

Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt

**Prüfung der biologischen Abbaubarkeit ausgewählter Antibiotika,
ihr Vorkommen im Abwasser und ihr möglicher Einfluss auf die
Reinigungsleistung kommunaler Kläranlagen**

Identifizierung von Risikofeldern

Abschlussbericht

F&E-Vorhaben 298 63 722

PD Dr. K. Kümmerer (Projektleitung)

Freiburg im August 2003

F&E-Vorhaben 298 63 722

Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum,
Hugstetter Str. 55, 79106 Freiburg i. Br.

Dr. Radka Alexy

Dipl.-Ing. (FH) Tina Kümpel

Dipl.-Ing. (FH) Alice Schöll

PD Dr. Klaus Kümmerer

ECT Oekotoxikologie GmbH, Böttger Str. 2-14, 65439 Flörsheim am Main

Dr. Wolfgang Kalsch

Dipl.-Ing. (FH) Thomas Junker

Dr. Johann F. Moltmann

Dr. Thomas Knacker

Universität Dortmund, Lehrstuhl für Computergestützte Statistik,
Vogelpothsweg 87, 44221 Dortmund

Dipl.-Math. Winfried Theis

Prof. Dr. Claus Weihs

Hydrotox GmbH, Bötzingen Str. 29, 79111 Freiburg i. Br.

Elke Urich

Dipl.-Geo./Hydrologie Stefan Gartiser

DVGW-Technologiezentrum Wasser (TZW),

Karlsruher Str. 84, 76139 Karlsruhe

Dipl.-Ing. Melanie Metzinger

Michael Wenz

Dr. Frank Thomas Lange

Vermicon AG, Emmy-Noether Str. 2, 80992 München

Dr. Claudia Beimfohr

DANKSAGUNG

Dieses Projekt konnte nur durch die Mitwirkung und das Engagement vieler Arbeitsgruppen mit breitem Fachwissen (ECT Oekotoxikologie GmbH Flörsheim, Hydrotox GmbH Freiburg, DVGW - Technologiezentrum Wasser Karlsruhe, Universität Dortmund - Lehrstuhl für Computergestützte Statistik, Vermicon AG München, Uniklinik Freiburg - Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene) durchgeführt werden. Wir danken dem gesamten Team für die gute Zusammenarbeit und ständige Bereitschaft für Diskussionen.

Unser Dank gilt insbesondere den aktiv am Projekt beteiligten Mitarbeitern der Stadt-, Rathaus-, Üsenberg-Apotheke und Arztpraxen der Stadt Kenzingen sowie den Mitarbeitern der Kläranlage Forchheim, Kenzingen, Wyhl, Niedernhausen und den Mitarbeitern der Forstlichen Versuchsanstalt in Freiburg. Sie haben auf freiwilliger Basis mit beispielhaftem Einsatz zum Erfolg des Vorhabens beigetragen.

Wir danken auch dem Umweltbundesamt Berlin, dessen finanzielle Förderung des Projektes (F&E-Vorhaben 298 63 722) den Grundstein der Kenntnisse über Umwelteigenschaften der Antibiotika geschaffen hat.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	3
INHALTSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	12
2 METHODEN	24
2.1 Literaturrecherche und Stoffauswahl	24
2.2 Eintrag und Nachweis von Antibiotika in der aquatischen Umwelt	26
2.2.1 Bilanzierung Kenzingen	26
2.2.1.1 Antibiotikaverbrauch in Kenzingen.....	26
2.2.1.2 Beprobung der kommunalen Kläranlage Kenzingen	28
2.2.2 Kläranlagen Forchheim und Wyhl	29
2.2.2.1 Beprobung der kommunalen Kläranlage Forchheim	29
2.2.2.2 Beprobung der kommunalen Kläranlage Wyhl	30
2.2.3 Analytische Verfahren zur Antibiotika-Bestimmung aus wässrigen Proben	31
2.2.3.1 Extraktion.....	34
2.2.3.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie	36
2.2.3.3 Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie.....	39
2.2.3.4 Grundvalidierung.....	41
2.2.3.5 Untersuchung von Matrixeffekten	45
2.2.3.6 Teilnahme des TZW-Labors am BLAC-Ringversuch (externe Qualitätssicherung) ...	49
2.2.4 Analytisches Verfahren zur Antibiotika-Bestimmung aus Schlammproben.....	52
2.2.4.1 Bestimmung von Wirkstoffgehalten in Feststoffen.....	52
2.2.4.2 Die saure Extraktion.....	53
2.3 Verhalten, Abbau und Eliminierung von Antibiotika.....	54
2.3.1 Closed Bottle Test (OECD 301D : 1992)	54
2.3.2 Kombinationstest (Inhärente Abbaubarkeit).....	60
2.3.2.1 Kombinationstest bei hohen Antibiotikakonzentrationen.....	60
2.3.2.2 Kombinationstest bei niedrigen Antibiotikakonzentrationen	65
2.3.3 Anaerobe Abbaubarkeit	66
2.3.3.1 Anaerobe Abbaubarkeit bei hohen Antibiotikakonzentrationen.....	66
2.3.3.2 Anaerobe Abbaubarkeit bei niedrigen Antibiotikakonzentrationen	68
2.3.4 Kläranlagensimulationstest OECD 303 A : 1981 (modifiziert) und Draft Document : 2000.	69
2.3.4.1 Belebtschlamm- und Verfahrensparameter.....	69

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

2.3.4.2	Stoffspezifische Analytik.....	77
2.3.4.3	Untersuchung der Populationsdynamik.....	77
2.3.4.3.1	Chemotaxonomie.....	77
2.3.4.3.2	FISH (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung)	86
2.3.5	Kläranlagensimulationstest OECD 303 A : 1981 mit radioaktiv markierten Substanzen	87
2.3.5.1	Belebtschlamm- und Verfahrensparameter.....	87
2.3.5.2	Stoffspezifische Analytik: Primärelimination.....	93
2.3.6	Licht- und Temperaturempfindlichkeit	93
2.3.7	Adsorption.....	96
2.4	Wirkung von Antibiotika auf Bakterien.....	97
2.4.1	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) im CBT	97
2.4.2	<i>Pseudomonas putida</i> Wachstumshemmtest (EN ISO 10712 : 1995) und Modifikation für <i>Enterococcus faecalis</i>	99
2.4.3	Respirationshemmtest (OECD 209 : 1984)	105
2.4.3.1	Verlängerter Respirationshemmtest.....	108
2.4.4	Nitrifikationshemmtest (DIN EN ISO 9509 : 1995).....	109
2.4.4.1	Verlängerter Nitrifikationshemmtest.....	113
2.4.4.2	Nachweis von nitrifizierenden Bakterien mit Nitri-VIT	113
2.4.5	Anaerober Hemmtest.....	115
2.5	Modellierung und Risikobewertung.....	120
2.5.1	Statistische Methoden für die EC _x -Berechnung	120
2.5.2	Modellierung.....	121
2.5.2.1	Das Modell der EMEA.....	121
2.5.2.2	EUSES 1.0 und TOXSWA 1.2.....	123
2.5.2.3	Eingangsdaten für die untersuchten Substanzen	126
2.5.2.4	Gemessene Umweltkonzentration	135
2.5.3	Risikobewertung.....	137
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	140
3.1	Literaturrecherche und Stoffauswahl	140
3.1.1	Literaturrecherche	140
3.1.2	Stoffauswahl der 18 Antibiotika.....	140
3.1.3	Literaturrecherche zum Abbauverhalten von Amoxicillin.....	145
3.2	Eintrag und Nachweis von Antibiotika in der aquatischen Umwelt	148
3.2.1	Bilanzierung Kenzingen	148
3.2.1.1	Antibiotikaverbrauch in Kenzingen.....	148
3.2.1.2	Umweltkonzentrationen.....	149
3.2.1.3	Aussagekraft der Bilanzierung.....	151

