt für TNT 1,86, für 2-ADNT 2,8 und für 4-ADNT 2,62 (Juhasz and Naidu, 2007). TNT und seine beiden Hauptmetabolite sind somit nur schwach lipophil. Es sollte jedoch nicht außeracht gelassen werden, dass sich auch ohne Bioakkumulation für einen Organismus schädliche Konzentrationen nachweisen lassen. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn ein Organismus permanent selbst geringen Schadstoffkonzentrationen ausgesetzt ist, wie zum Beispiel Muscheln und andere ortstreue Organismen in Munitionsversenkungsgebieten mit kontinuierlicher Freisetzung von STV. Auch können nicht bioakkumulierende Substanzen in einem Organismus Schädwirkungen haben, wenn diese Substanzen zu den CRM-Stoffen gehören.

In Arbeitspaket 3 wurde der Fokus vor allem auf in der Nahrungskette höher eingruppierte marine Spezies gelegt. Eine Bewertung der möglichen Weitergabe einer Substanz über die Nahrung wie auch die Anreicherung im Nahrungsnetz soll daher exemplarisch an Fischen, Muscheln, Eiderenten sowie Seehunden und Schweinswalen erfolgen.

Fisch

Plattfische sind die erste höhere Spezies in denen STV im Rahmen dieser Untersuchungen detektiert werden konnten. Die untersuchten Fische gehören zu den Karnivoren und legen somit die Vermutung nahe, dass die Aufnahme von STV über die Nahrung erfolgen könnte. Dies kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch weder belegt noch widerlegt werden, da in diesem Projekt lediglich Muscheln als eine mögliche Nahrungsquelle untersucht wurden. Neben der Aufnahme über die Nahrung (Biomagnifikation) können STV auch über das durch die Kiemen aufgenommene Wasser in die Fische gelangen (Biokonzentration). Dafür spricht, dass im Filet der untersuchten Fische vor allem nicht-metabolisiertes TNT gefunden wurde und weniger die Metabolite 2- und 4-ADNT. Auch sind die gemessenen Gesamtkonzentrationen an STV im Filet höher als vergleichsweise in der Galle derselben Fische. In der Galle sind vor allem 2- und 4-ADNT detektiert worden, welche die Hauptmetaboliten von TNT darstellen (Ek et al., 2008; Mariussen et al., 2018). Die Biokonzentration bezogen auf das Umgebungswasser kann als Biokonzentrationsfaktor (BCF) gekennzeichnet werden. Der BCF stellt das Verhältnis der Konzentrationen im Organismus im Vergleich zum Wasser dar. Mariussen et al. (2018) haben für Atlantischen Lachs folgende Biokonzentrationsfaktoren (BCF) für TNT ermittelt: Für Fischmuskel 14 L/kg (6-Stunden Exposition) und 2,4 L/kg (48-Stunden Exposition), für Galle 404 L/kg (6-Stunden Exposition) und 1933 L/kg (48-Stunden Exposition).

Für Plattfische liegen bisher keine BCF vor, so dass die Werte von Mariussen et al. nur näherungsweise angenommen werden können. Es ist daher sinnvoll nicht nur ein, sondern mehrere Gewebe zu betrachten, da so eine Unterscheidung zwischen Aufnahme durch die Nahrung und direkte Aufnahme aus dem Umgebungswasser vorgenommen werden kann. Die Betrachtung von Galle ist noch aus einem weiteren Aspekt sinnvoll, da hierdurch Rückschlüsse über den Zeitpunkt der STV-Aufnahme gezogen werden können. In Galle lassen sich nur solche Stoffe finden, die erst kürzlich von dem Organismus aufgenommen wurden, da Galle verhältnismäßig schnell ausgeschieden wird. Gerade bei den vergleichweisen ortstreuen Plattfischen können somit ausgehend vom Fangort Rückschlüsse auf den Kontaminationsgrad durch von in der Nähe befindlichen Munitionsvorkommen gezogen werden.

Die hier untersuchten Plattfische stammen aus Niedersachsen mit erheblichen Munitionsvorkommen in der Nähe der Fanggebiete (siehe Kapitel 3.3.2.2). Bisher liegen die gemessenen STV-Konzentrationen in der Galle und im Filet der untersuchten Plattfische im einstelligen Nanogramm-Bereich je Gramm Trockengewicht (Filet) bzw. Nanogramm-Bereich je Milliliter (Galle). Dies könnte sich bei fortschreitender Korrosion der im Meer liegenden Munition in den kommenden Jahren jedoch verschärfen. Untermuert werden die Ergebnisse aus diesem Projekt durch Ergebnisse der Projekte UDEMM und DAIMON. Maser et al. (2023b)

konnten STV in Filet und Galle von Plattfischen nachweisen, die an einem mit Munition beladenen Schiffswrack in der belgischen Nordsee gefangen wurden. Koske et al. (2020) konnten Rückstände von STV in der Galle von Plattfischen detektieren, die am Rande des Munitionsverklappungsgebiets Kolberger Heide (Ostsee) gefangen wurden. Abgeleitet von den $\log K_{ow}$ für TNT und seine beiden Hauptmetaboliten, ist somit auch eine Anreicherung im Nahrungsnetz nicht auszuschließen, auch wenn diese als eher schwach ausgeprägt angenommen werden kann.

Muscheln

Für viele Spezies stellen Muscheln wie Miesmuscheln eine wichtige Nahrungsquelle dar, zum Beispiel für die hier in diesem Arbeitspaket ebenfalls untersuchten Eiderenten. In den Miesmuscheln und Zebamuscheln aus Arbeitspaket 2 konnten keine STV detektiert werden. In einigen Miesmuschelproben der Umweltprobenbank des Bundes (Arbeitspaket 1) konnten in Proben aus den Jahren 2019 und 2020 Konzentrationen der TNT-Metabolite 2- und 4-ADNT knapp unterhalb des LoQ gemessen werden (0,14 ng/g und 0,17 ng/g bezogen auf das Trockengewicht). In Expositionsversuchen mit Miesmuscheln im Munitionsversenkungsgebiet Kolberger Heide wurden in Miesmuscheln, die für drei Monate in der Nähe korrodierender Ankertaaminen ausgebracht wurden, durchschnittlich 7 ng/g (Feuchtgewicht) 4-ADNT im Muschelgewebe detektiert (Appel et al., 2018). Miesmuscheln, die in unmittelbarer Nähe von freiliegender Schießwolle 36 (enthält 60 – 70 % TNT) für drei Monate exponiert wurden, enthielten eine Gesamt-STV-Konzentration (TNT, 2- und 4-ADNT) von durchschnittlich 350 ng/g bezogen auf das Feuchtgewicht (Strehse et al., 2017). Für Miesmuscheln (*M. edulis*) wurden von Ballentine et al. (2015) ein Biokonzentrationsfaktor für TNT von 1,0 L/kg ermittelt und 14,2 L/kg als Mischwert für TNT, 2- und 4-ADNT. Rosen und Lotufo (2007b) haben einen BCF von 1,61 für TNT für *M. galloprovincialis* ermittelt. Die ermittelten Werte weisen auf ein geringes Akkumulationsverhalten in Miesmuscheln hin. Zudem werden STV von Miesmuscheln auch verhältnismäßig rasch wieder ausgeschieden (Lotufo et al., 2016). Nichtsdestotrotz zeigen die sich um bis zum Faktor 50 unterscheidenden STV-Konzentrationen im Muschelgewebe aus Strehse et al. (2017) und Appel et al. (2018), dass sich, je nach in der näheren Umgebung vorkommenden Mengen an freiliegenden Sprengstoffen, auch die Gewebekonzentrationen erheblich unterscheiden können. Es scheint sich in den Muscheln eine Art Steadystate einzustellen, so dass auch unterschiedliche STV-Konzentrationen an andere Organismen weitergegeben werden können, denen die Muscheln als Nahrung dienen. Hier wären die jeweiligen Wasserkonzentrationen ausschlaggebend. Je höher die STV-Konzentrationen im Wasser sind, umso höher sind die Konzentrationen in den Muscheln anzunehmen, bezogen auf die individuellen Gegebenheiten in einem Munitionsgebiet. Davon ausgenommen sind Ereignisse wie Unterwassersprengungen, die kurzzeitig zu einem vielfach erhöhten Anstieg der STV-Konzentrationen führen können (Maser et al., 2023a).

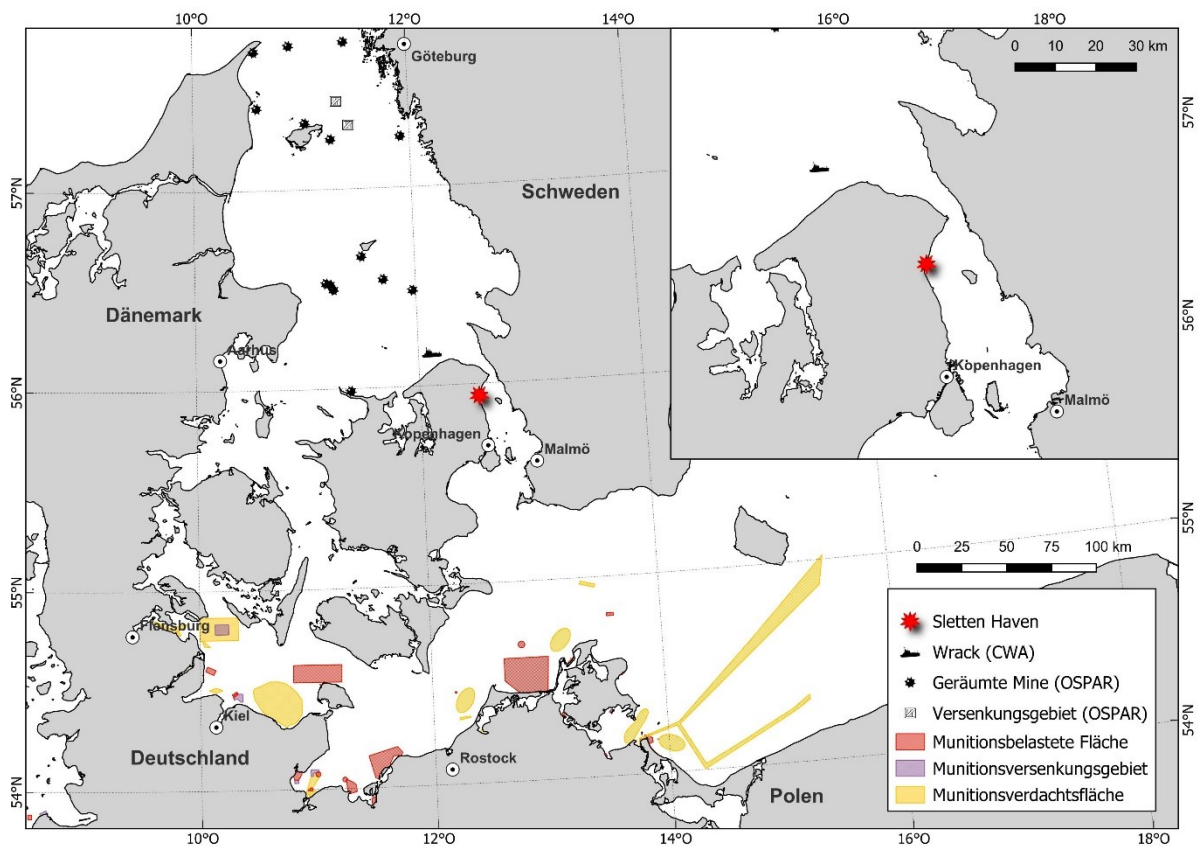
Auch ohne eine Bioakkumulation in Muscheln können niedrige Gewebekonzentrationen mit STV unter Umständen in anderen marinen Lebewesen wie Eiderenten, die kontaminierte Muscheln fressen könnten, gesundheitliche Folgen haben, da TNT und Metabolite zu den CRM-Stoffen zählen.

Eiderenten

In den untersuchten Eiderenten konnten keine STV nachgewiesen werden. Dies könnte bedeuten, dass die Eiderenten zwar STV-haltige Nahrung aufgenommen haben, sich die STV jedoch nicht in den Enten angereichert haben oder aber, dass sich keine STV in der Nahrung befunden haben. Wie im vorhergehenden Abschnitt dargestellt, sind Miesmuscheln als eine der Hauptnahrungsquellen für Eiderenten sehr wohl in der Lage STV in ihrem Gewebe

aufzunehmen. Es könnte somit einfach nur bedeuten, dass in der Nähe der gefundenen Eiderenten keine größeren Munitionsvorkommen zu verzeichnen sind und somit die als Nahrung dienenden Miesmuscheln keine STV aus dem Umgebungswasser aufgenommen haben. Über Munitionsfunde in der näheren Umgebung von Sletten Havn, woher die untersuchten Eiderenten als Beifang stammen, ist wenig bekannt. Im Kattegat wurden in der Vergangenheit immer wieder Minen geräumt, so dass durchaus mit Munitionsvorkommen zu rechnen ist (Schick et al., 2022). Im Munitionskataster AmuCad ist konkret lediglich nur ein mit einer unbekanntem Menge an Munition versenktes Schiff in der näheren Umgebung von Sletten Havn aufgeführt (Abbildung 25). Am 14. August 1945 explodierte die mit chemischer Munition beladene SS Bernlef in der Nähe von Gilleleje, Nordsjaelland. Die aus Kopenhagen stammende Munition war zur Versenkung bestimmt¹².

Abbildung 25: Munitionsvorkommen in den eventuellen Einzugsgebieten der in Sletten Haven als Beifang gefundenen Eiderenten



Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Der Hafen Sletten Haven befindet sich somit nicht in unmittelbarer Nähe zu bekannten Munitionsversenkungsgebieten (Koch, 2010), so dass eine kurzfristige Exposition der untersuchten Tiere eher unwahrscheinlich ist. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Eiderenten aufgrund ihres Wanderverhaltens und ihrer gemeinsamen Winterquartiere entlang der Ostseeküste irgendwann in der Nähe von Gebieten mit versenkter Munition aufgehalten haben.

Die geschätzte tägliche Nahrungsaufnahme von Eiderenten beträgt 2000 g, was 660 g Muschelfleisch entspricht, wenn sie sich ausschließlich von Muscheln ernähren (Guillemette et

¹² <https://wrecksite.eu>, abgerufen am 21.12.2022

al., 1992). Würden Eiderenten Miesmuscheln verzehren, die wie im Munitionsversenkungsgebiet Kolberger Heide in unmittelbarer Nähe von Schießwolle leben, würde sich folgendes Aufnahmeszenario ergeben: Ausgehend von einer Konzentration von 266 ng/g Gesamt-STV (bezogen auf TNT, 2- und 4-ADNT) in Miesmuscheln in unmittelbarer Nähe von Schießwolle (Strehse et al., 2017) und einem durchschnittlichen Gewicht der Vögel von 2,8 kg (Schick et al., 2022) ergibt sich daraus eine maximale tägliche Aufnahme von 0,06 mg/kg (Berechnung: $266 \text{ ng/g} \cdot 660 \text{ g} : 2,8 \text{ kg}$) (Schick et al., 2022). Dieses Szenario zeigt deutlich, dass es somit nicht auszuschließen ist, dass STV von Miesmuscheln als Nahrung in Eiderenten übergehen können.

Bisher gibt es kaum Untersuchungen zur Anreicherung von STV in höheren Organismen und Spitzenprädatoren. Diese sind zum Teil mit einer anderer Organstruktur ausgestattet als zum Beispiel Invertebraten und besitzen somit andere Verteilungsbereiche mit entsprechenden unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten für lipophile und hydrophile Substanzen. In einer Studie von (Slobodnik et al., 2022) wurde das Gewebe von Meeressäugern aus der Ostsee (Schweinswal (*Phocoena phocoena*), Delfin (*Delphinus delphis*), Seehund (*Phoca vitulina*) und Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*)) auf verschiedene Substanzen aus verklappter Munition untersucht, darunter auch die in dieser Studie untersuchten. Sie konnten keine der Substanzen nachweisen, allerdings waren ihre LoD mit 2 ng/g f.w. für TNT und 15 ng/g f.w. für 2- bzw. 4-ADNT viel höher, während die LoD in diesem Arbeitspaket je nach STV zwischen 0,1 – 1,1 ng/g t.w. bestimmt wurde.

