

Monitoring von PAK-Metaboliten in Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) aus der Wismar-Bucht

Ulrike Kammann · Jens Gercken

Erhalten: 27. April 2010 / Akzeptiert: 12. Juli 2010 / Online veröffentlicht: 5. August 2010
© Springer-Verlag 2010

Zusammenfassung *Ziel und Hintergrund* Im Rahmen eines integrierten Schadstoff- und Bioeffektmonitorings in der Wismar-Bucht (Mecklenburg-Vorpommern) wurde die Aalmutter (*Zoarces viviparus*) als Bioindikator für die Belastung von Biota mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) gewählt. Diese Substanzen spielen als Umweltkontaminanten im Meer eine bedeutende Rolle, und in der Ostsee treten bekanntlich vergleichsweise hohe Gehalte von PAK auf. Die Ziele der vorliegenden Untersuchung waren die Klärung der Fragen, ob PAK-Belastungsunterschiede der Fische in der Wismar-Bucht kleinräumig aufgelöst werden können und ob sich in den Verhältnissen der Metaboliten potentielle PAK-Quellen widerspiegeln.

Material und Methoden Die Gehalte an PAK-Metaboliten wurden in 183 Aalmuttern analysiert, die im Frühjahr 2008 an drei Stationen in der Wismar-Bucht gefangen wurden. In der Gallenflüssigkeit der Tiere wurden zwei Metabolite mittels HPLC-Fluoreszenz bestimmt. Zusätzlich wurde der Gehalt an Gallenpigmenten photometrisch ermittelt.

Ergebnisse Die Konzentrationen von 1-Hydroxypyren in der Gallenflüssigkeit waren an allen drei untersuchten Stationen signifikant verschieden. Die höchsten Werte wurden nahe der Stadt Wismar gemessen und betragen im Stationsmittel 1086 ng/ml. Die Gehalte der individuellen Messungen 1-Hydroxypyren lagen im Bereich von <22,5 bis

3317 ng/ml. Die Gehalte von 1-Hydroxyphenanthren waren niedriger (2,1–803 ng/ml) und erreichten in Wismar einen Mittelwert von 96 ng/ml.

Diskussion Die hohen Gehalte an 1-Hydroxypyren in Aalmuttern nahe der Stadt Wismar sind angesichts der deutlichen anthropogenen Belastung durch Hafenanlagen, Werften und Schiffsverkehr in diesem Gebiet plausibel und stimmen mit Literaturdaten überein. 1-Hydroxyphenanthren wurde in Aalmuttern in höheren Gehalten im Vergleich zu früheren Studien gefunden. Regionale Unterschiede im Verhältnis der beiden Metaboliten könnten als Hinweis auf eine lokale PAK-Quelle gewertet werden.

Empfehlungen und Ausblick PAK-Metaboliten sind ein geeigneter Parameter für das Monitoring der PAK-Belastung von ortstreuen Fischen wie der Aalmutter. Durch die Berechnung von Metaboliten-Verhältnissen können zusätzliche Hinweise auf potentielle PAK-Quellen gewonnen werden.

Schlüsselwörter Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) · Bioeffektmonitoring · Monitoring · Ostsee · PAK-Metaboliten

Monitoring of PAH metabolites in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Wismar Bight

Abstract *Background, aim, and scope* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are important environmental contaminants in the marine environment. The Baltic is known to be significantly contaminated with PAH. The eelpout (*Zoarces viviparus*) has been used for coastal monitoring in the Baltic. The aim of the present study was to elucidate whether the eelpout can be used to investigate PAH contamination in the Mecklenburg Bight and whether PAH sources may be revealed by the relation of the metabolites.

Diese Originalarbeit basiert auf einem Poster, das auf der SETAC-GLB 2009 präsentiert wurde.

U. Kammann (✉)
Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Fischereiökologie,
Palmaille 9, 22767 Hamburg, Deutschland
E-Mail: ulrike.kammann@vti.bund.de

J. Gercken
Institut für Angewandte Ökosystemforschung GmbH,
Alte Dorfstraße 11, 18184 Broderstorf, Deutschland

Material and methods PAH metabolites were determined in the bile fluid of eelpout caught in spring 2008 at three sampling locations in the Wismar Bight. Two metabolites were determined by means of HPLC and fluorescence detection. In addition, bile pigments were measured photometrically.