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

3.2.2	Kläranlagen Forschheim und Wyhl	154
3.3	Verhalten, Abbau und Eliminierung von Antibiotika.....	161
3.3.1	Closed Bottle Test (OECD 301 : 1992)	161
3.3.1.1	Biologische Abbaubarkeit im CBT	161
3.3.1.2	Abiotische Elimination im CBT.....	165
3.3.2	Kombinationstest (Inhärente Abbaubarkeit).....	169
3.3.2.1	Kombinationstest bei hohen Antibiotikakonzentrationen.....	169
3.3.2.2	Kombinationstest bei niedrigen Antibiotikakonzentrationen	175
3.3.3	Anaerobe Abbaubarkeit	180
3.3.3.1	Anaerobe Abbaubarkeit bei hohen Antibiotikakonzentrationen.....	180
3.3.3.2	Anaerobe Abbaubarkeit bei niedrigen Antibiotikakonzentrationen	185
3.3.4	Kläranlagensimulationstest	192
3.3.4.1	Belebtschlamm- und Verfahrensparameter.....	192
3.3.4.2	Stoffspezifische Analytik.....	203
3.3.4.3	Untersuchung der Populationsdynamik.....	206
3.3.4.3.1	Chemotaxonomie.....	206
3.3.4.3.2	Statistische Auswertungsmethode der Chemotaxonomie.....	209
3.3.4.3.3	FISH (Floureszenz-In-Situ-Hybridisierung)	218
3.3.5	Kläranlagensimulationstest OECD 303 A : 1981 mit radioaktiv markierten Substanzen ..	226
3.3.5.1	Belebtschlamm- und Verfahrensparameter.....	226
3.3.5.2	Stoffspezifische Analytik für ¹⁴ C-Trimethoprim	232
3.3.6	Licht- und Temperaturempfindlichkeit	233
3.3.7	Adsorption.....	243
3.4	Wirkung von Antibiotika auf Bakterien.....	246
3.4.1	Koloniebildende Einheiten (KBE) im CBT.....	246
3.4.2	Wachstumshemmtest (EN ISO 10712 : 1995).....	249
3.4.2.1	Keimauswahl und Methodenentwicklung	250
3.4.2.2	Vergleich der Ergebnisse für beide Keime	258
3.4.3	Respirationshemmtest (OECD 209 : 1984)	268
3.4.4	Nitrifikationshemmtest (DIN EN ISO 9509 : 1995).....	277
3.4.5	Anaerober Hemmtest.....	288
3.5	Modellierung und Risikobewertung.....	293
3.5.1	Vergleich der statistischen Methoden für die EC _x -Berechnung	293
3.5.2	Modellierung.....	297
3.5.2.1	Ergebnisse der Modellierung.....	297
3.5.2.2	Diskussion für die Stoffe im Einzelnen.....	300
3.5.3	Risikoanalyse auf Basis der Ergebnisse des Wachstumshemmtests	307
3.5.4	Risikobewertung.....	310

4	BEWERTUNG	313
5	ZUSAMMENFASSUNG	323
6	AUSBLICK	335
7	PUBLIKATIONEN	336
8	LITERATURVERZEICHNIS	342
9	ANHANG	366
9.1	Material und Geräte	366
9.1.1	Untersuchte Stoffe.....	366
9.1.2	Untersuchte radioaktiv markierte Stoffe.....	367
9.1.3	Chemikalien	367
9.1.4	Verbrauchsmaterial	371
9.1.5	Geräte.....	372
9.2	Stoffdossiers.....	376

Symbol	Bedeutung	Einheit
A. R.	Ausscheidungsrate	-
AB	Antibiotika	-
AIC	Akaikes Informationskriterium	-
AMG	Arzneimittelgesetz	-
ANOVA	Analysis of Variance – Varianzanalyse	-
AQS	Analytische Qualitätssicherung	-
ATCC	American Type Culture Collection	-
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte	-
BG	Bestimmungsgrenze	-
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin	-
BLAC	Bund-/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit	-
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung	-
BSB	Biologischer Sauerstoffbedarf	mg O ₂ /l
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit	-
C	Kohlenstoff	-
CAS	Chemical Abstracts Service	-
CBT	Closed Bottle Test	-
CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products	-
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf	mg O ₂ /l
CSTEE	Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the environment	-
d	Tag (day)	-
DIC / IC	(Dissolved) inorganic carbon, Gehalt an inorganischem Kohlenstoff	mg/l
DIN	Deutsches Institut für Normung	-
DOC	Dissolved Organic Carbon, Gehalt an gelöstem organischem Kohlenstoff	mg/l
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	-
DT _x -Wert	Anzahl von Tagen, in denen x-%ige Menge eines Wirkstoffs im Boden abgebaut wird	d

Symbol	Bedeutung	Einheit
DVGW	Deutscher Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e. V. – Wissenschaftlich-technischer Verein	-
EAWAG	Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung , Abwasser- reinigung und Gewässerschutz	-
ECETOC	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals	-
ECT	ECT Ökotoxikologie GmbH, Flörsheim	-
EC _x -Wert	Effektkonzentration bei der eine x-%ige Wirkung eintritt	µg/l bzw. mg/l
EMEA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products	-
EMPA	Eidgenössische Materialprüfungs- und Forschungsanstalt	-
EN	Europäische Norm	-
ENV+	Styroldivinylbenzol-Copolymer	-
ESI	Electrospray Ionization	-
EU	Europäische Union	-
EUSES	European Union System for the Evaluation of Substances	-
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft	-
F&E	Forschung & Entwicklung	-
FEDESA	Fédération Européenne De La Santé Animale	-
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung	-
FNU	Formazine Nephelometric Units	-
G+C- Gehalt	Guanosin- und Cytosin-Gehalt der DNA	-
GSBL	Gemeinsamer Stoffdatenpool Bund/Länder	-
HGC	Gram-positive Bakterien mit hohem G+C-Gehalt	-
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	-
IC	Ionenchromatografie	-
IMO	International Maritime Organisation	-
ISO	International Organisation for Standardization	-
IST	International Sorbent Technology	-
IUK	Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene	-
KA	Kläranlage	-
KBE	Koloniebildende Einheiten	-
K _{OC} -Wert	Verteilungskoeffizient eines Wirkstoffs zwischen org. Sub-	-

Symbol	Bedeutung	Einheit
	stanz im Boden und wässriger Lösung	
LC-MS	Liquid-Chromatography – Mass Spectroscopy	-
LC _x -Wert	x-%ige Lethal Concentration	µg/l bzw. mg/l
log P _{OW} bzw. K _{ow}	Dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol und Wasser	-
LSC	Flüssigkeits-Szintillations-Zählung	-
MBK	Minimale Bakterizide Hemmkonzentration	µg/l bzw. mg/l
MHK	Minimale Hemmkonzentration	µg/l bzw. mg/l
M-n	Menachinon n (n= Anzahl der Isopreneinheiten in der Seitenkette)	-
MRM	Multiple Reaction Monitoring	-
MS	Massenspektroskopie	-
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards	-
NG	Nachweisgrenze	-
NHT	Nitrifikationshemmtest	-
NOEC	No Effect Concentration	µg/l bzw. mg/l
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development	-
PE	Polyethylen	-
PEC	Predicted Environmental Concentration	-
PNEC	Predicted No Effect Concentration	-
Q-n	Ubichinon n (n=Anzahl der Isopreneinheiten in der Seitenkette)	-
$R^2_{adj.}$	Adjustiertes R^2 , Anpassungsmaß	-
RHT	Respirationshemmtest	-
RP	Reversed Phase	-
rpm	Umdrehungsgeschwindigkeit der Zentrifuge; rounds per minute	-
s	Relative Standardabweichung	%
SPE	Solid Phase Extraction	-
SV	Schlammvolumen	ml/l
SVI	Schlammvolumenindex	ml/g
SWP	Safety Working Party	-
t _{1/2}	Halbwertszeit	d

Symbol	Bedeutung	Einheit
TGD	Technical Guidance Documents	-
ThCO ₂	Theoretische Kohlendioxidproduktion	-
ThSB	Theoretischer Sauerstoffbedarf	mg O ₂ / mg Testsubstanz
TIC	Total Inorganic Carbon, totaler anorganischer Kohlenstoff	mg/l
TOC	Total Organic Carbon, Gesamtkohlenstoffgehalt	mg/l
TOXSWA	Toxic Substances in Surface Waters	-
TS	Trockensubstanz	g/l
TZW	DVGW-Technologiezentrum Wasser	-
UBA	Umweltbundesamt	-
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser	-
VF	Verdünnungsfaktor	-
VIT	Vermicon Identification Technology	-
VT	Versuchstag	-
Wdh	Wiederholung	-
WHT	Wachstumshemmtest	-
μ	Wachstumsrate	h ⁻¹

1 EINLEITUNG

In den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden vereinzelt Befunde zum Vorkommen von Arzneimitteln in der Umwelt publiziert. Dabei handelt es sich zum einen vor allen Dingen um Lipidsenker, wie beispielsweise Clofibrat aber auch anlässlich der Einführung der Antibabypille um Hormone, d. h. in diesem Fall 17- α -Ethinylestradiol (Kümmerer 2001). Mitte der 80er Jahre erschien dann von Richardson und Bowron (1985) eine relativ ausführliche Studie, die sich mit dem Austrag von Arzneimitteln aus Kläranlagen und ihre biologische Abbaubarkeit beschäftigte.