Seehunde und Schweinswale

Im Rahmen der Untersuchungen in diesem Arbeitspaket konnten keine STV in den aus Seehunden und Schweinswalen stammenden Proben gefunden werden. Hier kommen vergleichbare Aspekte zu tragen, wie bereits bei den Eiderenten beschrieben: Haben sich die Seehunde und Schweinswale vor ihrem Tod in der Nähe mit Munition belasteter Gebiete aufgehalten bzw. haben sie Nahrung zu sich genommen, die STV aus solchen Gebieten zuvor aufgenommen haben? Wie auch bei den Untersuchungen an Eiderenten müssten auch hier noch weitere Untersuchungen folgen um eine klare Aussage darüber treffen zu können, ob diese Top-Prädatoren keine STV über die Nahrung zu sich nehmen, weil der Übergang aus der Nahrung generell nicht im signifikanten Maße stattfindet oder der Grund darin besteht, dass die Nahrung einfach nicht kontaminiert ist. Diese Aspekte lassen sich weder experimentell, noch in Feldversuchen zufriedenstellend darstellen.

4.4.3 Abschätzung einer möglichen Gefährdung des Menschen und humantoxikologische Bewertung

Da es nun als erwiesen gilt, dass TNT und seine Metabolite in Biota wie Miesmuscheln und Fisch aufgenommen werden, stellt sich nun für den Menschen als Konsument von Fisch und Meeresfrüchten die Frage, ob der mögliche Verzehr von TNT-kontaminierten Lebensmitteln eine gesundheitliche Gefahr darstellt. Besonders hervorzuheben ist hier eine chronisch-toxische Gefahr durch den Verzehr gering belasteter Fische und Meeresfrüchte. Hierbei sind insbesondere mögliche Gefahren durch die kanzerogenen und erbgutveränderten Eigenschaften der Explosivstoffe zu nennen (z.B. Bolt et al. (2006))(Strehse and Maser, 2022).

Bereits im Jahr 2005 wurden fundierte Leitwerte für Trinkwasser abgeleitet, die auch die Kanzerogenität der einzelnen STV berücksichtigt (Wollin and Dieter, 2005). Die Trinkwasserleitwerte für TNT, 2- und 4-ADNT wurden mit 0,2 µg/L angegeben. Für 2- und 4-ADNT lagen zum Zeitpunkt der Ableitung keine eigenen geeigneten Studien vor, so dass die Ableitung Aufgrund von Struktur- und Aktivitätsbetrachtungen sowie In-vitro und In-vivo-

Kurzzeitstudien vorgenommen wurde und diesen Nitroaromaten ein vergleichbares Wirkungsspektrum wie TNT zugeschrieben wurde, so dass der Trinkwasserleitwert von TNT für 2- und 4-ADNT gleichgesetzt wurde (Wollin and Dieter, 2005). Für HMX und RDX wurden Trinkwasserleitwerte von 175 µg/L bzw. 1 µg/L ermittelt (Wollin and Dieter, 2005).

Das Umweltbundesamt hat bezüglich TNT vorläufige Umweltqualitätsnormen erstellt. Für den Verzehr von Fischprodukten wurde ein vorläufiger Oral Slope Factor von $3,0 \cdot 10^{-2}$ [mg/kg b.w.*d]⁻¹ berechnet (Schudoma et al., 2022). Mit dem Oral Slope Factor wird das zusätzliche Risiko geschätzt, was bei lebenslanger oraler Aufnahme einer karzinogenen Substanz mit einer (Trinkwasser-)Konzentration von 1 µg pro Liter an Krebs zu erkranken. Dabei sind die Autoren von einem täglichen Fischkonsum von 115 Gramm pro Tag ausgegangen (Schudoma et al., 2022). Schudoma et al. (2022) haben des Weiteren vorläufige UQN für die toxische bzw. kanzerogene Wirkung auf den Menschen durch kontaminierte Biota mit 60 µg/kg (Biota ww) bzw. 4,1 µg/kg (Biota ww) angegeben.

Berechnungen des Instituts für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler des UKSH haben ergeben, dass selbst bei einem lebenslangen täglichen Konsum einer durchschnittlichen Verzehrmenge von ca. 37 Gramm Fisch und Meeresfrüchten (FIZ, 2017), die sich wie im von Appel et al. (2018) beschriebenen Untersuchungsszenario in der Nähe von intakten aber korrodierenden Munitionskörpern befunden haben, sich momentan keine negativen gesundheitlichen Auswirkungen vermuten lassen (Maser and Strehse, 2021). Dies würde auch für die Konzentrationen im Filet der in diesem Projekt untersuchten Plattfische gelten. Meeresfrüchte und Fische, die jedoch aus einem Gebiet mit nicht von Metallhüllen umgebenen Sprengstoffen stammen, sind dagegen unter Umständen so hoch belastet, dass ein täglicher Konsum nicht empfohlen werden kann (Maser and Strehse, 2021, 2020).

Langfristig ergibt sich somit für die Fischerei, wie auch für das Installieren von Aquakulturen, dass diese nur in nicht mit Kriegsaltlasten belasteten Gebieten erfolgen sollten (Strehse and Maser, 2022). Eine Überwachung von Munitionsversenkungsgebieten, zum Beispiel mit einem Biomonitoring mit Muscheln (Appel et al., 2018; Maser and Strehse, 2020; Strehse et al., 2017), ist zum Schutze der Konsumenten von Fisch und Meeresfrüchten daher empfehlenswert. Zudem ist in den kommenden Jahren vermehrt damit zu rechnen, dass die schützenden Metallhüllen immer weiter durchrosten und ihren giftigen Inhalt vermehrt freigeben und somit ein Übergang in die Nahrung wahrscheinlicher wird (Strehse and Maser, 2022).

5 Arbeitspaket 4 – Belastung mit chemischen Kampfstoffen

Chemiewaffen wurden im Ersten Weltkrieg in großem Umfang eingesetzt. Ihre Produktion und Lagerung wurden während des Zweiten Weltkriegs zwar fortgesetzt, sie wurden aber in Europa nicht eingesetzt. Das hatte zur Folge, dass sich riesige Mengen chemischer Munition und chemischer Kampfstoffe (chemical warfare agents = CWA) in den Arsenalen sowohl der Deutschen Armee als auch der alliierten Streitkräfte anhäuferten (Glasby, 1997; Surikov et al., 2014). Schon gegen Ende des Krieges begann die Deutsche Armee mit Verklappungsmaßnahmen im kleinen Maßstab in der Nähe des Kleinen Belts, um z.B. die Erbeutung des Nervenkampfstoffes Tabun durch die Alliierten zu verhindern (Knobloch et al., 2013). Nach dem Fall des Dritten Reichs, übernahmen die Alliierten die Kontrolle über das deutsche Chemiewaffen-Arsenal, das etwa 65.000 Tonnen Wirkstoffe enthielt (Surikov et al., 2014).

Im Auftrage der britischen und amerikanischen Besatzungsbehörden wurden große Mengen der erbeuteten Munition im Skagerrak und im Atlantischen Ozean versenkt.

In der Ostsee insgesamt wurden mindestens 50.000 Tonnen Chemiewaffen unter der sowjetischen Militärverwaltung versenkt, wobei darin etwa 15.000 Tonnen CWA Wirkstoffe vermutet werden. Die bedeutendsten Versenkungsgebiete in der Ostsee sind der Kleine Belt, das Bornholm Becken und das Gotland Becken, die dementsprechend nicht in den deutschen Gebieten der Ostsee liegen (Knobloch et al., 2013).

Die Chemiewaffen (Bomben oder Granaten) wurden oft einzeln oder in Behältnissen verpackt über Bord geworfen oder auch als Schiffsladung samt Schiff versenkt. In den meisten Fällen waren dabei auch Sprengstoffe zum Zünden der Chemiewaffen enthalten (Nawała et al., 2020). Sehr wahrscheinlich wurde ein Teil der Chemiewaffen schon auf dem Weg zu den Versenkungsgebieten versenkt („on route dumping“), allerdings ist nicht bekannt, wieviel Tonnen auf diese Weise entsorgt wurden. Auch nach Ende der offiziellen Versenkungsmaßnahmen wurde von der Marine der DDR und die Sowjetischen Marine bis in die 1980 Jahre Munition verklappt (Neffe et al., 2011). Bis 1964 liegen beispielsweise Unterlagen zur Versenkung von chemischer Munition über den Hafen Wolgast vor, für den Zeitraum danach sind bisher keine belastbaren Unterlagen aufführbar (Wichert, 2023).

Das am häufigsten verklappte CWA war Senfgas, meist als Fliegerbomben (KC 250) oder Artillerie-Granaten (10,5 cm oder 15 cm (Knobloch et al., 2013)) (Tab. 17). Weitere CWA in der versenkten Munition oder in Containern waren die phenylarsenhaltigen Stoffe Clark I möglicherweise auch Clark II und Adamsit (Tab. 17). Hinzu kamen noch das Tränengas α -Chloracetophenon sowie Blausäure (Tab. 17).

Senfgas ist in Wasser schlecht löslich. Bei längerer Lagerung bilden sich wasserlösliche Salze, die polymerisieren und mit der Zeit völlig fest werden. Abhängig von den Bedingungen im Meer können diese Polymere hydrolysieren und zyklische Abbauprodukte bilden.

Sowohl Clark I als auch Adamsit sind feste Materialien. Beide sind in Wasser schlecht löslich. Beide Substanzen können Hydrolyseprodukte bilden, die leicht dimerisieren und oxidieren. Arsinöl ist eine Mischung aus 50 % Phenylarsindichlorid, 35 % Diphenylarsinchlorid, 5 % Arsen(III)-chlorid und 5 % Triphenylarsin (Franke, 1976). Nach dem Ende des Zweiten Weltkrieges lagerten in Deutschland noch etwa 7500 Tonnen Arsinöl, die von den Alliierten zumindest teilweise in der Ostsee, der Nordsee und der Biskaya versenkt wurden (Altmann, 2007).

Tabelle 17: Bekannte CWA Versenkungsgebiete in Nord- und Ostsee. Die Daten stammen aus Knobloch et al., 2013 und www.amucad.org

Versenkungsgebiet	CWA	Vermutete Mengen (Tonnen)
Gotland Becken	Senfgas Clark I/II/Arsinöl Adamsit Chloracetophenon Tabun andere	581 (CWA Anteil ¹) 176 (CWA Anteil ¹) 118 (CWA Anteil ¹) 44 (CWA Anteil ¹) Menge unbekannt Menge unbekannt Insgesamt 2000
Bornholmbecken	Senfgas Clark I/II/Arsinöl I Adamsit Chloracetophenon Phosgen Lewisit Tabun	6713 (CWA Anteil ¹) 2033 (CWA Anteil ¹) 1363 (CWA Anteil ¹) 515 (CWA Anteil ¹) Menge unbekannt Menge unbekannt Menge unbekannt Insgesamt 33.060
Kleiner Belt Flensburger Förde	Senfgas Nicht genau klassifiziert Tabun-Mixturen	Menge unbekannt 5000 (davon 2000 CWA Anteil ¹) 1250 (davon 143 CWA Anteil ¹)*
Helgoland	Tabun	90 (davon 13 CWA Anteil)

* = in den Jahren 1959/60 wieder geborgen, ¹ = reiner CWA Anteil ohne Metallanteile der Umhüllungen oder sonstigen möglichen Beistoffen

Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

5.1 Analyse von Verdachtsproben auf Rückstände chemischer Kampfstoffe

Für die Probennahme galt es zunächst zu klären, in welchen Regionen eine Probennahme sinnvoll erscheint. In den deutschen Küstengewässern gibt es nur sehr wenige Bereiche, in denen CWA liegen oder lagen und somit als Probennahmegebiete in Frage kommen. Auf der anderen Seite musste gleichermaßen berücksichtigt werden, welche Regionen überhaupt technisch umsetzbar beprobt werden können bezüglich Schiffszeit, benötigtem Equipment und Hilfestellung durch geeignete und entsprechend autorisierte Institutionen. Bei der Beprobung von CWA Verdachtsflächen ist es zwingend vorgeschrieben, dass alle involvierten Personengruppen wie Schiffsbesatzungen, Taucher und die analysierenden Institutionen die erforderlichen Sicherheitsvorkehrungen strikt einhalten können.

5.1.1 Evaluierung geeigneter Gebiete

Bornholmbecken

Das Munitionsversenkungsgebiet östlich Bornholm (Dänemark) wurde für die Versenkung von CWA von den Alliierten festgelegt. Hier sollte die in der russischen Besatzungszone aufgefundenen CWA versenkt werden. Nach den vorliegenden Berichten wurden in der Zeit von August 1945 bis Januar 1948 ca. 32 000 t CWA unter russischer Verantwortung versenkt. (Böttcher et al., 2011; Knobloch et al., 2013; Wichert, 2023). In der Zeit von 1959 bis 1965 wurde von der damaligen DDR mehrere kleine Versenkungen von CWA vorgenommen (Wichert, 2023). Der Munitionstransport erfolgte aus südwestlicher Richtung aus den Verladehäfen Wolgast und Usedom. Aufgrund von möglichem „On-Route-Dumping“ ist im südwestlichen und südlichen angrenzenden Gebiet durchaus mit einzelnen CWA zu rechnen, ebenso mit

verschleppter CWA durch die Fischerei (nächstgelegener Fischereihafen ist Rønne auf Bornholm).

Wolgast

Der Hafen von Wolgast wurde nach dem 2. Weltkrieg durch die sowjetische Besatzungsmacht als Verladehafen für erbeutete Kampfstoffmunition genutzt. Beim Vormarsch der sowjetischen Truppen 1944/1945 bis nach Mitteldeutschland sind die Munitionsdeposits und Fabrikationsstätten für Kampfstoffmunition auf dem Territorium der vormaligen DDR besetzt worden. Neben der Verladung und Verbringung von Kampfstoffmunition durch Schiffe, ist ein Teil dieser Munition in Wolgast direkt in den Hafen bzw. Peene gelangt. Welche Mengen und unter welchen Umständen konnte bisher noch nicht geklärt werden. 1953 wurden in Wolgast Kampfstoffbomben mit Lost sowie italienische Transportbehälter für Lost-Munition geborgen. 1964 wurde der Hafenbereich im Zuge der Einrichtung eines Stützpunktes für die Nationale Volksmarine erneut untersucht und es wurden im Juli insgesamt 490 Granaten mit Kampfstoff-Füllung (Tabun, Lost, Chloraceton und Adamsit), sowie ein Schwelbehälter mit Clark 1 geborgen und durch den Munitionsbergungsdienst abtransportiert. Es konnte bisher nicht geklärt werden ob tatsächlich alle im Hafen versenkte Munition nunmehr geborgen wurde (Wichert, 2023).

Flensburger Förde

In der Flensburger Außenförde wurden vom 28. April bis 3. Mai 1945 rund 5000 t CWA (Granaten und Bomben mit Tabun- und Phosgenfüllung) durch deutsche Kräfte versenkt. Dabei begann man auf Höhe der Ochseninseln die Granaten der Oberdecksladung über Bord zu werfen. Zusätzlich wurden zwei Lastkähne mit weiteren 1600 t Tabungranaten (10,5 cm und 15 cm) im gleichen Gebiet versenkt. Die Munition der beiden Lastkähne wurde geborgen und erneut im Nordatlantik versenkt, die restliche Munition wurde bisher an Ort und Stelle belassen (Wichert, 2023). Weiterhin wurden in Flensburg zwei Schiffe mit CWA beladen und im Skagerrak versenkt. Bei der Beladung wurden insgesamt sieben Güterwagen mit defekter CWA-Munition in Flensburg entdeckt. Diese Munition wurde auf eine Barge geladen und im Versenkungsgebiet Flensburg ebenfalls als lose Munition versenkt. Es ist nicht auszuschließen, dass diese Munition ebenfalls schon in der Innenförde über Bord geworfen wurde (Wichert, 2023). Bislang wurde jedoch keine konkrete CWA-Belastung nachgewiesen.

Helgoland

Neben der Versenkung von konventioneller Munition wurde vor Helgoland eine Versenkung von 90 t CWA, hier Tabungranaten, dokumentiert. Diese Granaten stammen aus einem Munitionszug, der im April 1945 in Neuenkirchen durch Tiefflieger angegriffen wurde. Die CWA wurden nach dem Angriff am Bahndamm vergraben, unter britischer Aufsicht 1949 geborgen und auf einem Frachtschiff zur Versenkungsstelle südlich Helgoland verbracht und erneut versenkt (Wichert, 2023).