Results The concentrations of 1-hydroxypyrene in bile were significantly different at all three sampling locations under investigation. Highest concentrations were found near the city of Wismar with a mean value of 1086 ng/ml. Concentrations for individual fish ranged from <22.5 to 3317 ng/ml 1-hydroxypyrene. Concentrations of 1-hydroxyphenanthrene were lower and ranged from 2.1 to 803 ng/ml in individual samples. In fish caught next to the city of Wismar a mean value of 96 ng/ml 1-hydroxyphenanthrene was calculated.

Discussion In the light of substantial anthropogenic contamination in this area caused by harbor, shipyards and shipping traffic, high values of 1-hydroxypyrene found in eelpout near the city of Wismar appear to be very plausible. Furtheron, the 1-hydroxypyrene results are in accordance to literature data. 1-Hydroxyphenanthrene in eelpout bile was found in higher concentrations compared to earlier investigations. Spatial differences in the relation of the two metabolites may indicate a local source of PAH.

Recommendations and perspectives PAH metabolites are useful parameters for monitoring the PAH pollution of fish like eelpout. Additional information regarding potential PAH sources can be gained from the relations of individual metabolites.

1 Einleitung

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) stellen aufgrund ihrer mutagenen und karzinogenen Eigenschaften wichtige Umweltkontaminanten dar. Die Ostsee ist für vergleichsweise hohe Gehalte an diesen Substanzen im Sediment bekannt (Biselli et al. 2005). Der enzymatische Abbau von PAK im Fisch kann zu toxischen Zwischenprodukten führen, die den Organismus dauerhaft schädigen. So können aus PAK über das Enzym Cytochrom P4501A Epoxide entstehen, die zu karzinogenen Dilepoxiden weiter oxidiert werden. Diese Verbindungen können an die DNA binden und die Bildung von Mutationen oder Tumoren auslösen. Erhöhte Raten an Leberveränderungen und Tumoren konnten in europäischen Fischbeständen mit der PAK-Belastung im Sediment korreliert werden (Vethaak et al. 1996). Aus diesem Grund ist die PAK-Belastung der marinen Umwelt ein Anlass zur Sorge und wird international überwacht.

Fische nehmen PAK aus der Wasserphase und über die Nahrung auf (Grung et al. 2009) und setzen sie in wenigen Tagen zu Metaboliten um, die sie über die Gallenflüssigkeit

ausscheiden (Jonsson et al. 2004). Die Analyse von PAK-Metaboliten in Fischgalle ist daher eine geeignete Methode für das Monitoring der aktuellen PAK-Belastung von Fischen. PAK-Metaboliten wurden bereits in Gallenflüssigkeiten von vielen marinen Fischarten nachgewiesen; entweder nach der Exposition mit PAK im Labor (Luthe et al. 2002; Roy et al. 2003; van Schanke et al. 2001) oder in Wildfängen (Ruddock et al. 2003; Vuontisjarvi et al. 2004). Der Hauptmetabolit in Fischgalle ist das 1-Hydroxypyren (1-OH-Pyr), das bis zu 76 % an der Summe der PAK-Metaboliten ausmacht. Andere in Wildfischen nachgewiesene Metaboliten sind 1-Hydroxyphenanthren (1-OH-Phen), 1-Hydroxycrysen und mehrere Metaboliten des Benzo(a)pyrens (Ruddock et al. 2003). Für die Vorliegende Untersuchung wurden die beiden Metabolite ausgewählt, die mengenmäßig den größten Anteil an der Summe der PAK-Metaboliten in Fischgalle ausmachen: 1-OH-Pyr und 1-OH-Phen.

Die Fischart Aalmutter (*Zoarces viviparus*) lebt in den Küstenregionen der Ostsee und eignet sich aufgrund ihrer Ortstreue gut als Bioindikator für das küstennahe Monitoring. Durch ihre vivipare Fortpflanzung (lebendgebärend) ist die Aalmutter zum Nachweis von reproduktionstoxischen Effekten bei der Nachkommenschaft prädestiniert. Wegen dieser vorteilhaften Eigenschaften wird die Aalmutter von HELCOM und OSPARCOM als Bioindikator empfohlen und von der Umweltprobenbank des Bundes (UPB) zur Erfassung der Schadstoffbelastung in der marinen Umwelt genutzt (BMU 2000). Gleichzeitig ist diese Fischart Forschungsobjekt in laufenden internationalen Projekten in der Ostsee.