Eine große Aufmerksamkeit erfuhr das Thema Arzneimittel und somit auch Antibiotika in der Umwelt dann ab Mitte der 90er Jahre durch die Arbeit mehrerer Arbeitsgruppen in Deutschland sowie dann auch im europäischen Rahmen (Hirsch et al. 1999, Ternes 1998, Al-Ahmad et al. 1999). Konzentrierten sich die meisten Arbeiten zunächst auf leicht nachzuweisende und von der Menge her einigermaßen bedeutende Wirkstoffe, wie beispielsweise Lipidsenker, Betablocker oder Schmerzmittel sowie besonders gefährliche Stoffe, zum Beispiel Zytostatika, so wurden später systematischere Ansätze gewählt, bei denen nicht nur der Nachweis der Stoffe, sondern auch deren Verhalten, wie z. B. ihre Abbaubarkeit und ihre Wirkung auf Organismen in der Umwelt betrachtet wurde (Heberer und Stan 1995, Ternes 1998).

Ab Ende der 90er Jahre gelangten so auch Antibiotika zunächst insbesondere in der aquatischen Umwelt in das Blickfeld des Interesses. Es konnten Antibiotika im Zulauf und Ablauf von Kläranlagen nachgewiesen werden (Hirsch et al. 1999). Dies ist zwischenzeitlich weltweit der Fall, wie viele Studien aus Deutschland, Italien, der Schweiz, den USA, wie auch den Niederlanden und anderen Ländern zeigen (Golet et al. 2002, Färber 2002, Kolpin et al. 2002, Sacher et al. 2001, Hamscher et al. 2002, Zuccato et al. 2001).

Im Zusammenhang mit Antibiotika stellte sich daher die Frage, welche Risikofelder mit dem Eintrag und dem Vorkommen dieser Stoffgruppe in der aquatischen und terrestrischen Umwelt verbunden sein können. Da zum Zeitpunkt des Beginns des Vorhabens dazu nur vereinzelte Daten vorlagen (Al-Ahmad und Kümmerer 1998) lag es nahe, in einem umfassenden Ansatz die mit dem Eintrag von Antibiotika in die Umwelt möglicherweise verbunden Risiken zu untersuchen. Aufgrund der Wirkungsweise der Antibiotika stand neben ihrer biologischen Abbaubarkeit und inwieweit diese überhaupt mit klassischen Tests geprüft werden kann, auch ihre Wirkung gegenüber

Bakterien in der Umwelt im Vordergrund. Die Frage nach dem Beitrag der Antibiotika in der Umwelt zur zunehmend beobachteten Resistenz wurde im vorliegenden Vorhaben nicht bearbeitet, da es sich um eine eigene sehr umfangreiche Fragestellung handelt. Zwischenzeitlich konnte dazu ebenfalls ein Forschungsvorhaben im Auftrag des BMBF (Kümmerer et al. 2002) abgeschlossen werden, so dass auch zu dieser Frage zwischenzeitlich weiterführende Informationen vorliegen.

Definition von Antibiotika

Antibiotika spielen heutzutage in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eine große Rolle. Der Begriff Antibiotika (anti = gegen und biotikos = zum Leben gehörig) wurde 1941 von Selman Waksman geprägt.

Laut dem Römpp Chemielexikon (1989) handelt es sich um „niedermolekulare Sekundärmetabolite von Mikroorganismen, die in geringen Konzentrationen das Wachstum niederer Organismen hemmen oder sie abtöten“ (Definition nach Waksman). Nach Auterhoff et al. (1994) sind „Antibiotika chemisch definierte Stoffe biologischen Ursprungs, die, ohne Enzymcharakter zu besitzen, in niedrigen Konzentrationen Wachstumsvorgänge hemmen. Diese Definition grenzt ein Antibiotikum - auch wenn es synthetisch gewonnen wird - von einem Chemotherapeutikum ab, das nicht in der Natur vorkommt, und schließt chemisch undefinierbare Zubereitungen aus“. Der erweiterte Antibiotikabegriff schließt heute neben antibiotisch wirksamen Inhaltsstoffen von Pflanzen und Tieren chemisch oder biosynthetisch hergestellte Substanzen mit ein. Man rechnet derzeit mit ca. 8.000 bekannten antibiotisch wirksamen Stoffen. Heutzutage werden die Begriffe Antibiotika und Chemotherapeutika zunehmend synonym verwendet, bzw. Antibiotika als Teilmenge der Chemotherapeutika aufgefasst. Im Folgenden werden unter dem Begriff Antibiotika sowohl die Antibiotika entsprechend Definition nach Waksman als auch die synthetischen Chemotherapeutika mit antibiotischer Wirkung (z. B. Sulfonamide) verstanden.

Problemstellung

Seit dem Beginn der Großproduktion von Penicillin gegen Ende des 2. Weltkriegs stieg einerseits die Zahl der unterschiedlichen antibiotischen Wirkstoffe als auch andererseits deren eingesetzte Menge. Zuerst als Medikament in der Humanmedizin verwendet, kamen Antibiotika auch schnell in der Veterinärmedizin zum Einsatz. Hier wurden sie nicht nur zu Therapiezwecken, sondern, im Zeitalter der Massentierhal-

tung, auch als Leistungsförderer eingesetzt. Diese sollen bis 2006 in der EU vollständig verboten werden, wie auch weltweit eine Reduktion angestrebt wird (European Commission 2002).

Human- und Veterinärantibiotika gehören nicht zuletzt hinsichtlich der Verbrauchsmengen zu den wichtigsten Arzneimitteln. Die Fédération Européenne De La Santé Animale (FEDESA 2001) schätzte, dass 1999 in den 15 EU-Staaten und der Schweiz zusammen 13.216 t Antibiotika verbraucht wurden, davon 8.528 t in der Humanmedizin. 1998 wurden Antibiotika und Chemotherapeutika in Deutschland 45,8 Millionen Mal verordnet, d. h. im Durchschnitt erhielt nahezu jeder zweite Bundesbürger einmal im Jahr ein Antibiotikum (Höffler 2000).

Antibiotika fallen nicht unter das Chemikaliengesetz, sondern im Allgemeinen unter das Arzneimittelgesetz. Darin wurde der Umweltaspekt in der Vergangenheit nur rudimentär berücksichtigt. In Deutschland ist eine Umweltprüfung von Humanarzneimitteln erst seit der 7. bzw. 8. Novelle des Arzneimittelgesetzes (AMG) vom 25.02. bzw. 7.09.1998 für neu zuzulassende Arzneimittel vorgeschrieben. Der § 22 der 7. Novelle des AMG verlangt Angaben zur Verminderung von Gefahren für die Umwelt, die von der Aufbewahrung, der Anwendung oder der Beseitigung eines Arzneimittels ausgehen können. Ergibt die Prüfung der Umweltverträglichkeit eines Humanarzneimittels Anlass zur Besorgnis, entscheidet gemäß § 28 der 8. Novelle des AMG die zuständige Bundesbehörde (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM) im Einvernehmen mit dem Umweltbundesamt (UBA) über Auflagen zum Schutz der Umwelt. Bei der Prüfung von Veterinärpharmaka ist hierfür das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) verantwortlich. Die Zulassung eines Arzneimittels kann aufgrund von Risiken für die Umwelt nicht versagt werden. Die Prüfung des Stoffes im Rahmen des Zulassungsverfahrens soll auf der Grundlage eines von der Safety Working Party der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) veröffentlichten Diskussionspapiers (CPMP/SWP/4447/00, Draft vom 24.07.2003) erfolgen, das bis 2004 zu einem Leitfaden weiterentwickelt werden soll. Der gegenwärtige Entwurf sieht eine zweiphasige Risikobewertung vor. In Phase I wird die mögliche Konzentration des Wirkstoffs in der Umwelt berechnet. Überschreitet diese einen Triggerwert von 0,01 µg/l im Oberflächengewässer, erfolgt eine vertiefte Bewertung in Phase II auf der Basis ökotoxikologischer Studien und weiterer Untersuchungen zum Verbleib der Substanz in der Umwelt. Die EU Guidline soll für Neuzulassungen und andere erstmals in Verkehr gebrachte Arzneimittel gelten, falls

der Verbrauch der Arzneimittel deutlich steigt. Für bereits zugelassene Medikamente bzw. Altstoffe, d. h. alle derzeit angebotenen Humanpharmaka, wird sich dadurch die Datenlage nicht ändern.