Der offizielle Wissensstand geht also aktuell von rund 90 t chemischer Munition in den deutschen Meeresgewässern vor Helgoland und einer unbekanntten Menge CWA südlich des Kleinen Belts zwischen Deutschland und Dänemark in unmittelbarer geografischer Nachbarschaft zur deutschen ausschließlichen Wirtschaftszone (AWZ) aus (Böttcher et al., 2011).

5.1.2 Planung und Durchführung der Probennahmen

Das Umweltbundesamt ist an die Ländervertreter von Schleswig-Holstein und Mecklenburg-Vorpommern herangetreten, um abzusprechen, ob im Rahmen des Projekts Interesse an einer Analyse von Sedimentproben auf CWA besteht. Diese müssten von den Ländern bereitgestellt werden. Ein anvisiertes systematisches Monitoring in der Flensburger Förde wurde wegen Sicherheitsbedenken von behördlicher Seite abgelehnt. Im Rahmen der Kooperation zwischen dem Umweltbundesamt und schleswig-holsteinischen Behörden konnten zwei Sedimentproben aus der Flensburger Förde gewonnen und im Rahmen des Projekts auf CWA analysiert und bewertet werden. Probennahmen von Schleswig-Holstein im Bereich von Helgoland waren nicht geplant. Eine entsprechende Kooperation zwischen dem Umweltbundesamt und mecklenburg-vorpommerschen Behörden zur Probennahme im Bereich Wolgast kam nicht zustande. Weiterhin konnte sich das UKSH einer Greenpeace-Aktion anschließen und Proben aus dem Bornholmbecken auf CWA analysieren lassen und bewerten.

Bornholmbecken

Am 26. September 2022 ereigneten sich in der Nähe der dänischen Insel Bornholm Explosionen an den Nord Stream Pipelines. Da dieses Gebiet im Jahr 1947 im Zuge der Entmilitarisierung Deutschlands nach dem Krieg zur Versenkung von tausenden Tonnen chemischer Kampfstoffe genutzt worden war, lösten diese Explosionen Besorgnis über eine Kontamination dieser Region mit hochgiftigen chemischen Kampfstoffen und Explosivstoffen aus. Es wurde befürchtet, dass die Explosionen diese Schadstoffe aufgewirbelt und mobilisiert hatten und damit eine Bedrohung für die marine Ökologie darstellen.

Um das Ausmaß und die potenzielle Toxizität der Verschmutzung nach dem Bruch der Gaspipelines einschätzen zu können, führte die Umweltschutzorganisation Greenpeace am 25. und 26. November 2022 mit ihrem Schiff Beluga II Probennahmen von Wasser und Sediment mit einem Tauchroboter durch. Die genommenen Proben sollten von der Firma Hazard Control GmbH (HCG) auf chemische Kampfstoffe und vom UKSH auf konventionelle STV (hier: Altmunition aus dem 2. Weltkrieg) untersucht werden. Zur Vorbereitung der Exkursion fanden mehrere Treffen beim UKSH und der Firma HCG statt, bei denen neben dem technischen Ablauf auch sicherheitsrelevante Verhaltensweisen und Schutzmaßnahmen vermittelt wurden. Zudem stellte die Firma HCG auch die spezifische Ausrüstung für die Probengewinnung, einschließlich Materialien zur Notfalldekontamination sowie ein mobiles Flammphotometer für Überwachungsmessungen während der Probennahme zur Verfügung.

Es wurden insgesamt 40 Sediment- und Wasserproben an insgesamt vier Standorten rund um die Explosionsstellen an der Nord Stream 1 Pipeline genommen. Drei der Standorte befanden sich zwischen 300 und 500 m vom Explosionsrohr Nord Stream 1 entfernt; ein Referenzort lag etwa 9 km entfernt. Der Referenzort diente zum Vergleich mit den Proben am Explosionsort. Die Wasserproben wurden an jedem Standort aus zwei verschiedenen Tiefen (5 m und 65 m) mit einem Zwei-Liter Wasserschöpfer nach Ruttner und die Sedimentproben mit einem Van-Veen-Greifer genommen.

Alle Proben wurden zuerst an die Firma Hazard Control GmbH geschickt und auf das Vorhandensein von chemischen Kampfstoffen untersucht. Damit sollte verhindert werden, dass CWA haltige Wasser- und/oder Sedimentproben in das Labor des UKSH gelangen, um eine Gefährdung der Mitarbeitenden in jedem Fall ausschließen zu können. Neben den CWA- und STV-Gehalten wurden an jeder Lokation und in jeder Tiefe weitere Wasserparameter (pH, Temperatur, Trübung, Leitfähigkeit) mit einem CTD-Sensor gemessen. Mit einer

Unterwasserdrohne dokumentierte Greenpeace zudem fotografisch die Zerstörungen an den Pipelines¹³.

Flensburger Förde

Im Sommer 2022 hatte der Kampfmittelräumdienst (KRD) Schleswig-Holstein in der Flensburger Förde (in der Nähe der Marineschule Mürwik) im Rahmen eines Antauchmanövers von Munitionsobjekten verdächtige Objekte gefunden (aus Pappe/Holzfasern), welche „verhärtete Strukturen“ enthielten. Im Rahmen der anschließenden kriminaltechnischen Untersuchung wurden Hinweise auf Adamsit gefunden. Daraufhin wurden zwei Sedimentproben genommen, welche zur Hazard Control GmbH (HCG) überführt und dort auf das Vorhandensein von CWA, speziell Adamsit, analysiert wurden. Das aufgefundene Adamsit wurde zur Vernichtung an die Gesellschaft zur Entsorgung von chemischen Kampfstoffen und Rüstungsaltslasten (GEKA mbH) in Munster übergeben.

5.1.3 Probenanalyse

Als Unterauftragnehmer für die Analysierung des Probenmaterials wurde die Firma Hazard Control GmbH (HCG) beauftragt. Das Unternehmen besitzt die für den Umgang mit chemischen Kampfstoffen benötigten Umgangsgenehmigungen und verfügt über entsprechend ausgestattete Labore für die analytischen Arbeiten.

Bei den zu betrachtenden Kampfstoffaltlasten handelt es sich um chemische Munition und Reizstoffe, die nach dem Zweiten Weltkrieg in Nord- und Ostsee verklappt wurden.

Die Proben aus dem Bornholmbecken wurden mittels GC/MS-Technologie auf die chemischen Kampfstoffe Tabun, Phosgen, Schwefellost (Senfgas), Stickstofflost und Chlor-Arsen-Kampfstoffe (Clark I und Clark II) sowie auf ausgewählte Abbau-Produkte getestet (Tab. 18).

Die Proben aus der Flensburger Förde wurden gezielt von der Firma HCG auf Adamsit untersucht.

5.1.4 Ergebnisse der Probenanalysen

Bornholmbecken

Die Firma Hazard Control GmbH (HCG) führte als Unterauftragnehmer von Greenpeace die Analyse von acht Wasserproben und vier Sedimentproben durch. Es wurde mittels GC/MS-Technologie auf die CWA Tabun, Phosgen, Schwefellost (Senfgas), Stickstofflost und Chlor-Arsen-Kampfstoffe (Clark I und Clark II) sowie in einigen Fällen auf deren Abbau- und Begleitprodukte getestet. Mit einer unteren Nachweisgrenze von <0,1 µg/L bzw. <100 µg/kg konnten in den Wasser- und Sedimentproben aus dem Bornholmbecken keine chemischen Kampfstoffe oder deren Abbau- und Begleitprodukte nachgewiesen werden (Tab. 18).

Da in den Wasser- und Sedimentproben aus dem Bornholmbecken keine chemischen Kampfstoffe oder deren Abbau- und Begleitprodukte nachgewiesen wurden, konnte keine humantoxikologische oder ökotoxikologische Risikobewertung auf Grundlage dieser Ergebnisse durchgeführt werden.

¹³ <https://www.greenpeace.de/biodiversitaet/meere/meeresschutz/greenpeace-aktivistinnen-untersuchen-folgen-pipeline-explosionen>

Tabelle 18: Ergebnis der Analysen von acht Wasser- und vier Sedimentproben aus dem Bornholmbecken, die im Rahmen einer Greenpeace Aktion am 25. und 26. November 2022 genommen wurden.

Probenbezeichnung	1,4-Oxathian	1,4-Dithian	1-Oxa-4,5-dithiepan	1,2,5-Trithiepan	S-Lost	Mono propyl-Lost	Sesqui-Lost	Sauerstoff-Lost	N-Lost	Thiodiglykol	Thiodiglykol-Sulfon	Thiodiglykol-Sulfoxid	Triethanolamin	Hexachlorethan	Triphenylarsin	Clark I	Clark II
Wasser	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Sediment	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg	µg/kg
9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. = Ergebnis unterhalb der Nachweisgrenze

Quelle: Hazard Control GmbH

Flensburger Förde

In den beiden Sedimentproben konnte durch die Firma HCG der arsenhaltige Nasen-Rachen-Reizstoff Adamsit nachgewiesen werden. Die Konzentrationen betragen 5,70 mg/kg (Trockengewicht) und 39,7 mg/kg (Trockengewicht). Die UQN für Arsen wurde somit nicht überschritten.

Da Adamsit ein Nasen-Rachen-Reizstoff ist, ist nicht bekannt, ob die hier im Sediment gemessenen Konzentrationen schädliche Auswirkungen auf den Menschen bei Berührung des Sediments hätten. Zwar ist bekannt, dass Hautkontakt mit Adamsit zu leichten Hautreizungen wie Rötungen führen kann, jedoch ist nicht bekannt, ob die hier gefundenen Mengen im Milligramm-Bereich bezogen auf ein Kilo Sediment, dazu ausreichen würden. Durch den äußerst geringen Dampfdruck kann davon ausgegangen werden, dass sich das Adamsit aber auch nicht einfach aus dem Sediment verflüchtigt, was eine inhalative Aufnahme aus dem belasteten Sediment ausschließen würde.

In Bezug auf die Ökotoxizität wurde im *Daphnia magna* Immobilisierungstest nach OECD 202 Adamsit als sehr toxisch eingestuft (Czub et al., 2021; OECD, 2004). Die LC₅₀ wird mit 55,6 und 74,3 µg/L (zuzüglich Standardabweichung) angegeben, die EC₅₀ mit 44,4 und 71,5 µg/L (zuzüglich Standardabweichung) (Czub et al., 2021). Höher et al. (2019) haben Miesmuscheln (*Mytilus trossulus*) über 96 Stunden in einem Laborversuch unterschiedlich konzentrierten Mischungen von Adamsit, Clark I und Chloracetophenon ausgesetzt. Die Adamsit-Konzentrationen betragen zwischen 2,5 und 10 µg/L. Negative Auswirkungen auf die exponierten Muscheln konnten auf subzellulärer und funktioneller Ebene, einschließlich zytotoxischer, immunotoxischer und oxidativer Stresswirkungen von den Autoren beobachtet werden (Höher et al., 2019). Diese akuten Wirkungen traten selbst bei der niedrigsten Testkonzentration auf.

5.2 Räumliche und zeitliche Arsenbelastung von Nord- und Ostsee in ausgewählten Umweltproben anhand von Daten aus der Meeresumweltdatenbank (MUDAB)

Eine indirekte Möglichkeit zur Abschätzung einer Belastung mit chemischen Kampfstoffen ist der Nachweis von Arsen in verschiedenen Matrices. Arsen ist Bestandteil der chemischen Kampfstoffe Lewisit, Adamsit, Clark 1 und Clark 2 und kann somit als indirekter Nachweis für diese Kampfstoffe herangezogen werden. Arsen stammt jedoch auch aus geogenen wie auch verschiedenen anderen anthropogenen Quellen. Zu letzteren gehören zum Beispiel arsenhaltige Pestizide und der Einsatz in der Glasherstellung sowie zur Herstellung spezieller Metalllegierungen (Bundesgesundheitsblatt, 2003).

Arsen wird im Bund/Länder- Messprogramm Nord- und Ostsee (BLMP) sowie der Umweltprobenbank (UPB) routinemäßig gemessen. In der Meeresumweltdatenbank (MUDAB) liegen über 5.000 Messwerte überwiegend von Arsen im Sediment und Wasser von Nord- und Ostsee (Tab. 19) vor. Die Umweltprobenbank verfügt über Zeitreihen von Arsen in Blasentang, Miesmuschel, Aalmutter und Silbermöwe aus Nord- und Ostsee¹⁴. In AP4 wurden die Daten über Arsengehalte in Sediment, Wasser und Miesmuscheln von Nord- und Ostsee ausgewertet.

¹⁴ <https://www.umweltbundesamt.de/daten/wasser/nordsee/schadstoffkonzentrationen-in-organismen-der-nordsee#arsen-in-silbermoweneiern>

5.2.1 Vorgehensweise

Im Auftrag des Umweltbundesamtes wird die Meeresumweltdatenbank MUDAB von der Bundesanstalt für Gewässerkunde betrieben. Die Daten sind im Internet öffentlich abrufbar¹⁵. Da versenkte chemische Munition aus den beiden Weltkriegen Arsenverbindungen enthalten kann, wurde untersucht, ob zwischen den Orten der heutigen Proben-Entnahme und der Nähe zu bekannten Munitions-belasteten Flächen, ein Zusammenhang in Bezug auf die Arsenbelastung im Sediment, Wasser und in Miesmuscheln besteht.

Verwendete Software

Die Arsengehalte wurden aus MS Excel-Tabellen der MUDAB Datenbank entnommen. Die Aufbereitung der Daten erfolgte mit einem selbst geschriebenen Python-Script (Python 3.11.4). Zur Erstellung der Diagramme wurde GraphPad Prism, Version 8.4.3 (© 2023 GraphPad Software) benutzt. Die Geodatenauswertung wurde mit dem Open-Source-Geographie-Informationssystem QGIS, Version 3.32.1¹⁶ erstellt.

Ausgewertete Daten

Gemessene Arsengehalte im Sediment, Wasser und Miesmuscheln (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758) wurden zur Analyse ausgewählt. Die Anzahl der Messdaten und die Zeiten der Probennahme ist in Tabelle 19 dargestellt. Anzumerken ist, dass von den in der Tabelle gelisteten 1729 Nordseewasserproben nur diejenigen Werte mit Gehalten <50µg/L ausgewertet wurden. Weitere 409 Messwerte, die mit 2 – 137 mg/kg als Einheit gelistet sind beziehen sich nicht auf die Arsenkonzentration in freiem Wasser, sondern auf Schwebstoffmesswerte und wurden somit nicht in der Auswertung berücksichtigt.

Tabelle 19: Anzahl der Messwerte mit Entnahmezeitraum von Miesmuscheln, Wasser- und Sedimentproben in Nord- und Ostsee der MUDAB Datenbank

	Anzahl der Messwerte (Entnahmezeitraum)		
	Miesmuschel	Wasser	Sediment
Nordsee	133 (2002-2021)	1729 (2002-2020)	4395 (2002-2021)
Ostsee	81 (2002-2021)	903 (2004-2021)	216 (2002-2018)

Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Kartendarstellung

Die erstellten Karten stellen Regionen von Nord- und Ostsee mit bekannten Munitions-belasteten Gebieten dar. Eingezeichnet sind die Namen der Projektstationen (Probennahmestellen). Die Daten zu den Ortsangaben der Projektstationen sind ebenfalls aus der MUDAB-Datenbank entnommen. Mediane der Messwerte aus dem Beobachtungszeitraum neben den Projektstationen sind als Zahlenwert eingetragen. Zusätzlich sind sie auch als farbige Balken dargestellt, deren Höhe die Arsenkonzentration visualisiert. Die Balken sind auf den jeweils höchsten Wert normalisiert (5,2 µg/L Wasser, 138 mg/kg Sediment, 18,3 mg/kg Trockengewicht Muscheln). Farbige Flächen ohne Rand kennzeichnen ein Gebiet im Abstand von 10 km um

► Munitionsbelastete Flächen

¹⁵ <https://geoportal.bafg.de/MUDABAnwendung/>

¹⁶ <https://qgis.org/de/site/>

Innerhalb munitionsbelasteter Flächen sind Kampfmittelfunde dokumentiert, die Art der Einbringung erfolgte jedoch nicht über offizielle Verklappungsmaßnahmen (sondern z.B. Schiffshavarien) oder ist nicht dokumentiert.