Biologisches Effektmonitoring und die Bestimmung von PAK-Metaboliten sind Teil von internationalen Monitoringprogrammen. Eines dieser Programme ist das „OSPAR Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP)“, in welchem Empfehlungen für das Monitoring in der Nordsee gegeben werden (OSPAR 1998). Die Zielarten in diesem Programm sind hauptsächlich Kliesche (*Limanda limanda*), Flunder (*Platichthys flesus*) und Kabeljau (*Gadus morhua*). Aalmuttern werden nur im Hinblick auf die Untersuchung des Reproduktionserfolges (reproductive success) erwähnt. Im entsprechenden Monitoringprogramm für die Ostsee (HELCOM COMBINE) gibt es zurzeit noch keine verpflichtenden Messungen biologischer Schadstoffeffekte. Während die Untersuchung von PAK in Fischgalle für viele Fischarten gut dokumentiert ist (Kammann 2007; Vuontisjarvi et al. 2004; Budzinski et al. 2004; Richardson et al. 2004; van Schanke et al. 2001), liegen zur Aalmutter bislang nur vergleichsweise wenige Untersuchungen vor (Vuorinen et al. 2006), und Referenzwerte aus niedrig belasteten Gebieten fehlen für diese Fischart völlig. Dabei könnte die Aalmutter für ein breiter angelegtes biologisches Effektmonitoring in der Ostsee eingesetzt werden. Das ist ein Aspekt, der in den über BONUS ERA-NET geförderten Projekten

BALCOFISH und BEAST (http://www.bonusportal.org/research_projects) bearbeitet wird.

Mit dieser Studie sollte geklärt werden, ob 1) PAK-Belastungsunterschiede der Aalmuttern in der Mecklenburger Bucht kleinräumig aufgelöst werden können und ob 2) Unterschiede im Verhältnis der Metaboliten Rückschlüsse auf potenzielle Quellen zulassen.

2 Material und Methoden

2.1 Probennahme

Im Auftrag des Landesamtes für Umwelt, Naturschutz und Geologie Mecklenburg-Vorpommern (LUNG) unternahm das Institut für Angewandte Ökosystemforschung GmbH ein integriertes Schadstoff- und Bioeffektmonitoring in der Wismar-Bucht und angrenzenden Gewässern. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden im Mai und Juni 2008 125 männliche Aalmuttern zwischen 18 und 33 cm Länge und 82 weibliche mit einer Körperlänge von 21 bis 36 cm an drei Stationen im Bereich der Wismar-Bucht gefangen: Wismar/Wendorf (Station 1), Eggers Wiek (Station 2) und Boiensdorf/Salzhauff (Station 3) (Abb. 1). Im Verlauf der Sektion wurde von jedem Fisch mit einer 1ml-Einwegspritze die Gallenflüssigkeit entnommen (ca. 100 µl) und bei -28°C bis zur Analyse tiefgefroren.

2.2 Chemikalien

Standardlösungen der Metaboliten 1-OH-Pyr und 1-OH-Phen wurden von der Firma Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augs-

burg, Deutschland) mit zertifizierten Konzentrationen bezogen. Acetonitril (HPLC-Qualität), Ethanol (absolut), Trifluoressigsäure (Spektroskopiequalität) und die Enzymmischung β -Glucuronidase/Arylsulfatase wurden von VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) geliefert. Die Ascorbinsäure war ein Produkt von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland). Reinstwasser für die HPLC-Eluenten (Gradientenqualität) wurde von Mallinckrodt Baker (Deventer, Niederlande) hergestellt.

2.3 Probenvorbereitung und HPLC-Messung

Die PAK-Metaboliten wurden nach der von Kammann (2007) beschriebenen Methode untersucht: Es wurden 25 µl der Gallenprobe mit 5 µl β -Glucuronidase/Arylsulfatase (30/60 U/ml) umgesetzt, die Reaktion mit Ethanol gestoppt und nach Zentrifugation der klare Überstand in die HPLC mit Fluoreszenzdetektion (Merck Hitachi) injiziert. Abweichend von Kammann (2007) wurde eine kürzere Säule (Nucleosil 100-3 C18, 3×125 mm) und eine Fließgeschwindigkeit von 0,55 ml/min verwendet. Der Gradient aus Acetonitril und 0,1 % Trifluoressigsäure begann mit 50 % Acetonitril. Nach 10 min änderte sich der Acetonitrilgehalt über einen Zeitraum von 4 min auf 60 %, um dann in 2 min auf 100 % anzusteigen. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden für 1-OH-Pyr auf 346/384 nm und für 1-OH-Phen auf 256/380 nm festgelegt. Die Messung der Gallenpigmente erfolgte über die UV-Absorption bei 380 nm der 1:20 verdünnten Galle mithilfe eines Plattenphotometers (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland).