In Deutschland überschreiten Arzneimittel-Wirkstoffe mit einem Verbrauch größer als 545 kg/Jahr den Triggerwert von 0,01 µg/l. Somit müssten etwa 350 synthetische Wirkstoffe einer Umweltprüfung unterzogen werden. Darüber hinaus sind auch Wirkstoffgruppen mit besonderer Umweltrelevanz wie z. B. genotoxische und hormonelle Stoffe zu prüfen, deren Jahresverbrauch kleiner als 545 kg ist (Rönnefahrt 2002). Nach der Bilanzierung von Stoffen mit antibiotischer Wirkung (Kümmerer und Henninger 2003) überschreiten 41 von 71 bilanzierten Antibiotika und 8 von 17 bilanzierten Antimykotika den Verbrauch von 545 kg/Jahr. Der Gesamtverbrauch von Humanantibiotika in Deutschland lag im Jahre 1998 bei 411,6 t (Kümmerer und Henninger 2003).

Anders gestaltet sich die Situation für Veterinärpharmaka. Auf EU-Ebene gibt es für Neuzulassungen von der EMEA seit 1998 ein mehrstufiges Konzept für die umweltchemische und ökotoxikologische Prüfung. Altstoffe bleiben allerdings trotz oft noch beträchtlicher Aufwandmengen ausgenommen. In Phase I des Bewertungskonzeptes steht die Abschätzung des Umweltgefährdungspotenzials auf Basis der physikochemischen Stoffeigenschaften sowie der Anwendungsmengen und Anwendungsmuster im Vordergrund. Für umweltrelevante Wirkstoffe folgen dann in der Phase II-Prüfung aufwändige Abbau-, Sorptions- und Toxizitätstests. So sind bezüglich des Rückstandsverhaltens im Boden z. B. die substanzspezifischen DT_{50} -, DT_{90} - bzw. K_{OC} -Werte jeweils in 3 verschiedenen Bodenarten zu ermitteln (Kreuzig 2002).

Man muss dazu allerdings feststellen, dass die gesetzliche Regelung für die Untersuchung der Umweltauswirkungen der Arzneimittel einem Puzzlespiel gleicht. Der Grund dafür ist, dass umweltbezogene Vorschriften nicht von Anfang an im Arzneimittelrecht vorhanden waren, sondern erst nachträglich, ansatzweise und zunächst in „Randvorschriften“ („was ist zu prüfen?“) statt in zentrale Vorschriften („welches sind die Zulassungsvoraussetzungen?“) Eingang gefunden haben.

Aus der medizinischen Literatur ist bekannt (Simon und Stille 1993), dass Antibiotika z. T. bis zu 90% unmetabolisiert nach Verabreichung wieder ausgeschieden werden. Die ausgeschiedenen Wirkstoffe und ihre Metabolite gelangen im Fall der Humanpharmaka über Urin und Faeces ins Abwasser und somit auch in die kommunalen Kläranlagen (Hirsch et al. 1999), im Fall der Veterinärpharmaka gelangen sie in

die Gülle. Ihre Wirkung können Antibiotika, die gerade wegen ihrer antimikrobiellen Effekte verwendet werden, auch in Kläranlagen entfalten. Werden sie in Kläranlagen nicht biologisch abgebaut bzw. an Klärschlamm adsorbiert, gelangen sie in Oberflächengewässer. Im Falle einer späteren Klärschlammausbringung in der Landwirtschaft können zudem adsorbierte Stoffe wieder freigesetzt werden. Unklar ist, welche Rolle die Entsorgung von alten Präparaten und die Deponierung von Klärschlamm spielt. Durch unsachgemäße Entsorgung über Toiletten gelangen Antibiotika direkt ins Abwasser, über Deponiesickerwässer aus Hausmüll und Klärschlamm werden die Wirkstoffe in Grund- und Oberflächenwasser eingetragen (Schneider et al. 2001). Einen bedeutenden Faktor stellen zudem die Veterinärantibiotika dar, die durch das Ausbringen von Gülle oder Festmist in den Boden, nach Starkregenereignissen oder über die Bodenpassage in Gewässer transportiert werden (Boxall et al. im Druck). Inwieweit sie über das Abwasser in Oberflächengewässer und über Uferfiltrat ins Trinkwasser gelangen und damit wieder den Menschen erreichen können, ist eine offene Frage.

Einträge von Veterinärpharmaka in Abwasser und Oberflächengewässer sind direkt über die Anwendung in der Aquakultur und u. U. aus Schlachthöfen und Geflügelschlächtereien möglich. In der landwirtschaftlichen Tierhaltung werden Antibiotika zur Therapie und Prophylaxe eingesetzt und zusätzlich als Futtermittelzusatzstoffe zur Wachstumsförderung. Untersuchungen zum Vorkommen von Veterinärantibiotika in der Gülle und Böden wurden bisher nur wenige durchgeführt (Rassow und Schaper 1996, Winckler und Grafe 2000, Hamscher et al. 2002, Golet et al. 2002). Über das Verhalten der Antibiotika und ihrer Metabolite im Boden, ihre Effekte auf Bodenorganismen ist wenig bekannt (Boxall et al. im Druck).

Somit bestehen zahlreiche Eintragspfade von Antibiotika in die aquatische Umwelt, unter denen die kommunalen Kläranlagen eine zentrale Rolle spielen. In Kläranlagenabläufen konnten Antibiotika-Konzentrationen von mehreren µg/l nachgewiesen werden (Hirsch et al. 1999), wodurch negative Auswirkungen auf aquatische Organismen und mikrobielle Biozönosen denkbar sind. Eine im Auftrag des Umweltbundesamtes erstellte Studie über mögliche Umweltprobleme in Zusammenhang mit Arzneimitteln (Römbke et al. 1996) zeigte auf, dass bezüglich der Umweltrelevanz von Chemikalien mit pharmakologischer Wirkung erhebliche Kenntnislücken bestehen. Dies betrifft in besonderem Maße auch die biologische Abbaubarkeit und Elimination von Antibiotika und ihren Metaboliten in kommunalen Kläranlagen, ihre Wir-

kung auf Bakterien der Abwasserreinigung sowie ihren Verbleib in der aquatischen Umwelt und damit verbundene Effekte auf aquatische Organismen. Die Gründe für dieses Defizit sind laut Kümmerer (1998) unter anderem in unzureichenden analytischen Verfahren zur Bestimmung solcher Substanzen und ihrer Wirkung in Abwasser und Belebtschlamm zu suchen. Offen ist u. a. die Frage, inwieweit dafür die vorhandenen standardisierten Tests geeignet sind.

Die Erfahrung mit Kläranlagen zeigt, dass akute Effekte weniger auf die mikrobielle Biozönose, z. B. durch Selektionsprozesse zurück zuführen sind, sondern vor allem auf längerfristige Veränderungen der mikrobiologischen Populationen und Vorgänge in Kläranlagen beruhen. Um die Risiken von Stoffen zu beurteilen, die in die Umwelt gelangen, sind neben ihrer Toxizität auch ihre Persistenz und Akkumulation, d. h. ihre Beständigkeit in der Umwelt und ihre Anreicherung in Organismen, von großer Bedeutung. So können sich schwer abbaubare und/oder akkumulierbare Schadstoffe, sei es durch Adsorption oder durch Aufnahme durch Organismen in der Umwelt ausbreiten und anreichern. Entsprechend ist neben der Toxizität und Akkumulierbarkeit die biologische Abbaubarkeit von großer Wichtigkeit bei der Umweltrisikoausschätzung von Stoffen. Eine Schlüsselstellung in Bezug auf die Abbaubarkeit auch von Arzneimitteln nehmen die biologischen Prozesse in Abwasserreinigungsanlagen ein. Neben der Mineralisierung (=Endabbau) haben in kommunalen Kläranlagen weitere Eliminationsfaktoren wie Adsorption und/oder Strippung eine besondere Bedeutung. Adsorbierte Verbindungen gelangen mit dem Primärschlamm aus der mechanischen Abwasserreinigungsstufe und dem Überschussschlamm aus der biologischen Abwasserreinigungsstufe in der Regel in den Faulturn, wobei ein Teil des organisch gebundenen Kohlenstoffs unter Bildung von Faulgas mineralisiert wird. Hierbei können auch Xenobiotika anaerob abgebaut werden, wobei die allgemeine Auffassung besteht, dass die anaerobe Abbaubarkeit prinzipiell nicht aus dem Verhalten unter aeroben Bedingungen vorhergesagt werden kann (TGD 2003).