► Munitionsverdachtsflächen

Für Munitionsverdachtsflächen besteht ein begründeter Verdacht der Anwesenheit von Kampfmitteln.

► Munitionsversenkungsgebiete

In ehemaligen Munitionsversenkungsgebieten ist der Eintrag dort lagernder Kampfmittel auf eine dokumentierte Nutzung zur offiziellen Verklappung zurückzuführen.

Die Definition der Gebiete ist aus Böttcher et al. 2011 zitiert. Umrandete Flächen stellen die Größe dieser Gebiete dar.

Diagrammdarstellung

Die Diagramme stellen alle Messwerte der jeweiligen Projektstation als Scatter-Plots dar. Sie sind nach aufsteigenden Medianwerten (Tab. 20) (schwarze waagrechte Linie) sortiert. Die Farben entsprechen den Farbcodes der Kartendarstellungen. Die farbigen Balken, mit denen einzelne Projektstationen markiert sind, kennzeichnen die Stationen mit Abständen kleiner als 10-km zu den jeweiligen Munitions-belasteten Flächen.

Die in Tabelle 20 zusammengefassten statistischen Kennzahlen zeigen, dass trotz recht großer Spannbreite der Messwerte, die Mittelwerte eher in den niedrigeren Konzentrationsbereichen liegen. Das liegt darin begründet, dass Messwerte mit vergleichsweise niedrigen Arsenkonzentrationen deutlich häufiger auftreten als jene im Bereich der jeweiligen Höchstkonzentration. Eine getrennte Darstellung und Interpretation der räumlichen und zeitliche Spannbreiten kann den Abbildungen 26-34 in den folgenden Abschnitten entnommen werden.

Tabelle 20: Statistische Kennzahlen der Auswertung der Arsenwerte der MUDAB

	Wasser		Sediment		Miesmuscheln	
	N	O	N	O	N	O
n	1320	903	4395	211	383	295
Mittelwert*	2,31	1,44	25,00	16,61	8,23	6,98
Median*	2,00	1,24	23,00	16,00	7,69	6,70
Min*	0,20	0,05	0,20	3,60	0,016	2,00
Max*	41,00	15,20	157	80,00	22,94	40,62
Spannbreite*	40,80	15,15	156	76,40	22,92	38,62
Standardabw.*	9,04	1,19	14,19	7,45	6,20	4,46

*Werte in µg/L (Wasser), mg/kg (Sediment), mg/kg Trockengewicht (Miesmuscheln), n = Anzahl der ausgewerteten Messwerte, N = Nordsee, O = Ostsee

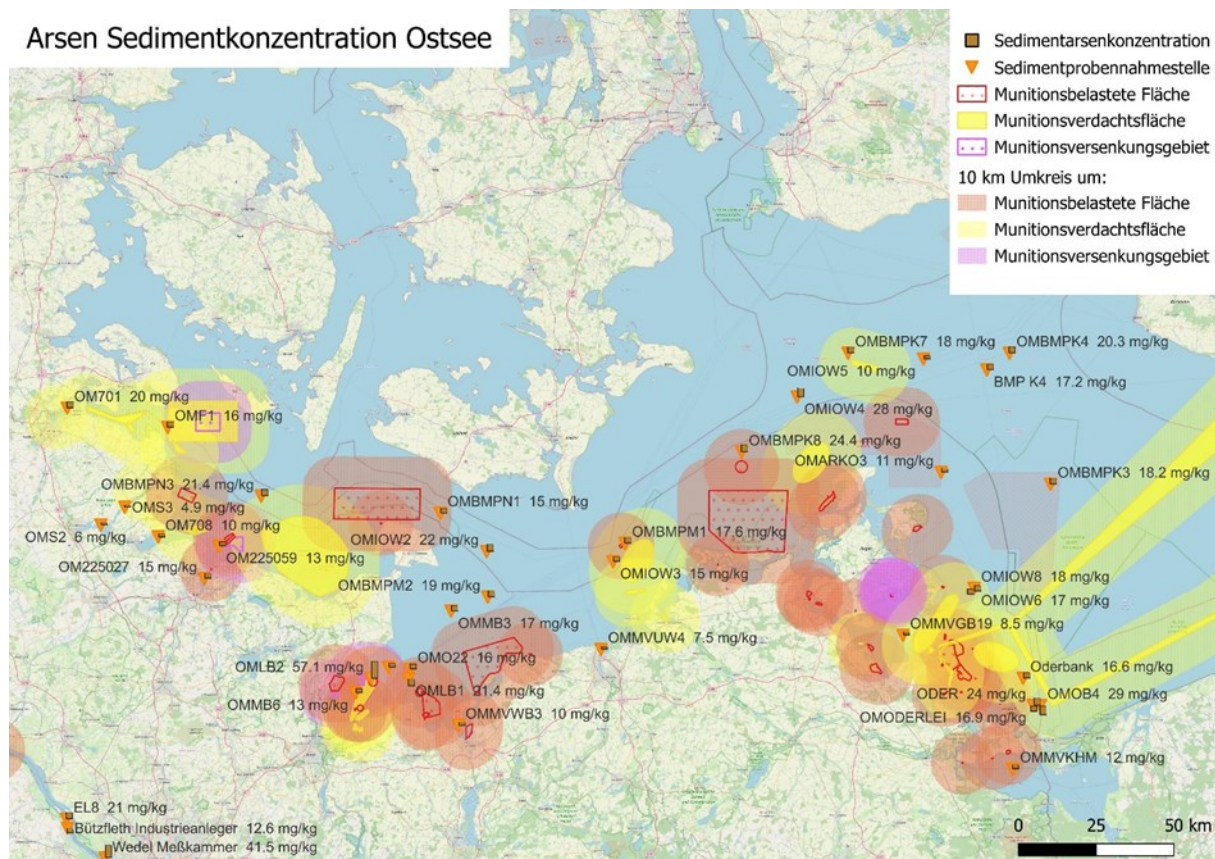
Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

5.2.2 Arsen-Gehalte in Sediment und Wasser von Nord- und Ostsee sowie Miesmuscheln

Arsen-Gehalt Sediment Ostsee

Aus der Meeresumweltdatenbank (MUDAB) wurden insgesamt 216 Messwerte von Arsen-Gehalten in Ostsee-Sedimenten der Jahre 2002 bis 2018 ausgewertet. Diese Daten wurden an 36 Messtationen genommen (Abb. 26). Die Werte liegen im Mittel alle im Bereich zwischen 5 und 29 Milligramm pro kg Sediment. Die mittlere Arsenkonzentration der Station OMLB2 (Abb. 26) liegt bei 57 Milligramm pro kg Sediment und ist damit ca. doppelt so hoch wie die restlichen Werte im Vergleich. Für diese Station lagen jedoch lediglich zwei Werte aus der MUDAB zur Auswertung vor (80 mg/kg in 2002 und 34,1 mg/kg in 2003), was zu einer in der hier vorgenommenen Auswertung dargestellten Arsenkonzentration von 57,1 mg/kg führte. Messungen aus weiteren Jahrgängen ergeben für die Station OMLB2 eine mittlere Arsenkonzentration von 28,7 mg/kg, wenn dabei der vergleichsweise hohe Wert aus 2002 nicht berücksichtigt wird (Lutterbeck, 2023). Diese mittlere Arsenkonzentration entspricht somit den übrigen in der Ostsee ermittelten mittleren Arsenkonzentration im Sediment. Es ist zudem normal, dass an einzelnen Stationen in einzelnen Jahrgängen vergleichsweise hohe Arsenkonzentrationen gemessen werden bzw. wurden. Dies kann unterschiedliche Gründe haben und weist somit nicht auf eine generell erhöhte Arsenbelastung in einem Gebiet hin.

Abbildung 26: Grafische Darstellung der mittleren Arsenkonzentrationen in Sedimentproben der MUDAB Messstationen in der Ostsee sowie ihre Lage zu Munitionsflächen

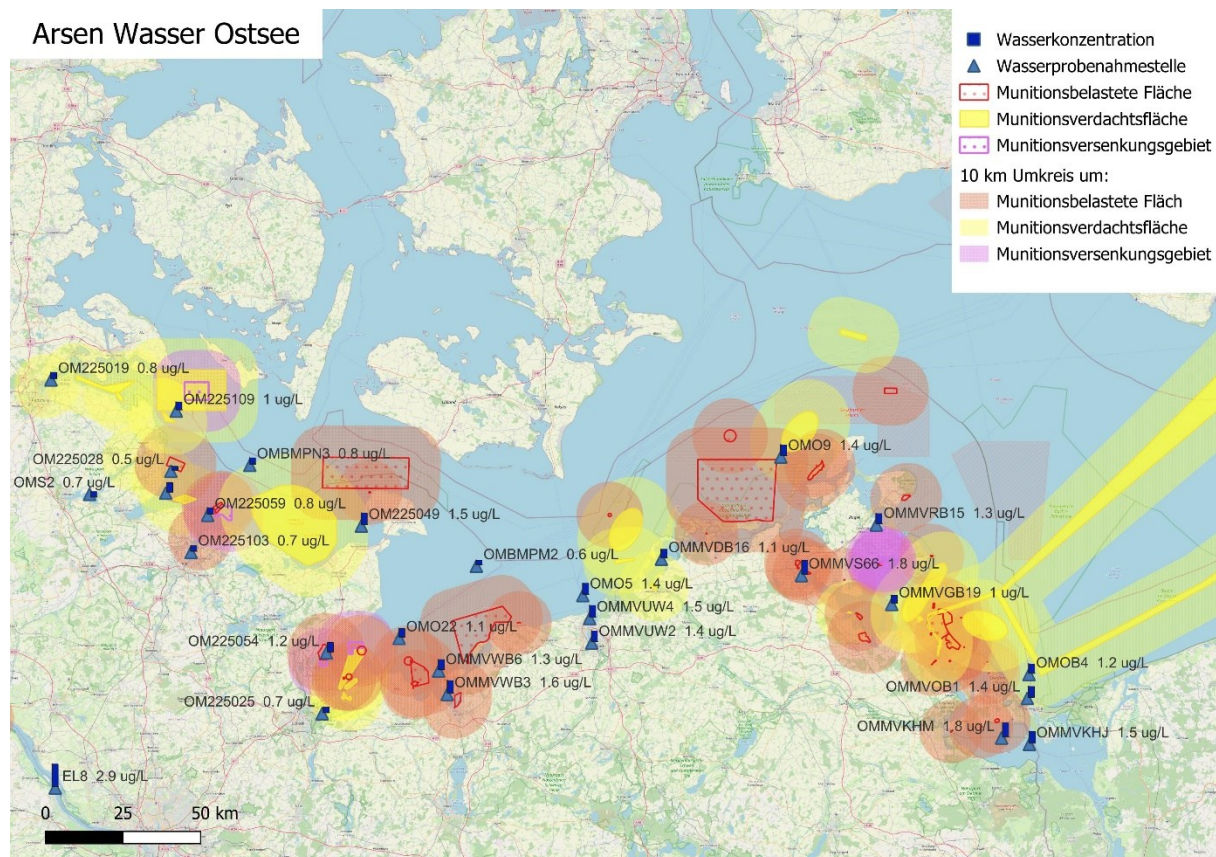


Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Arsen-Gehalte in Wasserproben der Ostsee

Aus der Meeresumweltdatenbank (MUDAB) wurden insgesamt 903 Messwerte von Arsen-Gehalten in Wasserproben aus der Ostsee der Jahre 2004 bis 2021 ausgewertet. Diese Daten wurden an 26 Messstationen genommen (Abb. 27). Die Werte liegen im Mittel bei maximal 1,8 µg/L. Auch die mittleren Konzentrationen in der Lübecker Bucht liegen trotz der verhältnismäßig hohen mittleren Arsenkonzentration im Sediment bei lediglich 0,7 und 1,2 µg/L (Abb. 27; Messstellen OM225054 und OM225025).

Abbildung 27: Grafische Darstellung der mittleren Arsenkonzentrationen in Wasserproben der MUDAB Messstationen in der Ostsee sowie ihre Lage zu Munitionsflächen

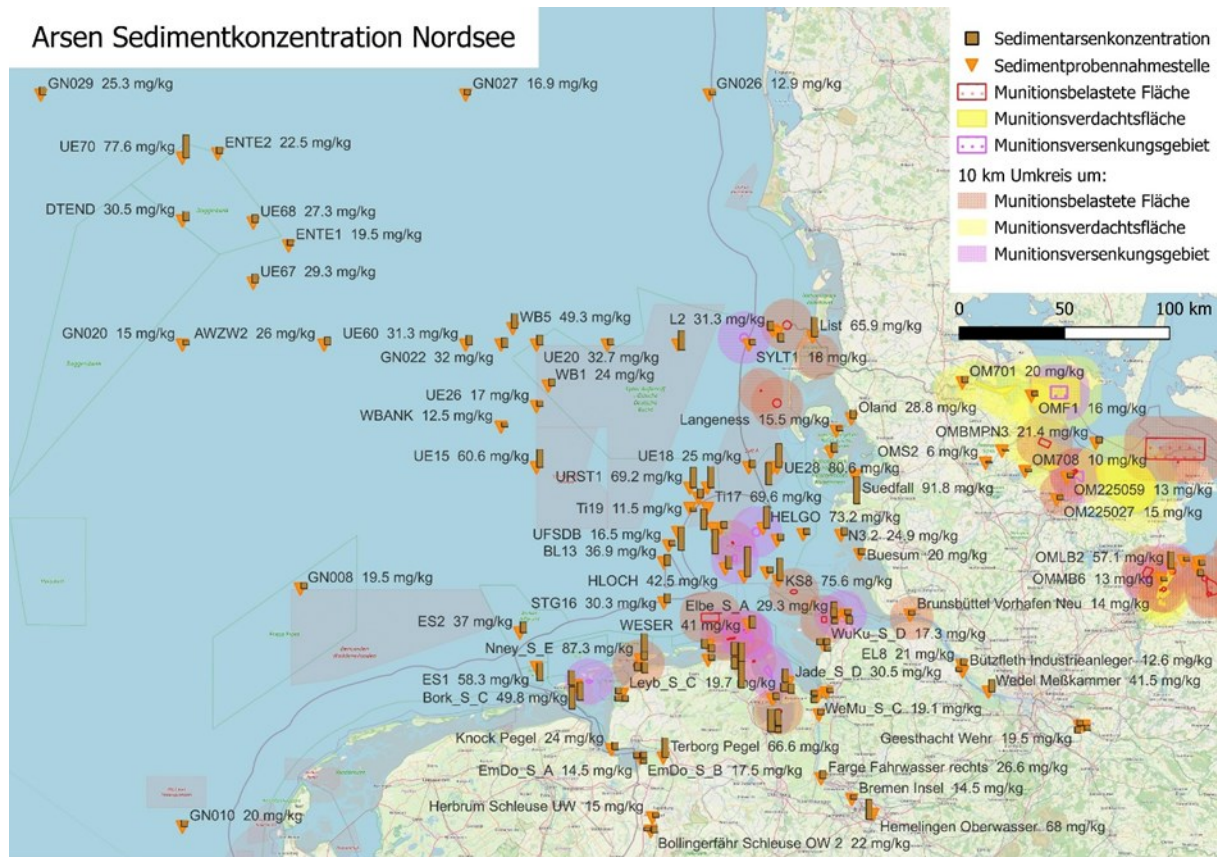


Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Arsen-Gehalte im Sediment der Nordsee

Aus der Meeresumweltdatenbank (MUDAB) wurden insgesamt 4395 Messwerte von Arsen-Gehalten in Sedimentproben der Nordsee der Jahre 2002 bis 2021 ausgewertet. Die Werte liegen Großteils im niedrigen bis mittleren zweistelligen Milligramm pro kg Sediment Bereich. Lediglich die mittleren Arsenkonzentrationen einzelner Stationen wie beispielsweise Suedfall (91,8 mg/kg) und UE28 (80,6 mg/kg) liegen über diesem Mittel, jedoch alle unterhalb dreistelliger Messkonzentrationen (Abb. 28). Auch liegen alle diese Stationen mit den höchsten mittleren Konzentrationen nicht in unmittelbarer Nähe von Munitionsflächen (Abb. 28).