2.4 Qualitätssicherung und Statistik

Von jeder Probe wurde eine unabhängige Doppelbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Ein eigenes Laborreferenzmaterial diente zur Kontrolle der Stabilität der Methode. Der Variationskoeffizient der Analysen dieses Materials lag bei 15 %. Nach jeder Messung von 20 Proben wurde eine 5-Punkt-Kalibration durchgeführt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden nach DIN 32645 (DIN 1994) aus den Standardkurven mit einem Vertrauensbereich von 99 % berechnet. Die so erhaltenen Nachweisgrenzen (Bestimmungsgrenzen) waren 3,4 (22,5) ng/ml für 1-OH-Pyr bzw. 0,5 (1,7) ng/ml für 1-OH-Phen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem *t*-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Das Signifikanzniveau lag bei 95 %.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Konzentrationen des PAK-Metaboliten 1-OH-Pyr in Aalmuttern lagen zwischen $<22,5$ und 3317 ng/ml ($<2,4$ –29 ng/



Abb. 1 Karte der Probenahmeorte in der Wismar-Bucht (Ostsee): (1) Wismar/Wendorf, (2) Eggers Wiek, (3) Boiensdorf (Salzhaff)

Tabelle 1 Konzentrationen der PAK-Metaboliten 1-Hydroxy-pyren und 1-Hydroxyphenanthren in der Galle von männlichen (m), weiblichen (w) sowie beiden Geschlechtern gemeinsam (m + w) Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) an drei Stationen aus der Wismar-Bucht. Anzahl (n) und Geschlecht der Fische sowie Mittelwerte, Minima und Maxima der Metabolite in ng/ml

Gebiet	Geschlecht	n	1-OH-Pyr [ng/ml]			1-OH-Phen [ng/ml]		
			Mittel	Min	Max	Mittel	Min	Max
Wismar/Wendorf	w	27	969	109	2538	72,8	7,6	144
	m	44	1158	<22,5	3317	111	2,5	803
	w + m	71	1086	<22,5	3317	96,2	2,5	803
Eggers Wiek	w	24	236	37,6	493	31,4	3,8	82,5
	m	32	462	63,5	2331	61,5	8,8	114
	w + m	56	365	37,6	2331	48,6	3,8	114
Boiensdorf (Salzhaff)	w	27	134	<22,5	276	70,7	2,1	130
	m	29	151	63,1	238	74,1	15,8	245
	w + m	56	143	<22,5	276	72,4	2,1	245

AE380nm) in individuellen Proben bzw. zwischen 134 und 1158 ng/ml für die Stationsmittelwerte (Tab. 1). Männchen und Weibchen zeigten keine signifikanten Unterschiede, auch wenn männliche Tiere zu höheren Konzentrationen an PAK-Metaboliten tendierten. Fische aus der inneren Wismar-Bucht (Station 1) nahe der Stadt Wismar, einer Region mit deutlicher anthropogener Belastung durch Hafen, Werft und Kläranlage, wiesen die höchsten Werte auf. Die Belastungen an den Stationen Eggers Wiek und Boiensdorf im Salzhaff lagen signifikant niedriger (Abb. 2). 1-OH-Phen wurde mit geringeren Konzentrationen von 2,1 bis 830 ng/ml (0,3–9,4 ng/AE380nm) in den Aalmuttern gefunden. Die Station Wismar/Wendorf zeigte auch bei diesem Metaboliten die höchsten Einzelwerte. Allerdings unterschieden sich die 1-OH-Phen Gehalte der drei Stationen nicht signifikant voneinander.