In den letzten Jahren rückte ein weiteres Problemfeld in den Vordergrund wissenschaftlichen Interesses. So konnte ein starker Anstieg der Resistenz von pathogenen Mikroorganismen gegenüber Antibiotika verzeichnet werden. Nach Untersuchungen des Umweltbundesamtes (Umweltbundesamt 1997) wirken Kläranlagen als Sammelpunkte für diese resistenten Bakterien, die vorwiegend durch die Anwendung an Menschen und der Tiermast entstehen, und sorgen zudem für deren Nachschub in die Umwelt. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von resisten-

ten Keimen und niedrigen Umweltkonzentrationen an Arzneimitteln konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Über den Nachweis von Pharmaka in der aquatischen Umwelt wurde schon verschiedentlich berichtet. Zwischenzeitlich beschäftigt die Frage nach der Bewertung des Vorkommens von Pharmaka in der Umwelt auch die Öffentlichkeit. So erschien u. a. im Sommer 1999 im SPIEGEL ein Artikel über das Vorkommen von Pharmaka in Grund-, Brunnen- und Trinkwasser und die möglichen Folgen (Brendel 1999).

Systematische Untersuchungen zum Umweltverhalten von Antibiotika fehlen aber bisher, wenn man von einer Literaturstudie (Römbke et al. 1996) und einzelnen Veröffentlichungen (Halling-Sørensen et al. 1998, Kümmerer 2001) absieht.

Nicht für alle relevanten Wirkstoffe sind Verfahren zur analytischen Bestimmung im Abwasser bekannt. So analysierten Hirsch et al. (1999) vor allem Penicilline und Tetracycline. Pietsch et al. (1998) bestimmten Sulfonamide in Oberflächengewässern. Nach bisherigen Kenntnissen dürfte auch den Chinolonen eine Bedeutung zukommen. Von Hartmann et al. (1998) wird zwar eine Methode zur Bestimmung von Ciprofloxacin in Krankenhausabwasser berichtet, aber Untersuchungen zum Vorkommen im kommunalen Abwasser und in Belebtschlämmen wurden nicht durchgeführt. Golet et al. (2001) haben eine Bestimmungsmethode für 9 Fluorchinolone entwickelt und zwei davon (Ciprofloxacin und Norfloxacin) auch in Kläranlagenabläufen nachgewiesen. Methoden zur Bestimmung von Antibiotika in Belebtschlämmen wurden bisher wohl auch aufgrund der komplexen Matrix und der notwendigen Erfahrung noch nicht in der Literatur beschrieben. Bei der Untersuchung von Belebtschlamm stellt sich die Frage, ob in dieser komplexen Matrix die Wirkstoffe vollständig wieder gefunden werden, da sie durch Adsorption, Einschluss in die Matrix oder gar Einbau in die organische Matrix der analytischen Bestimmung entzogen sein könnten (vgl. z. B. Bildung von gebundenen Rückständen in Böden und Sedimenten; Hamscher et al. 2002, Van der Heide und van der Plas 1987). In der Literatur wird beispielsweise über starke Adsorption von Chinolonen in Böden oder an Sedimente berichtet (Marengo et al. 1997, Weerasinghe und Towner 1997). Ob dies auch für Belebtschlämme im Fall der Antibiotika von Bedeutung ist, ist noch nicht vollständig geklärt (Hertle 1999). Aufgrund der großen Kenntnislücken über den Eintrag, das Verhalten, den Verbleib und die Wirkung von Antibiotika auf die Umwelt, können die damit verbundenen Risiken derzeit nicht abgeschätzt werden.

Vorgehensweise

Die Datenlage war in Bezug auf die oben genannten Fragestellungen unsystematisch und völlig unzureichend, um beispielsweise entscheiden zu können, welche Risikofelder bezüglich des Eintrags von Antibiotika in die aquatische Umwelt zu erwarten sind, ob Handlungsbedarf zur Risikoverminderung besteht und welche Maßnahmen hierfür sinnvollerweise ergriffen werden sollten.

Vor diesem Hintergrund hat das Umweltbundesamt 1999 ein Forschungs- und Entwicklungsvorhaben (F&E-Vorhaben 298 63 722) mit dem Titel „Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt – Prüfung der biologischen Abbaubarkeit ausgewählter Antibiotika und ihres Einflusses auf die Reinigungsleistung kommunaler Kläranlagen – Identifizierung möglicher Risikofelder“ (Kurztitel: „Abbauverhalten von Antibiotika“) ins Leben gerufen.

Der medizinische und gesellschaftliche Wert von Arzneistoffen ist unumstritten, dennoch sollten die enormen Kenntnislücken systematisch aufgearbeitet werden. Dazu war es notwendig, in Form einer Prioritätensetzung aus der Fülle der in der Human- und Veterinärmedizin bzw. der Tiermast eingesetzten antibiotischen Wirkstoffe eine Auswahl zu treffen. Es wurden daher 18 Antibiotika und Antimykotika auf Basis der Ergebnisse einer umfangreichen Literaturrecherche ausgewählt und experimentell untersucht.

Ausgangspunkt der Untersuchungen war, dass Wirkungen nur dann auftreten können, wenn tatsächlich eine Exposition gegeben ist. Es wurde daher der Eintrag von Antibiotika und ihrer aktiven Hauptmetabolite in die aquatische Umwelt am Beispiel der Kleinstadt Kenzingen erfasst. Anschließend sollte geklärt werden, ob die nach Verbrauchsmengen und Wirkschwellen auf aquatische Organismen bedeutendsten Antibiotika im Zulauf, Ablauf, Belebt- und Überschussschlamm kommunaler Kläranlagen unterschiedlicher Größe und Einleiterstruktur nachweisbar sind (Kenzingen, Forchheim und Wyhl). Hierfür mussten geeignete Analyseverfahren zur Bestimmung der ausgewählten Antibiotikawirkstoffe entwickelt werden. Aufgrund der chemisch sehr verschiedenen Stoffklassen waren dazu unterschiedliche Kombinationen von Extraktions-, Trenn- und Detektionsbedingungen erforderlich. Diese Analysemethoden sollten auch zur begleitenden Untersuchung der Antibiotika in standardisierten Abbautests im niedrigen Konzentrationsbereich (ng/l - µg/l) eingesetzt werden. Die an den realen Kläranlagen erhaltenen Ergebnisse dienten als Grundlage für eine Stoffmengenbilanzierung.

In den Untersuchungen wurde die biologische Abbaubarkeit und Wirkung der Antibiotika bei realitätsnahen Konzentrationen mit standardisierten Testsystemen (OECD, ISO EN, DIN) und Analysen überprüft, um abschätzen zu können, ob diese Substanzen in den Kläranlagen abgebaut werden, ob sie die mikrobiologischen Vorgänge der Abwasserreinigung beeinflussen und wo sie ggf. nach der Abwasserreinigung verbleiben. Damit sollte auch geprüft werden, inwieweit die standardisierten Tests für die Untersuchung von Antibiotika geeignet sind. Weitere Abbau- und Verteilungsprozesse, wie z. B. abiotische Elimination durch Adsorption an Belebtschlamm, Hydrolyse, Flüchtigkeit, Primärabbau, Mineralisation wurden betrachtet.

Aufgrund ihrer bioziden Wirkung und teilweise schlechten Wasserlöslichkeit der Antibiotika stößt die Anwendung der genormten OECD-Tests zur Bestimmung der Abbaubarkeit und Toxizität auf Schwierigkeiten, so dass höherwertige Simulationstests gefordert werden, in denen die Prüfsubstanzen im umweltnahen Konzentrationsbereich zugesetzt werden. Aufgrund des damit verbundenen beträchtlichen Aufwandes sollte die Anwendbarkeit der von der OECD vorgeschlagenen Standardmethoden für die Substanzgruppe der Antibiotika untersucht werden. Zusätzlich wurden Untersuchungen zur anaeroben Hemmwirkung und anaeroben Abbaubarkeit von Antibiotika durchgeführt.

Die untersuchten Hemmeffekte von Antibiotika auf die Bakterien wurden für die EC_x -Bestimmung verwendet. Da die Standardmethode zur Bestimmung von EC_x -Werten (Probit-/Logitregression) auf sehr spezifischen Annahmen beruht, wurden ihr flexibleren Funktionen gegenübergestellt, die mit Hilfe von nichtlinearer Regression an die Daten angepasst wurden.