Abbildung 28: Grafische Darstellung der mittleren Arsenkonzentrationen in Sedimentproben der MUDAB Messstationen in der Nordsee sowie ihre Lage zu Munitionsflächen

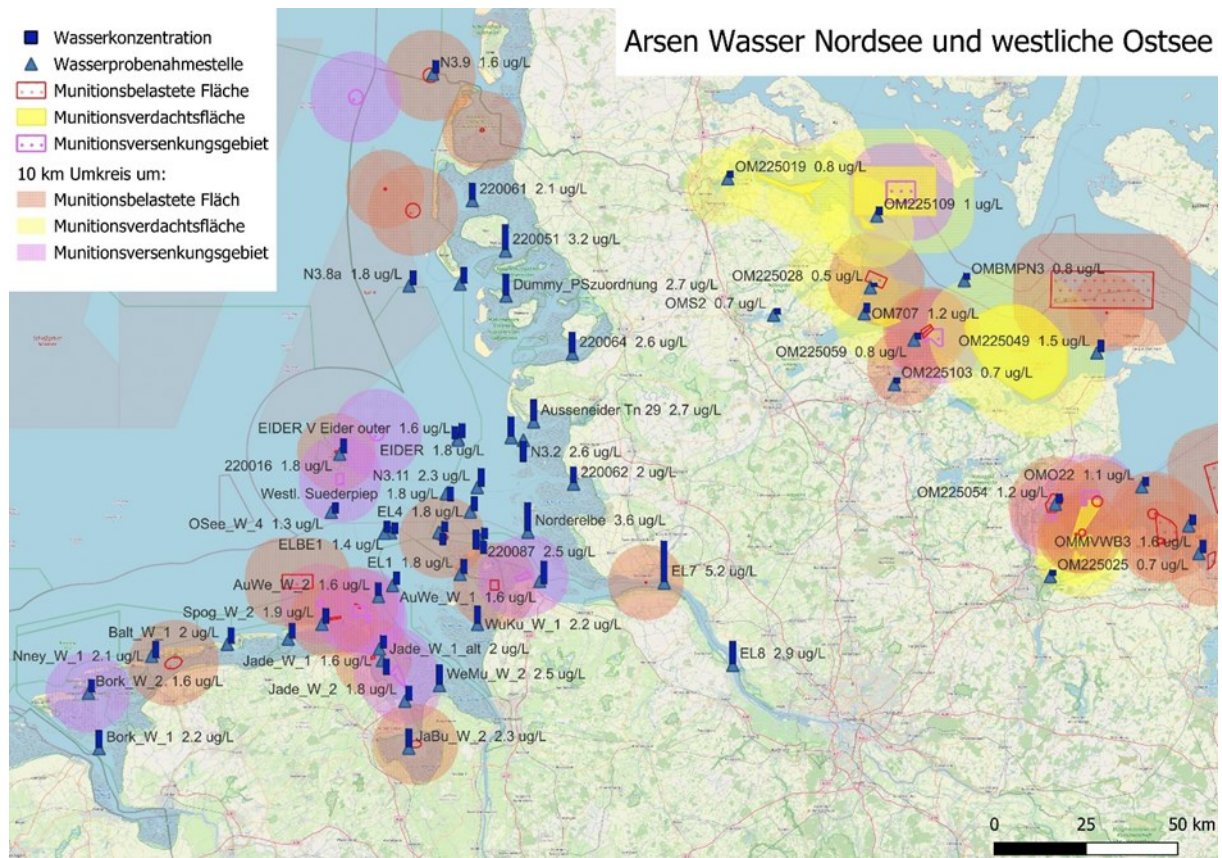


Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Arsen-Gehalte in Wasserproben der Nordsee

Aus der Meeresumweltdatenbank (MUDAB) wurden insgesamt 149 Messwerte von Arsen-Gehalten in Wasserproben der Nordsee der Jahre 2002 bis 2020 ausgewertet. Die ermittelten mittleren Arsenkonzentrationen an den Stationen liegen ausnahmslos im niedrigen einstelligen Mikrogramm ja Liter Bereich (Abb. 29).

Abbildung 29: Grafische Darstellung der mittleren Arsenkonzentrationen in Wasserproben der MUDAB Messstationen in der Nordsee und westlichen Ostsee sowie ihre Lage zu Munitionsflächen

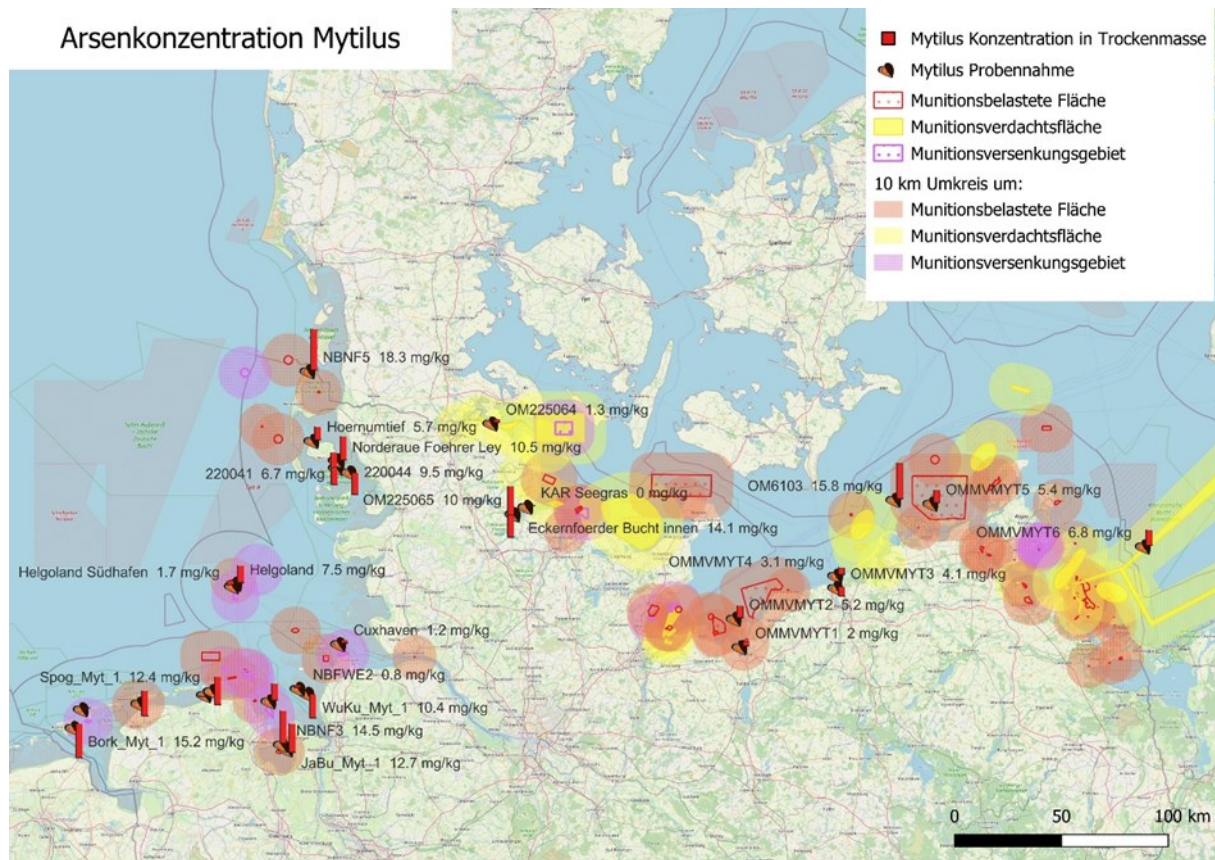


Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Arsen-Gehalte in Miesmuscheln der Nordsee und Ostsee

Aus der Meeresumweltdatenbank (MUDAB) wurden insgesamt 133 Messwerte von Arsen-Gehalten in Miesmuschelproben der Nordsee sowie aus der Ostsee (81 Messwerte) der Jahre 2002 bis 2021 ausgewertet. Diese Daten wurden an 10 Messstationen in der Ostsee und 15 in der Nordsee genommen (Abb. 30). Die ermittelten mittleren Arsenkonzentrationen an den Stationen liegen in den Bereichen der Nordsee zwischen 0,8 und 18,3 mg/kg und der Ostsee zwischen 0 und 15,8 mg/kg (Abb. 30).

Abbildung 30: Grafische Darstellung der mittleren Arsenkonzentrationen in Muschelproben der MUDAB Messstationen in der Nordsee und Ostsee sowie ihre Lage zu Munitionsflächen

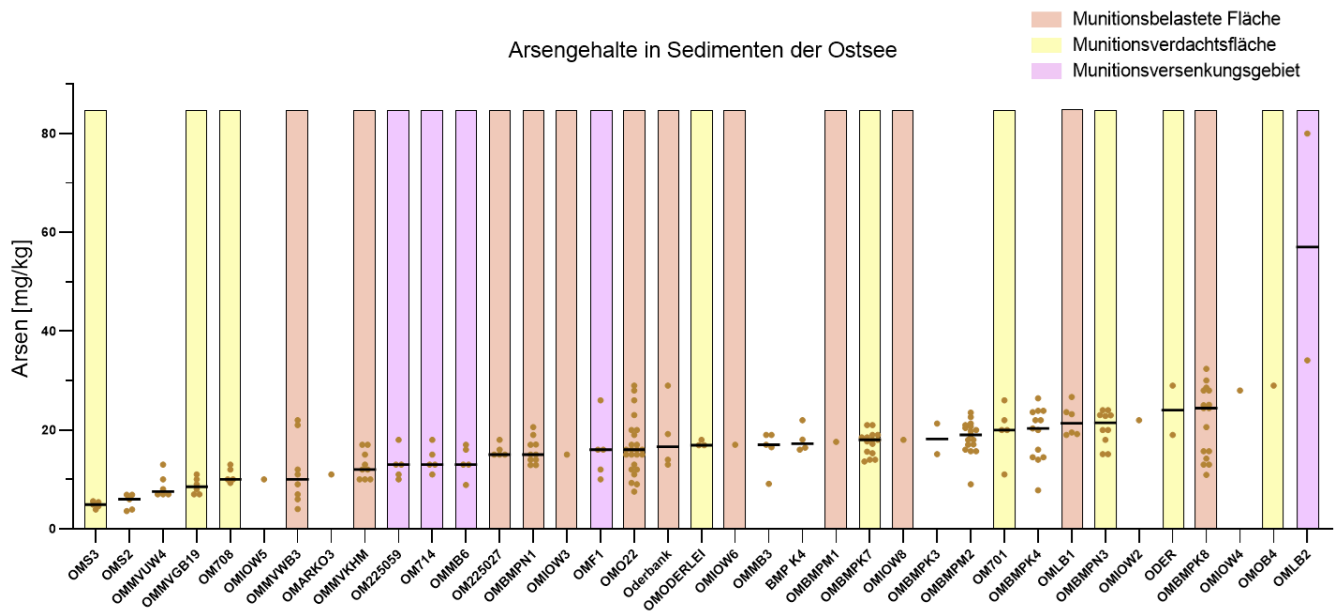


Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

5.2.3 Bewertung der Arsen-Gehalte in Sediment und Wasser von Nord- und Ostsee sowie Miesmuscheln in Bezug zu Munitionsflächen

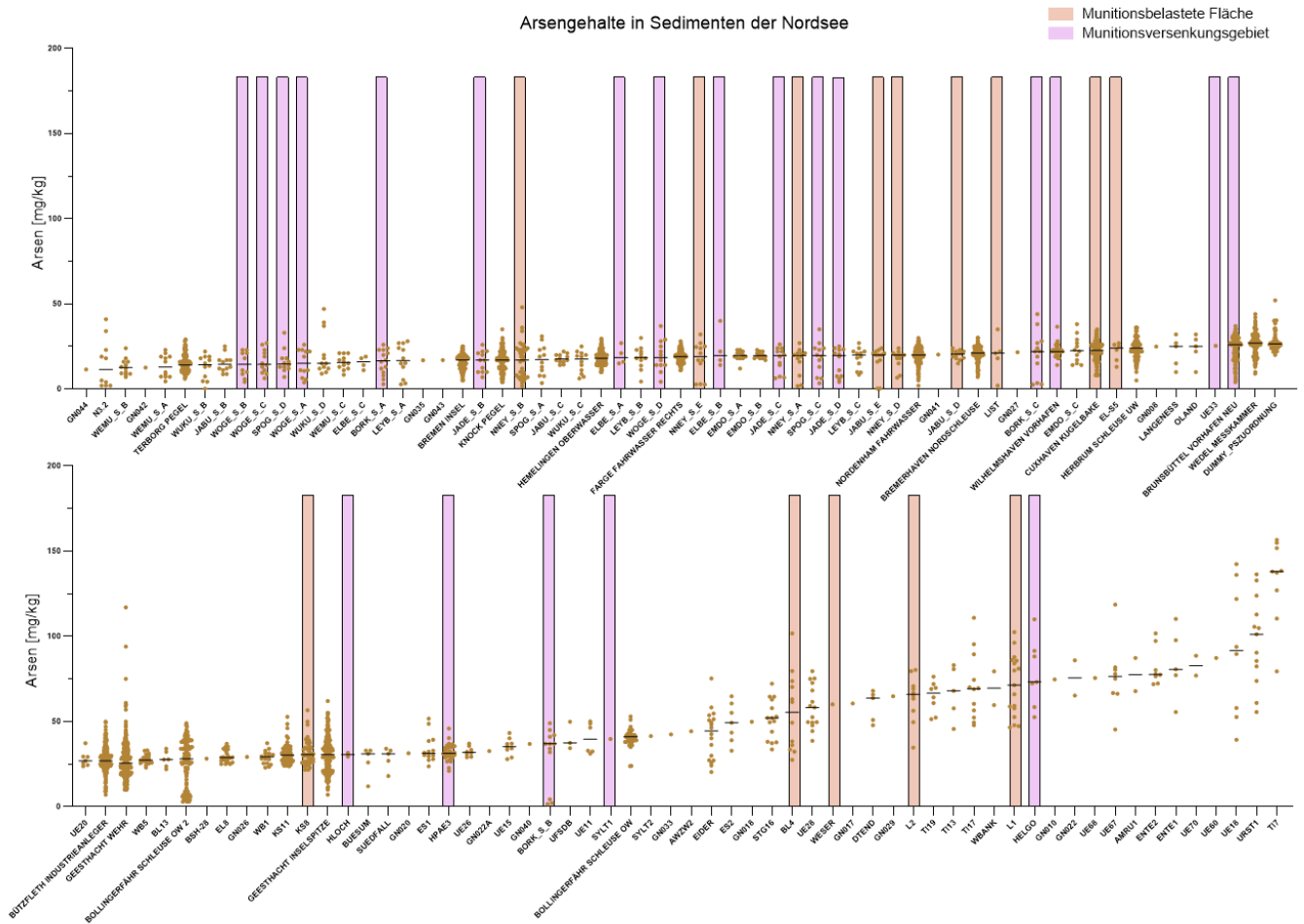
Die Diagramme in den Abbildungen 31 bis 34 zeigen keine Häufung hoher Medianwerte im Bereich <10 km zu mit Munition belasteten Flächen. Die in den Diagrammen dargestellten Balken sind nach aufsteigenden Arsenkonzentrationen geordnet. Dabei zeigen farbige Balken Munitionsflächen in einem 10-Km Radius zur Messstelle an. Messstellen ohne Munitionsvorkommen in einem Radius von zehn Kilometern sind ohne farbige Balken dargestellt. Wenn eine Korrelation zwischen Munitionsvorkommen und hohen Arsenkonzentrationen vorliegen würde, müssten die Stationen ohne Munitionsvorkommen in den Abbildungen jeweils links liegen, Munitionsverdachtsflächen und munitionsbelastete Flächen mittig und Probennahmegebiete im 10-km Radius von Munitionsversenkungsgebieten rechts (in Abbildung 32 abweichend von oben links gestaffelt nach unten rechts). Mit den Daten der MUDAB-Datenbank lässt sich somit keine Korrelation zwischen der Arsenkonzentration in den Umweltparametern Wasser, Sediment und Miesmuscheln in relativer Nähe zu Altmunition in Nord- und Ostsee feststellen. Trotz relativ großer Streuung ist erkennbar, dass die gefundenen Arsenkonzentrationen in der Nordsee im Vergleich zur Ostsee in allen untersuchten Fällen höher sind (Tabelle 20).