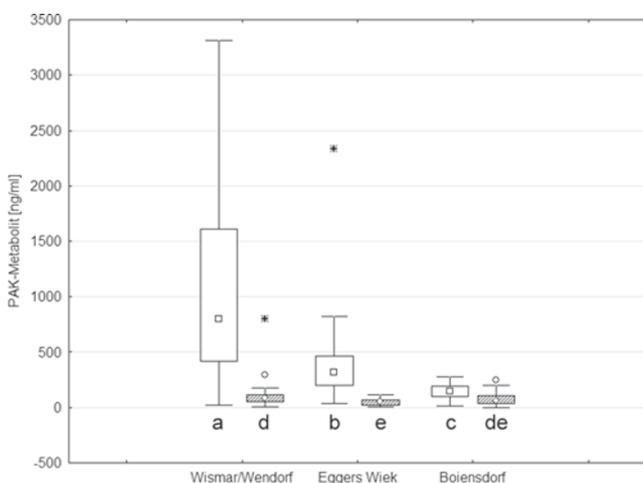


Abb. 2 PAK-Metaboliten 1-Hydroxy-pyren (*hell*) und 1-Hydroxyphenanthren (*dunkel*) in der Galle von Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) an drei Stationen aus der Wismar-Bucht im Frühjahr 2008. Mediane, Quartile (*Box*) und Bereiche ohne Ausreißer (*Whisker*) sowie Ausreißer (*Kreis*) und Extremwerte (*Stern*). Die Buchstaben markieren signifikante Unterschiede, berechnet mit dem *t*-Test für unabhängige Stichproben und einem 95 %-Konfidenzintervall

Wurden die Gehalte der PAK-Metabolite anstatt auf das Gallenvolumen auf die alternative Bezugsgröße Gallenpigmente (A380nm) bezogen, änderten sich die Verhältnisse zwischen den Stationen nicht wesentlich. Der Vergleich der PAK-Metabolite zwischen den Stationen ergab mit Bezug auf die Gallenpigmente ähnliche Ergebnisse wie ohne diesen Bezug. Als einzige Abweichung zeigte sich ein signifikanter Unterschied von 1-OH-Phen bezogen auf A380nm zwischen den Stationen Boiensdorf und Eggers Wiek, der ohne Bezug auf A380 nicht signifikant war. Von einem Bezug der PAH-Metabolite auf Gallenpigmente (A380nm) wurde dennoch abgesehen, da die potenzielle Bezugsgröße nur schwach mit den Analyten korrelierte (r^2 der einzelnen Metaboliten an den Stationen zwischen 0,11 und 0,65) und der Vergleich zwischen den Stationen im Wesentlichen zu den gleichen Resultaten führte.

Die höchsten Konzentrationen an 1-OH-Pyr in Aalmuttern aus der vorliegenden Studie liegen oberhalb der Konzentrationen, die in Flundern aus der Ostsee gefunden wurden: Vuontisjarvi et al. (2004) bestimmten Maximalwerte von etwa 1000 ng/g und Kammann und Haarich (2009) analysierten Konzentrationen von bis zu 200 ng/ml 1-OH-Pyr in küstenfern gefangenen Flundern aus der westlichen Ostsee. In Aalmuttern aus der Ostsee ermittelten Vuontisjarvi et al. (2004) Maximalwerte von 1200 ng/g 1-OH-Pyr und Vuorinen et al. (2006) fanden bis zu 900 ng/ml in Aalmuttern während des Frühjahrs. Die Konzentrationen an der Station Wismar/Wendorf liegen am oberen Ende des in der Literatur beschriebenen Bereichs bzw. überschreiten diesen im Einzelfall sogar und unterstreichen damit die besondere Situation in der Wismar-Bucht 2008.

Vuorinen et al. (2006) analysierten PAK-Metaboliten in Aalmuttern, die im Frühjahr 2001 in der Wismar-Bucht gefangen wurden. Die Autoren fanden für 1-OH-Pyr (gemessen über totale Fluoreszenz der Galle und umgerechnet in 1-OH-Pyr) 100–900 ng/ml für Mittelwerte in 5–20 Tieren. Durch Vergleich der Untersuchungen mit den Ergebnissen in Tab. 1 wird deutlich, dass die Pyren-Belastung in der