Der Einfluss verschiedener Antibiotika auf die Bakterienpopulationen von Belebtschlammproben wurde mit Hilfe der FISH (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung)-Technik unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Gensonden analysiert. Diese innovative mikrobiologische Analyseverfahren ermöglicht es, Bakterien spezifisch, individuell und kultivierungsunabhängig direkt in der Untersuchungsprobe (in situ) zu visualisieren, zu identifizieren und zu quantifizieren. Ziel dieser Untersuchungen war es, mögliche Verschiebungen in der Bakterienpopulationszusammensetzung unter dem Einfluss von insgesamt 9 verschiedenen Antibiotika im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollanlagen festzustellen.

Neben der Abschätzung der Wirkung, nimmt die Abschätzung von Umweltkonzentrationen für solche Stoffe, für die noch keine analytischen Messdaten vorliegen, breiten

Raum ein. Das dazugehörige Expertensystem EUSES soll ebenfalls bis Ende 2003 aktualisiert werden. Für Pflanzenschutzmittel steht ein neuer, detaillierter Satz an Modellen für die Expositionsabschätzung (FOCUS) seit April 2003 zur Verfügung (siehe <http://viso.ei.jrc.it/focus/>). Es steht also eine ganze Reihe von Modellen zur Verfügung, deren Eignung für Arzneimittel geprüft werden muss. Zwei Ansätze hierzu werden im Folgenden diskutiert. Dabei sind zum einen die speziellen Eintragspfade für Arzneimittel, als auch ihr geringes Verbrauchsvolumen im Vergleich zu vielen Industriechemikalien, als auch spezielle Verhaltensweisen in der Umwelt zu beachten (s. z. B. Cunningham im Druck). Daneben haben die Arzneimittel oft spezielle Wirkungen, die durch die üblichen ökotoxikologischen Tests nicht unbedingt erfasst werden. Die Güte von Simulationsmodellen im Hinblick auf eine realistische Voraussage von Umweltkonzentrationen kann anhand von analytischen Messdaten geprüft werden.

Die gewonnenen Daten über die Eintragsmengen von Antibiotika in kommunales Abwasser, Kenntnisse über ihr Verhalten in der Abwasserreinigung, ihre Elimination in kommunalen Kläranlagen und ihren Eintrag in Oberflächengewässer bzw. ihren Verbleib in der Umwelt sowie ihre Wirkungen auf aquatische Organismen wurden dazu genutzt, um die Identifizierung und Charakterisierung der Risikofelder zu ermöglichen, die mit dem Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt verbunden sind.

Grundlagen für eine Risikoabschätzung wurden im Rahmen dieses Forschungsvorhabens für den Bereich von Antibiotika erarbeitet.

Gliederung der durchgeführten Arbeiten anhand der Projektträger und Unterauftragsnehmer:

IUK

- Literaturrecherche und Auswahl der zu untersuchenden Stoffe
- Bilanzierung der Antibiotikaverbräuche bzw. der Antibiotikaeinträge in die kommunale Kläranlage der Stadt Kenzingen (nördlich. Breisgau)
- Beprobung der Kläranlagenzuläufe, -abläufe sowie des Belebt-, Faul-, bzw. Überschussschlammes der kommunalen Kläranlagen in Forchheim, Kenzingen, Wyhl (nördl. Breisgau)
- Untersuchung der biologischen Abbaubarkeit anhand des CBT (OECD 301 D : 1992) unter Berücksichtigung des Primärabbaus

- Bestimmung des Abbau- und des Verteilungsverhaltens von Antibiotika in Modellkläranlagen (OECD 303 A : 1981) mit zusätzlicher Untersuchung der Wirkungen auf mikrobielle Populationen (Chemotaxonomie)
- Untersuchung der Hemmwirkung ausgewählter Antibiotika auf Bakterien in der aquatischen Umwelt anhand des RHT (OECD 209 : 1984), des WHT mit *Ps. putida* (EN ISO 10712 L8 : 1995) und *E. faecalis*, des NHT (DIN EN ISO 9509 : 1995) sowie Anpassung der Testmethoden an die Prüfsubstanz Antibiotikum
- Identifizierung, Beschreibung und Bewertung von Risikofeldern

TZW

- Etablierung geeigneter qualitativer und quantitativer analytischer Methoden und Extraktionsverfahren zur Bestimmung der ausgewählten Prüfsubstanzen in festen und flüssigen Matrices
- Erfassung der Antibiotikakonzentrationen in Kläranlagenzu-, -abläufen sowie in Beleb-, Faul- bzw. Überschussschlamm der kommunalen Kläranlagen Forchheim, Kenzingen, Wyhl (nördlich. Breisgau)
- Begleitende analytische Untersuchungen der Antibiotikakonzentrationen im CBT im niedrigen Konzentrationsbereich (ng/l – µg/l)
- Begleitende analytische Untersuchungen der Antibiotikakonzentrationen im Kombinationstest und im Test der Anaeroben Abbaubarkeit jeweils im niedrigen Konzentrationsbereich
- Literaturrecherche zum Abbauverhalten von Amoxicillin

Hydrotox

- Entwicklung des Kombinationstests aus konventionellem Sturmtest OECD 301 B und Zahn-Wellens Test OECD 302 B
- Bestimmung der inhärenten Abbaubarkeit mittels des Kombinationstests
- Durchführung des anaeroben Hemmtest gemäß des Methodenvorschlags ISO/TC 147/SC5
- Bestimmung der anaeroben Abbaubarkeit nach EN ISO 11734 : 1995

Vermicon AG

- Untersuchung der Wirkungen von Antibiotika auf mikrobielle Populationen in Modellkläranlagen mittels FISH

Lehrstuhl für Computer gestützte Statistik, Universität Dortmund

- Statistische Auswertung der chemotaxonomischen Daten und Verfahrensparameter der Kläranlagensimulationsversuche
- Vergleich der statistischen Methoden für die ECx-Berechnung

ECT

- Prüfung des Abbaus von ¹⁴C-markierten Antibiotika (Benzylpenicillin, Trimethoprim, Ceftriaxon) bei umweltrelevanten, niedrigen Konzentrationen im Kläranlagensimulationsversuch in Anlehnung an die Prüfrichtlinie OECD 303 A (OECD 1981)
- Modellierung des Verhaltens in Kläranlagen, Oberflächengewässern, Sedimenten und bei der Bodenpassage mit den beiden Modellen EUSES und EMEA

2 METHODEN

2.1 LITERATURRECHERCHE UND STOFFAUSWAHL

Die Literaturrecherche wurde durchgeführt, um relevante Informationen zu finden, die Grundlage für die Stoffauswahl sind. Gesucht wurden Daten zur Produktions- und Verbrauchsmenge von Antibiotika, Verhalten antibiotischer Wirkstoffe in der Kläranlage, Vorkommen und Verhalten in der Umwelt sowie Abbaubarkeit und Persistenz, Verhalten gegenüber Wasserorganismen und physiko-chemische Daten.

Die Recherche wurde in folgenden Literatur- und Faktendatenbanken durchgeführt:

Literaturdatenbanken

- Medline
- Biosis
- Current Contents (mit Life Science; Agri; Bio, Environ Science and Phys, Chem, Earth Science)
- Chemical Abstracts
- Biolog
- Biodeg
- Ulidat
- Ufordat

Faktendatenbanken

- Chemis
- Ecotox mit Aquire, Terretox und Phytotox
- HSDB
- IUCLID
- RIGOLETTO
- MITI
- IRPT
- GSBL
- Chemfinder
- Beilstein

Da die Datenbanken z. T. unterschiedlich aufgebaut sind, konnte nicht mit ein und derselben Suchstrategie in allen Datenbanken gesucht werden. Die ursprünglichen Suchbegriffe wurden, basierend auf den Erfahrungen, die während der Recherche gemacht wurden, laufend an die jeweilige Datenbank angepasst.

Der Begriff „antibiotic*“ wurde mit folgenden Suchbegriffen kombiniert:

adsorption, agriculture, amount, animal feed, aquaculture, aquatic organisms, aquatic tox*, bioaccumulation, biomagnification, degradation, ecotox*, elimination, environment, fattening, feed additives, food (production), (ground) water, growth promot*, husbandry, import/export, livestock, sediment, sewage, sludge, soil, surface water, usage, veterinary medicine.