Abbildung 31: Gemessene Arsenkonzentrationen in den Sedimenten der verschiedenen Messstellen in der Ostsee sowie mögliche räumliche Nähe zu Munitionsflächen in einem Radius von 10 Kilometern



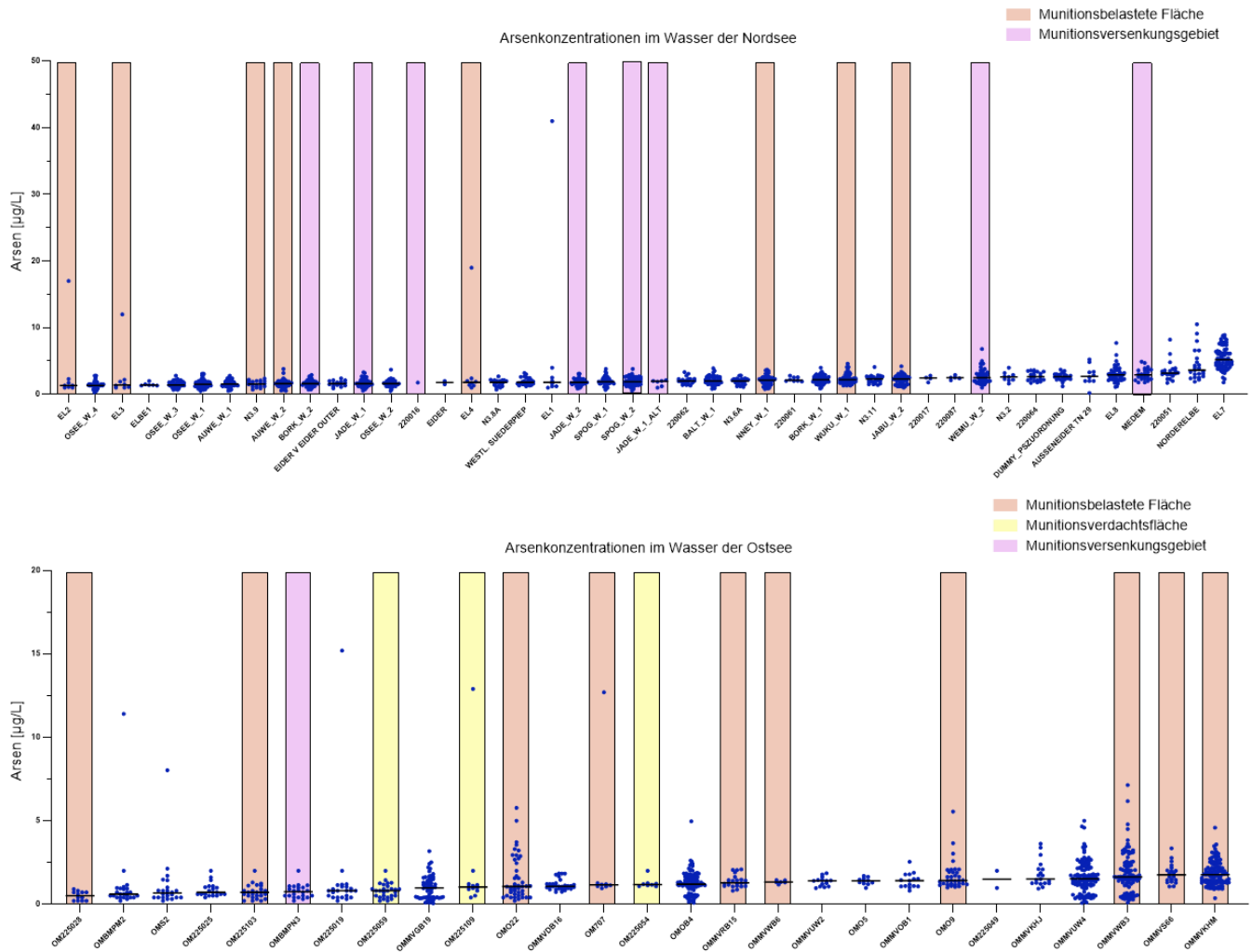
Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Abbildung 32: Gemessene Arsenkonzentrationen in den Sedimenten der verschiedenen Messstellen in der Nordsee sowie mögliche räumliche Nähe zu Munitionsflächen in einem Radius von 10 Kilometern



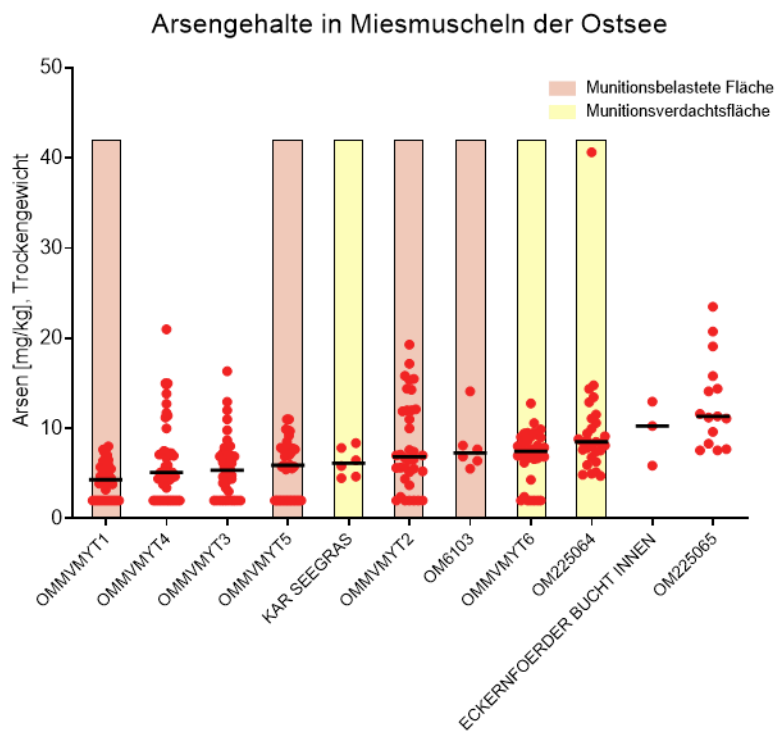
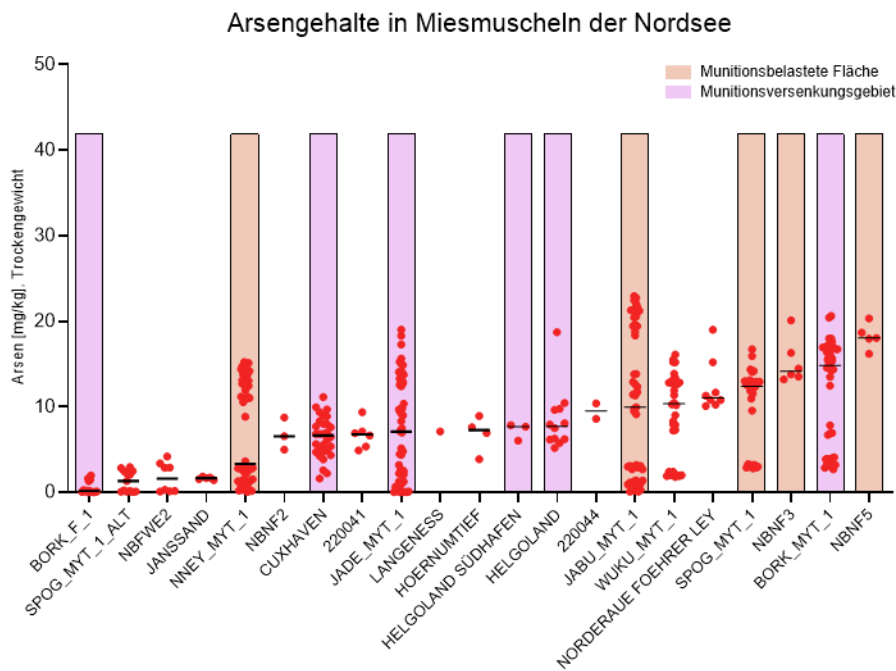
Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Abbildung 33: Gemessene Arsenkonzentrationen im Wasser der verschiedenen Messtellen in der Nord- und Ostsee sowie mögliche räumliche Nähe zu Munitionsflächen in einem Radius von 10 Kilometern



Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

Abbildung 34: Gemessene Arsenkonzentrationen in Miesmuscheln der verschiedenen Messstellen in der Nordsee (oben) und Ostsee (unten) sowie mögliche räumliche Nähe zu Munitionsflächen in einem Radius von 10 Kilometern



Quelle: eigene Darstellung Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler (UKSH, Campus Kiel)

5.2.4 Toxikologische Bewertung der Arsenbelastung

Für die Bewertung ist Arsen nach der Oberflächengewässer Verordnung (OGewV) ein flussgebietspezifischer Schadstoff nach Anlage 6. Arsenkonzentrationen werden damit gemessen, wenn signifikante Mengen in das Einzugsgebiet der für den Oberflächenwasserkörper repräsentativen Messstelle eingeleitet oder eingetragen werden. Mengen sind signifikant, wenn zu erwarten ist, dass die Hälfte der Umweltqualitätsnorm überschritten wird. Bewertet wird das Sediment/Schwebstoff mit der Umweltqualitätsnorm von 40 mg/kg. Für Wasser oder Biota sieht die OGewV keine UQN vor.

Entsprechend der Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) flussgebietspezifischen Stoffe wurde auch Arsen im Sediment bewertet; die UQN wurde für den betrachteten Zeitraum innerhalb einer Seemeile der Nordsee und der Ostsee nicht überschritten. Flussgebietspezifische Schadstoffe werden gemäß WRRL im Rahmen der Bewertung des Ökologischen Zustands bewertet. Diese Bewertung umfasst für die Küstengewässer eine nautische Meile.

Eine toxikologische Abschätzung zur theoretischen Arsenbelastung durch chemische Kampfstoffe muss berücksichtigen, dass die Ursache für eine mögliche Arsenbelastung neben den chemischen Kampfstoffen auch geogen freigesetztes Arsen sein kann sowie andere anthropogene Quellen.

Das einzige in der deutschen Nordsee bekannte Versenkungsgebiet für CWA befindet sich südlich von Helgoland. Die an den Messstellen südlich von Helgoland gefundenen Arsenkonzentrationen im Sediment liegen zum Teil in der Nähe der UQN von 40 mg/kg (Abb. 28). Nördlich von Helgoland wird die UQN in den Sedimentproben jedoch zum Teil deutlich überschritten, zum Beispiel an der Messstelle HELGO mit im Schnitt 73,2 mg/kg und Ti17 mit 69,6 mg/kg (Abb. 28), obwohl sich diese noch weiter vom CWA Versenkungsgebiet entfernt liegen als die Messstationen südlich von Helgoland. Des Weiteren muss auch vor allem berücksichtigt werden, dass auch südlich von Helgoland keine arsenhaltigen CWA verklappt wurden! Wie Knobloch et al. (2013) zu entnehmen ist, wurde südlich von Helgoland Tabun verklappt. Dies ist ein Nervenkampfstoff, der kein Arsen in seiner chemischen Struktur enthält.

Die Arsenkonzentrationen in der Ostsee sind alle ausnahmslos deutlich geringer als jene, die in der Nordsee gemessen wurden. Gleichwohl wurde in der Flensburger Förde das arsenhaltige Adamsit gefunden. In den Sedimentproben, die bei dem Adamsit-Fund genommen wurden, konnten 5,70 mg/kg (Trockengewicht) und 39,7 mg/kg (Trockengewicht) Adamsit nachgewiesen werden. Hier muss mitberücksichtigt werden, dass Adamsit eine arsenhaltige Verbindung ist mit nur einem Arsenatom in der Verbindung, so dass der tatsächliche Arsengehalt noch geringer als die gemessenen 5,7 und 39,7 mg/kg ist. Aber selbst bei einer Gleichsetzung der gemessenen Menge an Adamsit mit dem Arsengehalt, würde auch in diesem Fall die UQN von 40 mg/kg nicht überschritten werden. Auch die in der Flensburger Förde oder in der Nähe gelegenen Messstationen OM701 und OMF1 weisen durchschnittlich lediglich 20 bzw. 16 mg/kg Arsen im Sediment auf (Abb. 26), was ebenfalls deutlich unterhalb der UQN liegt.

Aktuell berät sich der EU-Sachverständigenausschuss „Industrie- und Umweltkontaminanten in Lebensmitteln“ über Höchstgehalte von anorganischem Arsen in Fisch und Meeresfrüchten (Stand Dezember 2023).

Der Nasen- und Rachen-Reizstoff Adamsit ist so gut wie unlöslich in Wasser und kann nicht ohne Weiteres aus Munition freigesetzt werden. Es wurde nicht als reine Substanz in Munition verfüllt, sondern wurde z.B. mit Nitrocellulose vermischt, um daraus sog. A-Pulver herzustellen. Das waren kleine Nitrocellulose-Plättchen, die normalerweise in Blech- oder Bleibüchsen in Granaten eingesetzt wurden. Es gab auch Bomben, die mit A-Pulver gefüllt waren (Wichert,

2023). Aus diesem Grund ist es als sehr unwahrscheinlich anzusehen, dass sich so große Mengen an Adamsit gleichzeitig in Wasser lösen und Arsenkonzentrationen hervorrufen, die für die marine Ökosphäre als bedenklich einzustufen sind. Loses Adamsit wurde in (Holz-)Fässern gelagert und transportiert (Wichert, 2023). Aus diesen kann es dann austreten, wenn sie zerstört werden. Allerdings hat Adamsit keinen Dampfdruck, die Flüchtigkeit ist in etwa so hoch wie der von Granit. Adamsit muss deshalb als Staub oder Aerosol zur Anwendung gebracht werden, typischerweise durch verschwelen der Nitrocellulose-Gemische. Dann ist es außerordentlich effektiv bei der Aufnahme über die Atemwege und kann vor allem auf diesem Wege dem Menschen gefährlich werden. Bei Berührung kann es zu leichten Hautreizungen in Form von Rötungen führen.

Wie bereits unter 5.1.4 aufgeführt wurde Adamsit in Bezug auf die Ökotoxizität als sehr toxisch eingestuft (Czub et al., 2021). Die LC_{50} wird mit 55,6 und 74,3 $\mu\text{g/L}$ angegeben, die EC_{50} mit 44,4 und 71,5 $\mu\text{g/L}$ (Czub et al., 2021). Bis dato liegen jedoch nahezu keine weiteren Studien vor, die die ökotoxikologischen Auswirkungen von Adamsit untersuchen. Höher et al. (2019) haben für Miesmuscheln (*Mytilus trossulus*) durch Adamsit ausgelöste negative gesundheitliche Effekte bei Konzentrationen ab 2,5 bis 10 $\mu\text{g/L}$ in einem 96-Stunden Laborexperiment beobachten können.

Mit den Daten der MUDAB-Datenbank lässt sich somit keine Korrelation zwischen der Arsenkonzentration in den Umweltmedien Wasser, Sediment und Miesmuscheln und der relativen Nähe zu Altmunition in Nord- und Ostsee feststellen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Munition in den Meeren von Nord- und Ostsee stellt ein Problem für die marine Ökosphäre da. Die Korrosion der Metallhüllen schreitet immer weiter voran, so dass davon ausgegangen werden muss, dass auch die Freisetzung toxischer Chemikalien wie Explosivstoffe und Chemische Kampfstoffe in Zukunft zunehmen wird. Diese können sich in der Meeresumwelt (Sediment und Wasser) verbreiten, von Fischen und anderen marinen Lebewesen aufgenommen werden und durch Anreicherung in der marinen Nahrungskette langfristig auch zu einem Problem für den Menschen als Konsumenten von Fisch und Meeresfrüchten werden.

Die in diesem Bericht vorgestellten Ergebnisse des Forschungs- und Entwicklungsprojekts „Trends und Daten zur Verbreitung von Munitionsresten in der Meeresumwelt“ (TATTOO) liefern wichtige Erkenntnisse zur Beurteilung der Verbreitung von STV und CWA in der Meeresumwelt. Zusätzlich wurden wichtige humantoxikologische und im Besonderen ökotoxikologische Aspekte der am meisten in der marinen Umwelt vorkommenden STV und CWA dargestellt sowie Empfehlungen für Monitoringstrategien aufgezeigt.