Wismar-Bucht verglichen mit 2001 unverändert hoch ist. Die Gehalte an 1-OH-Phen in Aalmuttergalle wurden von Vuorinen et al. (2006) mit HPLC bestimmt und lagen zwischen 5 und 30 ng/ml. In der vorliegenden Studie wurde bei Anwendung derselben Methodik deutlich höhere Werte für 1-OH-Phen bestimmt (siehe Tab. 1), was auf eine Veränderung der Zusammensetzung der PAK-Kontamination in der Wismar-Bucht und damit möglicherweise auf andere Quellen schließen lässt. Ein weiterer Hinweis auf potentielle PAK-Quellen konnte im Verhältnis 1-OH-Phen zu 1-OH-Pyr in den Aalmuttern aus dem Salzhaff festgestellt werden (Abb. 3). An dieser Station sind die Fische mit auffällig hohen Konzentrationen an 1-OH-Phen von etwa 50 % des 1-OH-Pyr-Gehalts belastet. Sie liegen damit im Verhältnis höher als die 1-OH-Phen-Gehalte in Aalmuttern von den anderen Stationen (siehe Tab. 1) und ebenfalls höher als in küstenfern gefangenen Fischen: Bei Flunder und Kliesche finden sich typischerweise 1-OH-Phen-Gehalte, die 10–20 % des 1-OH-Pyr entsprechen (Kammann 2007; Kammann und Haarich 2009). 1-OH-Phe ist ein Metabolit des Phenanthrens, das flüchtiger ist als Pyren und bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe wie Kohle und Öl oder daraus hergestellten Produkten in die Atmosphäre eingetragen wird. Die atmosphärische Deposition von Phenanthren ist für die aquatische Umwelt bedeutsam. Ruddock et al. (2003) stellte an Aalen (*Anguilla anguilla*) aus englischen Ästuarien unterschiedliche Muster der PAK-Metaboliten in der Galle fest, die charakteristisch für den Fangort waren. Bei den hier untersuchten Aalmuttern zeichnet sich ebenfalls ein regional spezifisches Muster der PAK-Metaboliten ab.

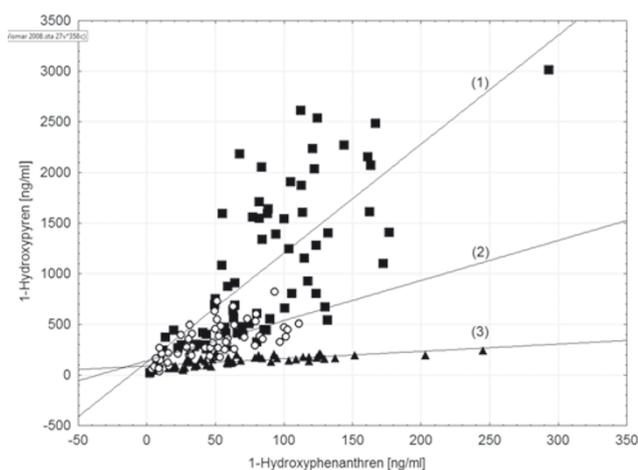


Abb. 3 Verhältnis der PAK-Metaboliten 1-Hydroxypyren zu 1-Hydroxyphenanthren in der Galle von Aalmuttern (*Zoarces viviparus*) an drei Stationen aus der Wismar-Bucht: Wismar/Wendorf (1, ■, $r^2 = 0,52$). Eggers Wiek (2, ○, $r^2 = 0,52$) und Boiensdorf/Salzhaff (3, ▲, $r^2 = 0,42$). Ohne Extremwerte aus Abb. 2

4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung, dass PAK-Metaboliten gut für ein Monitoring von ortstreuen Fischen in der Ostsee geeignet sind und über ihr Verhältnis zueinander Hinweise auf potentielle PAK-Quellen liefern können. Die Aalmutter hat sich als geeignete Zielart für die Untersuchung von PAK-Metaboliten im Rahmen des marinen Umweltmonitorings erwiesen. Allerdings sollte die Anzahl der untersuchten Stationen und der PAK-Metaboliten in zukünftigen Studien erhöht werden, um diese Beobachtung zu bestätigen. Es ist geplant, die vorliegenden Ergebnisse mit Untersuchungen über Reproduktionsstörungen der Aalmuttern in Beziehung zu setzen und als Teil eines integrierten Monitorings zu betrachten.