Ausgewählt wurden Stoffe:

- die ein PEC/PNEC-Verhältnis $>0,1$ haben. Je höher der Verbrauch und je niedriger die Wirkschwellen sind, desto eher wurde ein Stoff ausgewählt.
- bei denen zumindest einige Daten zur Human- oder Ökotoxizität vorlagen.
- die in der Umwelt relativ persistent sind. Es wurden physiko-chemische und biologische Umwelteigenschaften berücksichtigt, wie Abbaubarkeit bzw. Persistenz und Verteilung in der Umwelt ($\log P_{OW} >3$, $K_{OC} >500$).
- bei denen eine analytische Methode zur Bestimmung aus Umweltmatrices beschrieben ist oder bei denen nach derzeitigem Wissenstand von einer analytischen Bestimmbarkeit ausgegangen werden konnte.
- die in der Umwelt bereits nachgewiesen wurden.
- die vom Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC) und Umweltbundesamt (UBA) Österreich als besonders umweltrelevant eingestuft wurden.
- die verschiedenen Grundstrukturen haben. Aus jeder der bedeutenden Antibiotika-Gruppe (Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Aminoglycosid-Antibiotika, Tetracycline, Makrolid-Antibiotika, Glykopeptide, Chinolone, Sulfonamide, Stoffe gegen parasitäre Erkrankungen) wurde mindestens ein Vertreter ausgewählt. Sowohl Human- als auch Veterinärpharmaka wurden berücksichtigt.

Auf Grundlage dieser oben genannten Auswahlkriterien und der erhobenen Daten wurde zunächst die Liste der in Deutschland zugelassenen Antibiotika (243) auf 67

Substanzen eingeschränkt. Aus dieser Liste wurden dann die 18 für die experimentellen Untersuchungen vorgesehenen Stoffe (17 Antibiotika, 1 Antimykotikum) ausgewählt.

Einige Antibiotika, die ausschließlich im Veterinärbereich ihre Anwendung finden und in der EU auch nur für die Behandlung von Tieren zugelassen sind, wurden wegen der geringen Wahrscheinlichkeit des Eintrags in die aquatische Umwelt nicht berücksichtigt, da die damit verbundene Fragestellung am Beispiel anderer Stoffe, die sowohl in der Human- als auch der Veterinärmedizin Verwendung finden, bearbeitet werden können. Carbadox wurde aus der ersten Stoffauswahl herausgenommen, weil es seit dem 01.09.1999 nicht mehr als Futtermittelzusatzstoff erlaubt ist. Der Altstoff Chloramphenicol ist seit 1994 als Futtermittelzusatzstoff verboten und wurde in der weiteren Stoffauswahl nicht berücksichtigt. In der Tierhaltung sind als Leistungsförderer außerdem noch Avoparcin seit dem 11.01.1996, Tylosin, Spiramycin, Zn-Bacitracin und Virginiamycin seit dem 01.07.1999 und Olaquinox seit dem 01.09.1999 nicht mehr zugelassen (Kamphues 1999). Daher ist anzunehmen, dass das Vorkommen von diesen Stoffen in der Umwelt eine abnehmende Tendenz und Relevanz haben wird.

2.2 EINTRAG UND NACHWEIS VON ANTIBIOTIKA IN DER AQUATISCHEN UMWELT

2.2.1 Bilanzierung Kenzingen

2.2.1.1 ANTIBIOTIKAVERBRAUCH IN KENZINGEN

Die Bilanzierung der Antibiotikaverbräuche bzw. der Antibiotikaeinträge in die kommunale Kläranlage der Stadt Kenzingen (nördlicher Breisgau) wurde über 16 Monate hinweg durchgeführt. Es wurde eine kleinere Gemeinde gewählt, da in diesem Fall alle „Quellen“ für Antibiotika (Apotheken, Praxen und gegebenenfalls Krankenhäuser) in einem überschaubaren Rahmen sind. Es ist zwar wahrscheinlich, dass einige Einwohner von Kenzingen ihre Medikamente außerorts bezogen haben oder die in Kenzingen bezogenen Wirkstoffe nicht in die Kläranlage Kenzingen gelangten (Pendler), aber es wurde für die Bilanzierung angenommen, dass diese Anteile grob durch Nicht-Ortsansässige kompensiert wurden.

Die Stadt Kenzingen besteht aus der Kerngemeinde (6.698 Einwohner) und den Stadtteilen Nordweil (834 Einwohner), Bombach (630 Einwohner) und Hecklingen (892 Einwohner), wobei Nordweil nicht in die Kläranlage Kenzingen einleitet (Rathaus Kenzingen 2001). In der Gemeinde Kenzingen gibt es drei Apotheken, siebzehn niedergelassene Ärzte und zwei Altersheime, die ihre Medikamente jedoch über die Apotheken beziehen und damit in die Bilanzierung mit einbezogen sind. Bei der Datenerfassung haben die Mitarbeiter der Apotheken die Verschreibungen für Patienten aus Nordweil nicht in die Bilanzierung aufgenommen. Krankenhäuser gibt es keine.

Als Grundlage der Bilanzierung wurden von den ortsansässigen Apotheken Verkaufsdaten über antibiotische Medikamente für den Zeitraum von Oktober 2000 bis Januar 2002 bereitgestellt. Ebenso wurde bei sämtlichen Ärzten in Kenzingen angefragt, ob und wie viele Antibiotikamuster sie an ihre Patienten verteilt haben. Mit Hilfe der Roten Liste (Rote Liste® 1997 und 2001) konnte für jedes ausgegebene Medikament ermittelt werden, welcher Wirkstoff in welcher Menge enthalten ist. Berücksichtigte man die einzelnen Packungsgrößen, konnte mit den Verkaufsdaten eine Mengenauflistung aller Wirkstoffe erstellt werden, die im Laufe eines Jahres (Oktober 2000 bis September 2001) in Kenzingen abgegeben wurden.

Aus dem Jahresverbrauch eines Wirkstoffes wurde über die jeweilige Ausscheidungsrate die zu erwartende Wirkstoffmenge im Abwasser errechnet gemäß der von der EU (1994) vorgeschlagenen Formel:

$$(1) \quad \text{PEC [g/l]} = \frac{A \cdot (100 - E)}{365 \cdot P \cdot V \cdot D \cdot 100}$$

wobei

A der Verbrauch in kg/a,

E die Elimination in %,

P die Anzahl der Einwohner (Kenzingen ohne Nordweil: 8.220),

V das Abwasservolumen pro Einwohner in m³/d (Annahme: 0,13 m³/d),

D der Verdünnungsfaktor mit Oberflächenwasser (D=1).

Dies ermöglichte die Abschätzung der zu erwartenden Umweltkonzentration (PEC) eines Wirkstoffes und der Zulaufkonzentration in der Kläranlage.

Für die Berechnung des durchschnittlichen Abwasseranteils in Oberflächenwasser wird das Verdünnungsverhältnis 1:10 für das kommunale Abwasser in Oberflächenwasser in Mitteleuropa angesetzt (EU 1994, Gartiser 1999).

2.2.1.2 BEPROBUNG DER KOMMUNALEN KLÄRANLAGE KENZINGEN

An der Kläranlage der Stadt Kenzingen wurden insgesamt drei Probenahmekampagnen durchgeführt: eine im Sommer (22.08.01 - 28.08.01), eine im Herbst (27.11.01 - 03.12.01) und eine im Winter (19.01.02 - 04.02.02). Es wurden von der Kläranlage während dieser Beprobungsphasen täglich Proben (Zulauf/Ablauf zeitversetzt gemäß hydraulischer Verweildauer, Belebtschlamm, Überschussschlamm, s. Abb. 1) genommen und zu einer Wochenmischprobe vereinigt. Die Proben wurden mit Natriumazid fixiert.