Die Ergebnisse des Projekts wurden in zwei Begleitkreissitzungen (10. Mai 2022 und 21. November 2023) vorgestellt und diskutiert. Das Feedback der Expertinnen und Experten wurde ebenfalls bei der Erstellung dieses Berichts berücksichtigt.

Zusammenfassend lassen sich aus den Ergebnissen folgende Erkenntnisse ableiten:

- ▶ STV treten seit Beginn des neuen Jahrtausends zunehmend aus Altmunition aus, so dass sich Spuren von TNT-Metaboliten auch in Biota (hier konkret Miesmuscheln) finden lassen, die nicht unmittelbar in der Nähe von Altmunition exponiert wurden (Ergebnisse aus Arbeitspaket 1).
- ▶ TNT und Metabolite lassen sich außerdem in Sedimentproben nachweisen, die ebenfalls nicht direkt in der Nähe von im Meer liegender Munition genommen wurden (hier konkret Sediment aus Niedersachsen). Zudem konnten STV in Plattfischen in Muskelgewebe und Galle eindeutig detektiert werden, die ebenfalls aus Niedersachsen stammen (Arbeitspaket 2).
- ▶ In Arbeitspaket 3 wurden erste Betrachtungen zur Verteilung von STV im Nahrungsnetz vorgenommen. Obwohl in den Plattfischen aus Niedersachsen STV gemessen wurden, konnten in den untersuchten Proben der Top-Prädatoren Eiderenten aus Dänemark und marinen Säugern aus Schleswig -Holstein bisher keine STV nachgewiesen werden. Dies kann an den räumlich unterschiedlichen Gebieten oder an einem geringen Bioakkumulationspotential liegen.
- ▶ Auch die Substanzgruppen der CWA können auf die marine Ökosphäre negative Auswirkungen haben. In den untersuchten Verdachtsproben, die in der Nähe des Bornholmbeckens genommen wurden, konnten jedoch keine CWA nachgewiesen werden. In zwei Sedimentproben aus der Flensburger Förde wurde allerdings Adamsit nachgewiesen. Betrachtet man die Arsenkonzentrationen in der deutschen Nord- und Ostsee insgesamt (MUDAB-Datenbank), so zeigt sich, dass die Arsenbelastung nicht aus Altmunition zu stammen scheint (Arbeitspaket 4).

Es lassen sich aus den Ergebnissen folgende Empfehlungen ableiten:

- ▶ Die Zeitreihen der UPB sollten weiterhin jährlich auf STV untersucht werden. Da die Untersuchungen von Eiderenten und marinen Säugern bisher nur äußerst stichpunktartig erfolgten, sollten auch zukünftig weitere Probennahmen bei diesen Spezies durchgeführt werden. Es muss hier engmaschig kontrolliert werden, ob STV nicht eventuell doch langfristig in der trophischen Reihe an Top-Prädatoren, und letzten Endes auch an den Menschen als Konsument von Fisch und Meeresfrüchten, weitergegeben werden.
- ▶ Die in diesem Projekt erhaltenen Erkenntnisse sollen unter anderem im Monitoring der Pilotbergung Anwendung finden. Des Weiteren empfehlen wir STV in die Routinemonitoringprogramme der Länder zu integrieren. Eine umfassende Monitoringstrategie würde im Idealfall das Untersuchen von Wasser- und Sedimentproben sowie Miesmuscheln und standorttreuen, bodennahen Fische wie Plattfische (Galle und Filet) umfassen. Als Indikator für arsenhaltige chemische Kampfstoffe könnte punktuell auf Triphenylarsensäure untersucht werden. Zudem sollten Muscheln für eine aussagekräftige Analytik nach Entnahme nicht gehältert werden.
- ▶ Es besteht bezüglich möglicher toxischer Auswirkungen von STV und CWA auf die marine Umwelt, das Nahrungsnetz sowie der menschlichen Gesundheit weiterhin dringender Forschungsbedarf, um eine verlässliche Datenlage bezüglich toxikologischer Risikobewertungen zu schaffen sowie dringend benötigte Grenzwerte und verlässliche Umweltqualitätsnormen etablieren zu können. Nur so ist eine langfristige Bewertung der Schadstoffeinträge durch Munition im Meer möglich.

7 Danksagung

Wir möchten uns an dieser Stelle sehr herzlich bei allen beteiligten Institutionen bedanken, die uns das für die Untersuchungen benötigte Probenmaterial sowie umfassendes Begleitmaterial, zum Beispiel in Form von Fotos, zur Verfügung gestellt haben:

Danken möchten wir dem Niedersächsischen Landesbetrieb für Wasserwirtschaft, Küsten- und Naturschutz (NLWKN) und hier im besonderen Maßen Kerstin Kolbe und Vanessa Beilke für ihre großartige Unterstützung. Auch danken wir Stephan Schmale vom Institut Dr. Nowak GmbH & Co. KG in Ottersberg für die Überlassung von Plattfischen aus dem Jahr 2019 und auch insbesondere dafür, dass diese zum Teil direkt vor Ort in Ottersberg durch zwei Mitarbeitende der Toxikologie unter Anleitung aufgearbeitet werden konnten. Herrn Gunnar Stigge vom Institut für Angewandte Ökosystemforschung GmbH (IfaÖ) möchten wir ebenfalls sehr herzlich für die perfekte Organisation und Kommunikation bezüglich der Probennahme in Mecklenburg-Vorpommern danken. Ebenso danken wir Hannah Lutterbeck vom Landesamt für Umwelt, Schleswig-Holstein (LfU). Dr. Diana Teuber von der Universität Trier (Biogeographie – Umweltprobenbank) danken wir sehr herzlich für die freundliche Bereitstellung der Gallenblasen aus Aalmuttern aus der im Sommer 2021 durchgeführten Probennahme. Dr. Jan Koschorreck und Dr. Heinz Rüdell möchten wir herzlich für die Bereitstellung der Proben der Umweltprobenbank des Bundes danken. Dr. Luca Schick und Prof. h.c. Dr. Ursula Siebert danken wir sehr für die Zusammenarbeit bezüglich der marinen Säuger und Eiderenten. Die Proben in Arbeitspaket 4 wurden freundlicherweise von Greenpeace zur Verfügung gestellt und wir möchten hierzu stellvertretend Björn Jettka für die Zusammenarbeit danken sowie Alexander Bach (MEKUN) für die Möglichkeit der Untersuchung der Verdachtsproben aus der Flensburger Förde, ebenfalls für das Arbeitspaket 4.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an KptLt a.D. Uwe Wichert für seine umfassenden Recherchen und fundierten Beratungen und Einschätzungen.

Für die kritische Durchsicht des Berichts danken wir Dr. Anita Künitzer (UBA), Thea Behrends und Stefan Tyedmers (NLWKN), Hannah Lutterbeck (LfU), Alexander Bach und Antje Kress (MEKUN) sowie Ulrike Pirntke (UBA).

Des Weiteren möchten wir an dieser Stelle einigen unserer Institutsangehörigen sowie Ehemaligen und Studierenden für die tatkräftige Unterstützung danken: Dr. Hans-Jörg Martin, Maren Gundlach, Jacqueline Lindemeyer, Lars Scheer, Ann Christin Hollmann, Tom Böttcher sowie Kristina Andrea Thiemann.

8 Quellenverzeichnis

- Akhavan, J., 2018. Explosives and Propellants, in: John Wiley & Sons Inc (Ed.), Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 1–32.
<https://doi.org/10.1002/0471238961.0524161212091404.a01.pub3>
- Altmann, J. (Ed.), 2007. Naturwissenschaft - Rüstung - Frieden: Basiswissen für die Friedensforschung, 1. Aufl. ed, Friedens- und Konfliktforschung. VS, Verl. für Sozialwissenschaften, Wiesbaden.
- Appel, D., Strehse, J.S., Martin, H.-J., Maser, E., 2018. Bioaccumulation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and its metabolites leaking from corroded munition in transplanted blue mussels (*M. edulis*). *Mar. Pollut. Bull.* 135, 1072–1078. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.08.028>
- Ballentine, M., Tobias, C., Vlahos, P., Smith, R., Cooper, C., 2015. Bioconcentration of TNT and RDX in Coastal Marine Biota. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 718–728. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0104-9>
- Baršienė, J., Butrimavičienė, L., Grygiel, W., Lang, T., Michailovas, A., Jackūnas, T., 2014. Environmental genotoxicity and cytotoxicity in flounder (*Platichthys flesus*), herring (*Clupea harengus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*) from chemical munitions dumping zones in the southern Baltic Sea. *Mar. Environ. Res.* 96, 56–67.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.08.012>
- Beck, A.J., Gledhill, M., Kampmeier, M., Feng, C., Schlosser, C., Greinert, J., Achterberg, E.P., 2022. Explosives compounds from sea-dumped relic munitions accumulate in marine biota. *Sci. Total Environ.* 806, 151266.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151266>
- Beck, A.J., Gledhill, M., Schlosser, C., Stamer, B., Böttcher, C., Sternheim, J., Greinert, J., Achterberg, E.P., 2018. Spread, Behavior, and Ecosystem Consequences of Conventional Munitions Compounds in Coastal Marine Waters. *Front. Mar. Sci.* 5, 141. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00141>
- Beck, A.J., van der Lee, E.M., Eggert, A., Stamer, B., Gledhill, M., Schlosser, C., Achterberg, E.P., 2019. In Situ Measurements of Explosive Compound Dissolution Fluxes from Exposed Munition Material in the Baltic Sea. *Environ. Sci. Technol.* 53, 5652–5660. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06974>
- Beddington, J., Kinloch, A.J., 2005. Munitions Dumped at Sea: A Literature Review. London, UK: Imperial College Consultants.
- Bełdowski, J., Szubska, M., Emelyanov, E., Garnaga, G., Drzewińska, A., Bełdowska, M., Vanninen, P., Östin, A., Fabisiak, J., 2016. Arsenic concentrations in Baltic Sea sediments close to chemical munitions dumpsites. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 128, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.03.001>
- BLANO, 2023. Gemeldete Munitionsfunde 2019 und 2020, BLANO-Expertenkreis Munition im Meer, Entwurf des Jahresberichts 2019/2020. Kiel.
- Bolt, H.M., Degen, G.H., Dorn, S.B., Plöttner, S., Harth, V., 2006. Genotoxicity and Potential Carcinogenicity of 2,4,6-Trinitrotoluene: Structural and Toxicological Considerations. *Rev. Environ. Health* 21, 217–228.
<https://doi.org/10.1515/REVEH.2006.21.4.217>
- Böttcher, C., Knobloch, T., Rühl, N.-P., Sternheim, J., Wichert, U., Wöhler, J., 2011. Munitionsbelastung der Deutschen Meeresgewässer- Bestandsaufnahme und Empfehlungen (Stand 2011).
- Böttcher, C., Knobloch, T., Sternheim, J., Weinberg, I., Wöhler, J., 2014. Munitionsbelastung der Deutschen Meeresgewässer - Entwicklung und Fortschritt (Jahr 2014). Für den Bund/Länder-Ausschuss Nord- und Ostsee (BLANO): Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein, Kiel.
- Bundesgesundheitsblatt, 2003. Stoffmonographie Arsen - Referenzwert für Urin. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 46, 1098–1106. <https://doi.org/10.1007/s00103-003-0710-6>

- Bünning, T., Strehse, J., Hollmann, A., Bötticher, T., Maser, E., 2021. A Toolbox for the Determination of Nitroaromatic Explosives in Marine Water, Sediment, and Biota Samples on Femtogram Levels by GC-MS/MS. *Toxics* 9, 60. <https://doi.org/10.3390/toxics9030060>
- Carton, G., Jagusiewicz, A., 2011. Historic disposal of munitions in U.S. and European Coastal Waters, how historic information can be used in characterizing and managing risk. *Mar Technol Soc J* 43, 16–32.
- Czub, M., Nawala, J., Popiel, S., Brzeziński, T., Maszczyk, P., Sanderson, H., Maser, E., Gordon, D., Dziedzic, D., Dawidziuk, B., Pijanowska, J., Fabisiak, J., Szubska, M., Lang, T., Vanninen, P., Niemikoski, H., Missiaen, T., Lehtonen, K.K., Bełdowski, J., Kotwicki, L., 2021. Acute aquatic toxicity of arsenic-based chemical warfare agents to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 230, 105693. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105693>
- Czub, M., Nawala, J., Popiel, S., Dziedzic, D., Brzeziński, T., Maszczyk, P., Sanderson, H., Fabisiak, J., Bełdowski, J., Kotwicki, L., 2020. Acute aquatic toxicity of sulfur mustard and its degradation products to *Daphnia magna*. *Mar. Environ. Res.* 161, 105077. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105077>
- Ek, H., Dave, G., Nilsson, E., Sturve, J., Birgersson, G., 2006. Fate and Effects of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) from Dumped Ammunition in a Field Study with Fish and Invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 244–252. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0117-5>
- Ek, H., Dave, G., Sturve, J., Almroth, B.C., Stephensen, E., Förlin, L., Birgersson, G., 2005. Tentative biomarkers for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in fish (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 72, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.01.001>
- Ek, H., Nilsson, E., Birgersson, G., Dave, G., 2007. TNT leakage through sediment to water and toxicity to *Nitocra spinipes*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.10.011>
- Ek, H., Nilsson, E., Dave, G., 2008. Effects of TNT leakage from dumped ammunition on fish and invertebrates in static brackish water systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.12.016>
- Esposito, M., Beck, A.J., Martinez-Cabanas, M., Gledhill, M., Achterberg, E.P., 2023. Rapid, At-Sea Detection of Munition Compounds in Coastal Waters Using a Shipboard System. *ACS EST Water* 3, 2890–2898. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.3c00096>
- FIZ, 2017. Fisch-Informationszentrum e.V. Germany. www.fischinfo.de accessed on June 22 2023.
- Franke, S. (Hrsg.), 1976. Lehrbuch der Militärchemie, Band 1 Entwicklung der chemischen Kampfstoffe, Chemie der Kampfstoffe, Berlin(-Ost), Militärverlag der DDR.
- Frey, T., 2024. A New Risk Assessment Model for Unexploded underwater Military Munitions. Dissertation. Leipzig University. Leipzig.
- Glasby, G., 1997. Disposal of chemical weapons in the Baltic Sea. *Sci. Total Environ.* 206, 267–273. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(97\)80015-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)80015-0)
- Gledhill, M., Beck, A.J., Stamer, B., Schlosser, C., Achterberg, E.P., 2019. Quantification of munition compounds in the marine environment by solid phase extraction – ultra high performance liquid chromatography with detection by electrospray ionisation – mass spectrometry. *Talanta* 200, 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.050>
- Guillemette, M., Ydenberg, R.C., Himmelman, J.H., 1992. The Role of Energy Intake Rate in Prey and Habitat Selection of Common Eiders *Somateria mollissima* in Winter: A Risk-Sensitive Interpretation. *J. Anim. Ecol.* 61, 599. <https://doi.org/10.2307/5615>
- Haas, R., Krippendorf, A., Schmidt, T.C., Steinbach, K., V. Löw, E., 1998. Chemisch-analytische Untersuchung von Arsenkampfstoffen und ihren Metaboliten. *Umweltwissenschaften Schadst.-Forsch.* 10, 289–293. <https://doi.org/10.1007/BF03037773>