Literatur

- Biselli S, Reineke N, Heinzl N, Kammann U, Franke S, Hühnerfuss H, Theobald N (2005) Bioassay-directed fractionation of organic extracts of marine surface sediments from the North and Baltic Sea – Part I: Determination and identification of organic pollutants. *J Soils Sediments* 5(3):71–181
- BMU (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) (2000) Umweltprobenbank des Bundes – Konzeption. Umweltbundesamt, Berlin, <http://www.umweltprobenbank.de>. Letzter Zugriff: 27. 7. 2010
- Budzinski H, Mazeas O, Tronczynski J, Desauay Y, Bocquene G, Claireaux G (2004) Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites: Application to the „Erika“ oil spill. *Aquat Living Resour* 17(3):329–334
- DIN (1994) Deutsches Institut für Normung e. V. (DIN) 32645, Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Beuth, Berlin
- Grung M, Holth TF, Jacobsen MR, Hyllan K (2009) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites in Atlantic cod exposed via water or diet to a synthetic produced water. *J Toxicol Environ Health Part A* 72:245–265
- Jonsson G, Bechmann RK, Bamber SD, Baussant T (2004) Bioconcentration biotransformation and elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sheephead minnows (*Cyprinodon variegatus*) exposed to contaminated seawater. *Environ Toxicol Chem* 23:1538–1548
- Kammann U (2007) PAH metabolites in bile fluids of dab (*Limanda limanda*) and flounder (*Platichthys flesus*) – spatial distribution and seasonal changes. *Environ Sci Pollut Res* 14(2): 102–108
- Kammann U, Haarich M (2009) PAK-Metaboliten in Fischen aus der Ostsee 1999–2006. *Meeresumwelt Aktuell Nord- und Ostsee, 2009/4*, Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (BSH) Hamburg und Rostock, 8 S, http://www.blmp-online.de/PDF/Indikatorberichte/2009_04_s.pdf. Letzter Zugriff 27. 7. 2010
- Luthe G, Stroomborg GJ, Ariese F, Brinkman UAT, van Straalen NM (2002) Metabolism of 1-fluoropyrene and pyrene in marine flatfish and terrestrial isopods. *Environ Toxicol Pharm* 12(4): 221–229
- OSPAR (1998) JAMP Guidelines for contaminant-specific biological effects monitoring. OSPAR Oslo and Paris Commission, London, UK, <http://www.ospar.org/content/content.asp?menu=00900301400135>. Letzter Zugriff 27. 7. 2010
- Richardson DM, Gubbins M, Davies IM, Moffat CF, Pollard PM (2004) Effects of feeding status on biliary PAH metabolite and biliverdin

- concentrations in plaice (*Pleuronectes platessa*). Environ Toxicol Pharm 17:79–85
- Roy LA, Steinert S, Bay SM, Greenstein D, Sapozhnikova Y, Bawardi O, Leifer I, Schlenk D (2003) Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA. Aquat Toxicol 65(2):159–169
- Ruddock PJ, Bird DJ, McEvoy J, Peters LD (2003) Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. Sci Total Environ 301(1–3):105–117
- van Schanke A, Holtz F, van der Meer J, Boon JP, Ariese F, Stroomberg G, van den Berg M, Everaarts JM (2001) Dose- and time-dependent formation of biliary benzo[a]pyrene metabolites in the marine flatfish dab (*Limanda limanda*). Environ Toxicol Chem 20(8):1641–1647
- Vethaak AD, Jol JG, Meiboom A, Eggens ML, ap Reinallt PW, Wester van der Zande T, Bergmann A, Dankers A, Ariese F, Baan RA, Everts JM, Opperhuizen A, Marquenie JM (1996) Skin and liver diseases induced in flounder (*Platichthys flesus*) after long-term exposure to contaminated sediments in large-scale mesocosms. Environ Health Persp 104(11):1218–1229
- Vuontisjarvi H, Keinänen M, Peltonen K, Vuorinen PJ (2004) A comparison of HPLC with fluorescence detection and fixed wavelength fluorescence methods for the determination of PAH metabolites in fish bile. Polycycl Aromat Comp 24(4–5): 333–342
- Vuorinen PJ, Keinänen M, Vuontisjärvi H, Baršienė J, Broeg K, Förlin L, Gercken J, Kopecka J, Köhler A, Parkkonen J, Pempkowiak J, Schiedek D (2006): Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. Mar Pollut Bull 53(8–9):523–537