- Höher, N., Turja, R., Brenner, M., Nyholm, J.R., Östin, A., Leffler, P., Butrimavičienė, L., Baršienė, J., Halme, M., Karjalainen, M., Niemikoski, H., Vanninen, P., Broeg, K., Lehtonen, K.K., Berglind, R., 2019. Toxic effects of chemical warfare agent mixtures on the mussel *Mytilus trossulus* in the Baltic Sea: A laboratory exposure study. *Mar. Environ. Res.* 145, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.02.001>
- Inouye, L., Lachance, B., Gong, P., 2009. Genotoxicity of explosives, in: *Ecotoxicology of Explosives*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 177–210.
- Juhasz, A.L., Naidu, R., 2007. Explosives: Fate, Dynamics, and Ecological Impact in Terrestrial and Marine Environments, in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, New York, NY, pp. 163–215. https://doi.org/10.1007/978-0-387-69163-3_6
- Kalderis, D., Juhasz, A.L., Boopathy, R., Comfort, S., 2011. Soils contaminated with explosives: Environmental fate and evaluation of state-of-the-art remediation processes (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 83, 1407–1484. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-01-05>
- Knobloch, T., Beldowski, J., Böttcher, C., Söderström, M., Rühl, N.-P., Sternheim, J., 2013. Chemical munitions dumped in the Baltic Sea. Report of the ad hoc expert group to update and review the existing information on dumped chemical munitions in the Baltic Sea (HELCOM MUNI). *Baltic Sea environment proceeding (BSEP) no.* 142.
- Koch, M., 2010. Subaquatische Kampfmittelaltlasten in der Ostsee: Neubewertung des Status Quo, Risikopotenziale und resultierende Handlungsszenarien; Dissertation,.
- Koschinski, S., Kock, K.H., 2009. Underwater unexploded ordnance—methods for a cetacean-friendly removal of explosives as alternatives to blasting, *Reports Int. Whal. Comm.* SC/61.
- Koske, D., Goldenstein, N.I., Kammann, U., 2019. Nitroaromatic compounds damage the DNA of zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 217, 105345. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105345>
- Koske, D., Straumer, K., Goldenstein, N.I., Hanel, R., Lang, T., Kammann, U., 2020. First evidence of explosives and their degradation products in dab (*Limanda limanda* L.) from a munition dumpsite in the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 155, 111131. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111131>
- Lan, C.-H., Lin, T.-S., Peng, C.-Y., 2005. Aquatic toxicity of nitrogen mustard to *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna*, and *Pimephales promelas*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.12.009>
- Lotufo, G.R., Belden, J.B., Fisher, J.C., Chen, S.-F., Mowery, R.A., Chambliss, C.K., Rosen, G., 2016. Accumulation and depuration of trinitrotoluene and related extractable and nonextractable (bound) residues in marine fish and mussels. *Environ. Pollut.* 210, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.049>
- Lotufo, G.R., Blackburn, W., Marlborough, S.J., Fleeger, J.W., 2010a. Toxicity and bioaccumulation of TNT in marine fish in sediment exposures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1720–1727. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.02.009>
- Lotufo, G.R., Blackburn, W.M., Gibson, A.B., 2010b. Toxicity of trinitrotoluene to sheepshead minnows in water exposures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 718–726. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.02.007>
- Lotufo, G.R., Chappell, M.A., Price, C.L., Ballentine, M.L., Fuentes, A.A., Bridges, T.S., George, R.D., Glisch, E.J., Carton, G., 2017. Review and Synthesis of Evidence Regarding Environmental Risks Posed by Munitions Constituents (MC) in Aquatic Systems (No. ERDC/EL TR-17-17).
- Lotufo, G.R., Rosen, G., Carton, G., 2021. SERDP and ESTCP Workshop on State of the Science and Research and Development Needs for Assessing the Environmental Risk of Conventional Underwater Military Munitions SERDP Project ER-2341. Washington, DC.

- Lotufo, G.R., Rosen, G., Wild, W., Carton, G., 2013. Summary of review of the aquatic toxicology of munitions constituents. In: Technical Report ERDC/EL TR-13-8. Vicksburg, MS. U.S. Army Engineer Research and Development Center.
- Lutterbeck, H., 2023. persönliche Kommunikation mit Hannah Lutterbeck, Landesamt für Umwelt des Landes Schleswig-Holstein, Dezember 2023. Kiel.
- Mariussen, E., Stornes, S.M., Bøifot, K.O., Rosseland, B.O., Salbu, B., Heier, L.S., 2018. Uptake and effects of 2, 4, 6 - trinitrotoluene (TNT) in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.* 194, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.016>
- Maser, E., Andresen, K.J., Bünning, T.H., Clausen, O.R., Wichert, U., Strehse, J.S., 2023a. Ecotoxicological Risk of World War Relic Munitions in the Sea after Low- and High-Order Blast-in-Place Operations. *Environ. Sci. Technol.* *acs.est.3c04873*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c04873>
- Maser, E., Bünning, T.H., Brenner, M., Van Haelst, S., De Rijcke, M., Müller, P., Wichert, U., Strehse, J.S., 2023b. Warship wrecks and their munition cargos as a threat to the marine environment and humans: The V 1302 “JOHN MAHN” from World War II. *Sci. Total Environ.* 857, 159324. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159324>
- Maser, E., Strehse, J.S., 2021. Can seafood from marine sites of dumped World War relicts be eaten? *Arch. Toxicol.* 95, 2255–2261. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03045-9>
- Maser, E., Strehse, J.S., 2020. “Don’t Blast”: blast-in-place (BiP) operations of dumped World War munitions in the oceans significantly increase hazards to the environment and the human seafood consumer. *Arch. Toxicol.* <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02743-0>
- Monfils, R., Gilbert, T., Nawadra, S., 2006. Sunken WWII shipwrecks of the Pacific and East Asia: The need for regional collaboration to address the potential marine pollution threat. *Ocean Coast. Manag.* 49, 779–788. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2006.06.011>
- NATO, 2010. Environmental impact of munition and propellant disposal final report of RTO Task Group ATV-115 = Impact environnemental de l’élimination des munitions et des combustibles. NATO Research and Technology Organisation, Neuilly-sur-Seine.
- Nawała, J., Szala, M., Dziedzic, D., Gordon, D., Dawidziuk, B., Fabisiak, J., Popiel, S., 2020. Analysis of samples of explosives excavated from the Baltic Sea floor. *Sci. Total Environ.* 708, 135198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135198>
- Neffe, S., Bełdowski, J., Fabisiak, J., Kasperek, T., Popiel, S., 2011. Report concerning the issues included in Decisions no. 23 and 24, made at the 1st Meeting of the Expert Group concerning updating and reviewing available information on chemical weapons dumped in the Baltic Sea “HELCOM MUNI 1/2010. In: HELCOM. Chief Inspectorate of Environmental Protection, Warsaw.
- Nehring, S., 2008. Kriegsaltslasten im Meer-Aus den Augen aus dem Sinn *WirtschaftBild Spezial* 2008, 40–44.
- Nehring, S., 2005. Rüstungsaltslasten in den deutschen Küstengewässern - Handlungsempfehlungen zur erfolgreichen Umsetzung der Europäischen-Wasserrahmenrichtlinie. *Rostocker Meeresbiologische Beiträge* 14: 109-123.
- Niemikoski, H., Söderström, M., Vanninen, P., 2017. Detection of Chemical Warfare Agent-Related Phenylarsenic Compounds in Marine Biota Samples by LC-HESI/MS/MS. *Anal. Chem.* 89, 11129–11134. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03429>
- Nipper, M., Carr, R.S., Biedenbach, J.M., Hooten, R.L., Miller, K., 2002. Toxicological and chemical assessment of ordnance compounds in marine sediments and porewaters. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 789–806. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00063-2)

- Nipper, M., Carr, R.S., Biedenbach, J.M., Hooten, R.L., Miller, K., Saepoff, S., 2001. Development of Marine Toxicity Data for Ordnance Compounds. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 308–318. <https://doi.org/10.1007/s002440010253>
- OECD, 2004. Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
- Olajos, E.J., Stopford M.D., W. (Eds.), 2004. Riot Control Agents: Issues in Toxicology, Safety & Health, 0 ed. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203497760>
- Perry, R.H., Green, D.W. (Eds.), 2008. Perry's chemical engineers' handbook, 8th ed. ed. McGraw-Hill, New York.
- Pfeiffer, F., 2012. Changes in Properties of Explosives Due to Prolonged Seawater Exposure. *Mar. Technol. Soc. J.* 46, 102–110. <https://doi.org/10.4031/MTSJ.46.1.5>
- Pfeiffer, F., 2007. Unterwassersprengung als unvollständiger Verbrennungsprozess – Welche bedenklichen Stoffe gelangen bei Sprengungen ins Meer? Presentation at the Symposium "New Methods of Ammunition Removal" held in Kiel, Germany, 19 Okt 2007.
- Raupers, B., Passig, J., Gehm, C., Beck, A.J., Esposito, M., Gledhill, M., Zimmermann, R., Achterberg, E.P., 2023. In situ detection of munition compounds in coastal waters. *TrAC Trends Anal. Chem.* 163, 117084. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117084>
- Rosen, G., Lotufo, G.R., 2007a. Toxicity of explosive compounds to the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in aqueous exposures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.03.006>
- Rosen, G., Lotufo, G.R., 2007b. Bioaccumulation of explosive compounds in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.04.009>
- Rosen, G., Lotufo, G.R., Belden, J.B., George, R.D., 2022. Environmental Characterization of Underwater Munitions Constituents at a Former Military Training Range. *Environ. Toxicol. Chem.* 41, 275–286. <https://doi.org/10.1002/etc.5112>
- Sabbioni, G., Liu, Y.-Y., Yan, H., Sepai, O., 2005. Hemoglobin adducts, urinary metabolites and health effects in 2,4,6-trinitrotoluene exposed workers. *Carcinogenesis* 26, 1272–1279. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi078>
- Sabbioni, G., Rumler, R., 2007. Biomonitoring of workers cleaning up ammunition waste sites. *Biomarkers* 12, 559–573. <https://doi.org/10.1080/13547500701456206>
- Scharsack, J.P., Koske, D., Straumer, K., Kammann, U., 2021. Effects of climate change on marine dumped munitions and possible consequence for inhabiting biota. *Environ. Sci. Eur.* 33, 102. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00537-4>
- Schick, L.A., Strehse, J.S., Bünning, T.H., Maser, E., Siebert, U., 2022. Energetic Compounds in the Trophic Chain—A Pilot Study Examining the Exposure Risk of Common Eiders (*Somateria mollissima*) to TNT, Its Metabolites, and By-Products. *Toxics* 10, 685. <https://doi.org/10.3390/toxics10110685>
- Schudoma, D., Bauer, K., Baumgartner, L., Hartwig, F., 2022. EQS Data Sheet Environmental Quality Standard 2,4,6-Trinitrotoluol, Umweltbundesamt, Entwurf 03.2022.
- Schulze, G., 1996. Die Schweinswale: Familie Phocoenidae, 2. überarb. Aufl. ed, Die Neue Brehm-Bücherei. Westarp Wissenschaft, Magdeburg.
- Schuster, R., Strehse, J.S., Ahvo, A., Turja, R., Maser, E., Bickmeyer, U., Lehtonen, K.K., Brenner, M., 2021. Exposure to dissolved TNT causes multilevel biological effects in Baltic mussels (*Mytilus* spp.). *Mar. Environ. Res.* 105264. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105264>

Siebert, U., Heidmann, A., Friedhoff, N., Kruse, H., Rigét, F., Adler, S., Maser, E., 2012. Organochlorine Burdens in Harbour Seals from the German Wadden Sea Collected During Two Phocine Distemper Epizootics and Ringed Seals from West Greenland Waters. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 02. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000126>

Siebert, U., Stürznickel, J., Schaffeld, T., Oheim, R., Rolvien, T., Prenger-Berninghoff, E., Wohlsein, P., Lakemeyer, J., Rohner, S., Aroha Schick, L., Gross, S., Nachtsheim, D., Ewers, C., Becher, P., Amling, M., Morell, M., 2022. Blast injury on harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the Baltic Sea after explosions of deposits of World War II ammunition. *Environ. Int.* 159, 107014. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107014>

SIPRI, 1971. The Problem of Chemical and Biological Warfare. Vol. 1, The Rise of CB Weapons. Almqvist & Wiksell, Stockholm.

Slobodnik, J., Gkotsis, G., Nika, M.-C., Vasilatos, K., Thomaidis, N.S., Alygizakis, N., Oswald, P., Rohner, S., Siebert, U., Reif, F., Dähne, M., Persson, S., Galatius, A., Pawliczka, I., Künitzer, A., 2022. Screening study on hazardous substances in marine mammals of the Baltic Sea (Abschlussbericht No. Texte 36/2022), UBA Texte. Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau.

Straumer, K., Lang, T., 2019. Studies on the health status of dab (*Limanda limanda*) from a dumpsite of conventional munitions in Kiel Bight, Baltic Sea. DAIMON Final Conference, 7th Feb 2019, Bremerhaven, Germany.

Strehse, J.S., Appel, D., Geist, C., Martin, H.-J., Maser, E., 2017. Biomonitoring of 2,4,6-trinitrotoluene and degradation products in the marine environment with transplanted blue mussels (*M. edulis*). *Toxicology* 390, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.09.004>

Strehse, J.S., Brenner, M., Kisiela, M., Maser, E., 2020. The explosive trinitrotoluene (TNT) induces gene expression of carbonyl reductase in the blue mussel (*Mytilus* spp.): a new promising biomarker for sea dumped war relicts? *Arch. Toxicol.* 94, 4043–4054. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02931-y>

Strehse, J.S., Bünning, T.H., Koschorreck, J., Künitzer, A., Maser, E., 2023. Long-Term Trends for Blue Mussels from the German Environmental Specimen Bank Show First Evidence of Munition Contaminants Uptake. *Toxics* 11, 347. <https://doi.org/10.3390/toxics11040347>

Strehse, J.S., Maser, E., 2022. Munition im Meer: Auswirkungen auf die marine Ökosphäre – Überwachungsmöglichkeiten mittels Biomonitoring und molekularem Biomarker. *Mitt Umweltchemie Ökotox, Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie Gesellschaft Deutscher Chemiker* 181–121.

Strehse, J.S., Maser, E., 2020. Marine bivalves as bioindicators for environmental pollutants with focus on dumped munitions in the sea: A review. *Mar. Environ. Res.* 105006. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105006>

Surikov, B.T., Vries, J.G. d., Mikulin, A.I., Kosygi, I.A., Holsboer, J.H., Seward, R.C., Duursma, J.C., Alfred, H., Heineken, Duursma, E.K., 2014. *Dumped Chemical Weapons in the Sea - Options*, Drukkerij van Denderen BV. Amsterdam.

Svensson, L., Mullarney, K., Zetterström, D., 2023. *Der Kosmos Vogelführer: alle Arten Europas, Nordafrikas und Vorderasiens, Dritte, erweiterte Auflage, komplett überarbeitet, aktualisiert und erweitert.* ed, Kosmos-Naturführer. Kosmos, Stuttgart.

Talmage, S., Opresko, D., Maxwell, C., Welsh, C., Cretella, F., Reno, P., Daniel, F., 1999. Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, New York, pp 1–156.

UBA, 2016. <https://www.umweltbundesamt.de/bioakkumulation-in-der-pbt-bewertung> abgerufen am 01.12.2023.

UDEM, 2019. Greinert, J. (Ed.), Appel, D., Beck, A.J., Eggert, A., Gräwe, U., Kampmeier, M., Martin, H.-J., Maser, E., Schlosser, C., Song, Y., Strehse, J.S., van der Lee, E., Vortmeyer-Kley, R., Wichert, U., Frey, T. Practical Guide for Environmental Monitoring of Conventional Munitions in the Seas - Results from the BMBF funded project UDEM “Umweltmonitoring für die Delaboration von Munition im Meer” Version 1.1. Kiel, DOI 10.3289/GEOMAR_REP_NS_54_2019.

Vanninen, P., Östin, A., Beldowski, J., Pedersen, E.A., Söderström, M., Szubska, M., Grabowski, M., Siedlewicz, G., Czub, M., Popiel, S., Nawala, J., Dziedzic, D., Jakacki, J., Pączek, B., 2020. Exposure status of sea-dumped chemical warfare agents in the Baltic Sea. *Mar. Environ. Res.* 161, 105112.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105112>

Warmke, J., 2022. Persönliche Kommunikation mit Jan Warmke, Marinekommando UAbt Geoinformation, Rostock, Juli/August 2022.

Wichert, U., 2023. persönliche Kommunikation mit Uwe Wichert, KptLt a.D., freier Berater des BLANO, MEKUN und HELCOM SUBMERGED. Kiel.

Wollin, K.-M., Dieter, H.H., 2005. Neue Trinkwasser-Leitwerte für monocyclische Nitroverbindungen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 48, 1289–1295.
<https://doi.org/10.1007/s00103-005-1157-8>