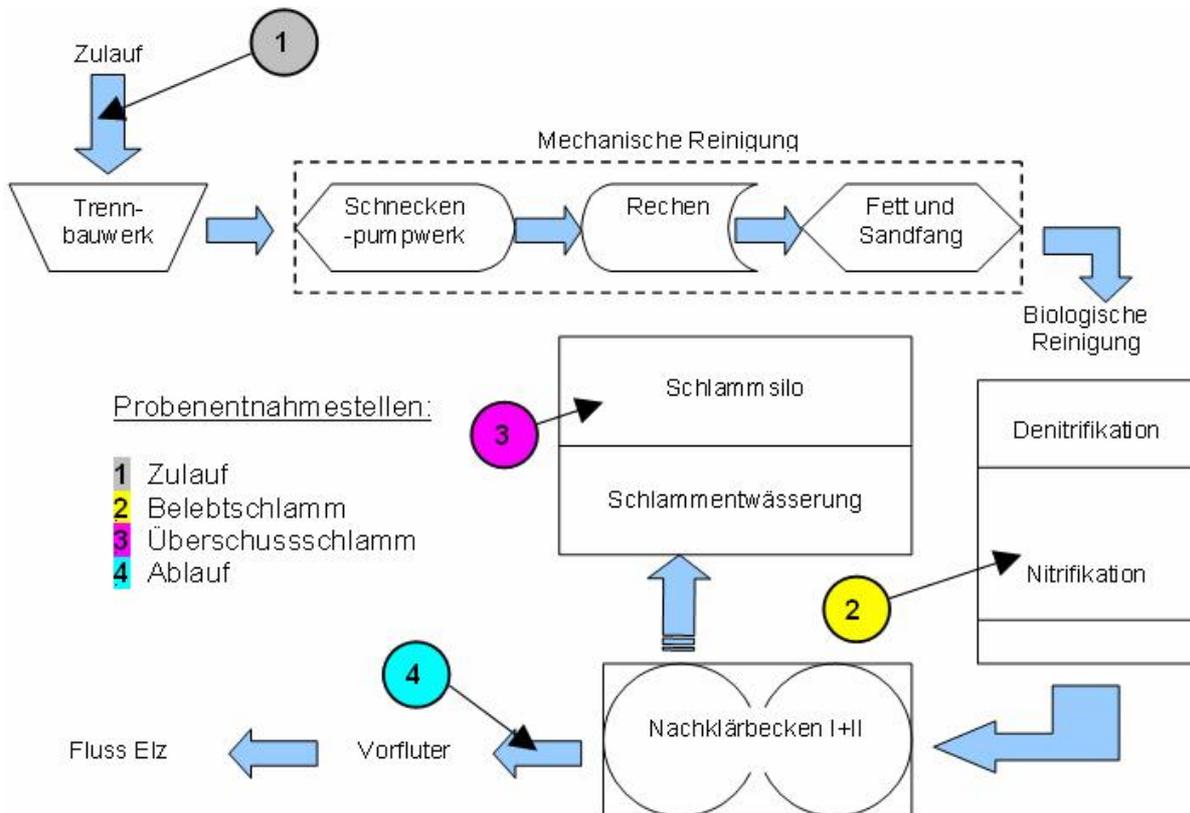


Abb. 1: Schema der Kläranlage Kenzingen mit markierten Probenahmestellen

Die kommunale Kläranlage in Kenzingen ist für 13.000 Einwohnergleichwerte ausgelegt. Unter den Einleitern befinden sich zwei Altenheime. Als Besonderheit verfügt die Kläranlage in Kenzingen über eine Regenwasserbehandlung. Im Trennbauwerk wird das Niederschlagswasser vom normalen Abwasserstrom abgetrennt und gesondert behandelt, bevor es dem Vorfluter zugeleitet wird. Das Abwasser gelangt über eine Rechanlage in den Sandfang und Fettabscheider. Dort werden Öle und Fette sowie Sand vom Abwasser abgetrennt. Danach wird das Abwasser den Belebungsbecken zugeführt. In den darauf folgenden Nachklärbecken wird das Wasser vom Belebtschlamm getrennt und in den Vorfluter geleitet (s. Abb. 1).

Um einen Überblick über die tatsächlichen Wirkstoffeinträge in Kenzingen zu erhalten, wurden die Proben vom DVGW – Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe auf verschiedene Arzneistoffe untersucht. Die Methoden sind von Lange et al. (2001) und Sacher et al. (2001) ausführlich beschrieben.

2.2.2 Kläranlagen Forchheim und Wyhl

2.2.2.1 BEPROBUNG DER KOMMUNALEN KLÄRANLAGE FORCHHEIM

Der Abwasserzweckverband Breisgauer Bucht betreibt die Kläranlage Forchheim. Sie ist für 600.000 Einwohnergleichwerte ausgelegt und verarbeitet sämtliche Abwässer aus dem Großraum Freiburg. Unter den Abwassereinleitern sind sämtliche im Stadtgebiet Freiburg befindlichen Krankenhäuser und Altenheime. Das Abwasser wird über die Rechenanlage zum Sandfang geleitet. Nachdem es von groben und wasserunlöslichen Verschmutzungen gereinigt wurde, gelangt es in die Vorklärbecken und danach ins Belebungsbecken, wo die biologische Reinigungsstufe stattfindet. Vom Belebungsbecken wird das Abwasser in die Absetzbecken geleitet. Über eine Flockungsfiltration gelangt das gereinigte Abwasser in den Vorfluter. Im Winter 2003 wurde die Kläranlage während drei Wochen (vom 13. Januar bis 3. Februar) beprobt (s. Abb.2).

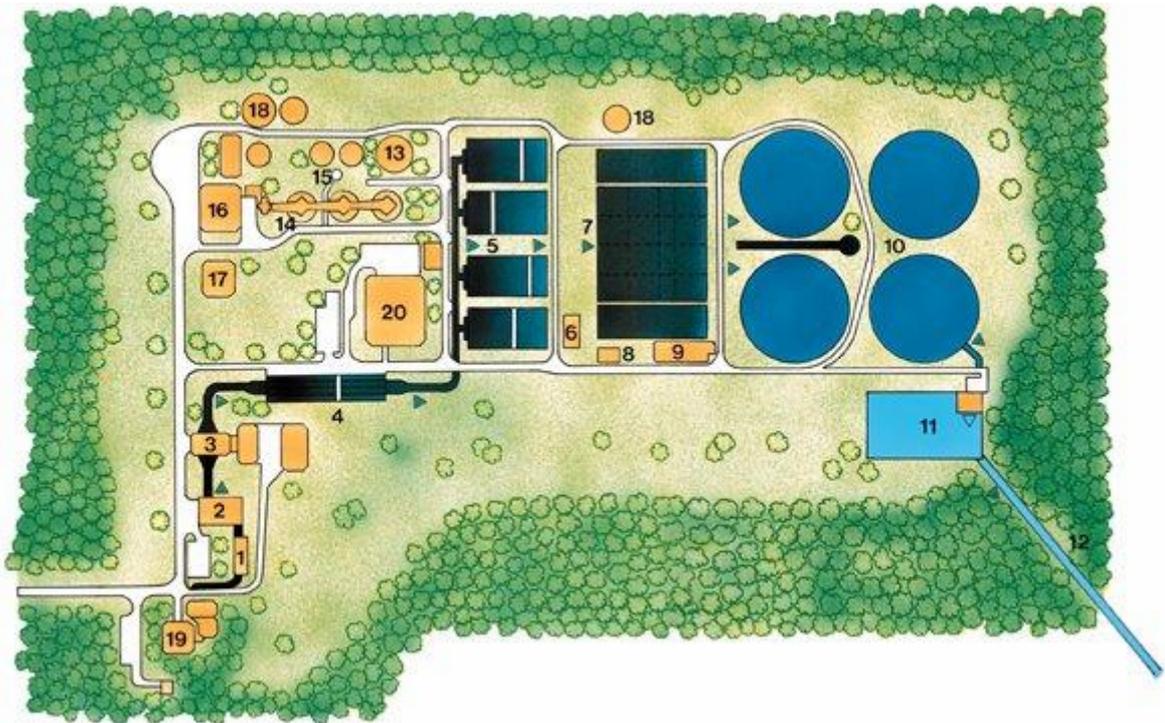


Abb. 2: Aufbau der Kläranlage Forchheim

Legende:

1 Einlaufpumpwerk	6 Rücklaufschlammpumpe	11 Flockungsfiltration	16 Schlammentwässerung
2 Pumpwerk	7 Belebungsbecken	12 Ablauf zum Vorfluter	17 Schlamm-trocknung
3 Rechenanlage	8 Dosier- u. Fällmittelstation	13 Schlammvoreindicker	18 Gasbehälter
4 Sandfang	9 Gebläsestation	14 Faultürme	19 Verwaltung
5 Vorklärbecken	10 Nachklärbecken	15 Schlamm-nacheindicker	20 Betriebsgebäude

2.2.2.2 BEPROBUNG DER KOMMUNALEN KLÄRANLAGE WYHL

Die Kläranlage Wyhl gehört zum Abwasserzweckverband nördlicher Kaiserstuhl und ist für 14.300 Einwohnergleichwerte ausgelegt. Das Einzugsgebiet der Kläranlage setzt sich aus landwirtschaftlichen, Obst- und Weinbau Betrieben, Gewerbe und Haushalten zusammen. Unter den Abwassereinleitern befinden sich keine Krankenhäuser und Altenheime. In der Anlage läuft das Abwasser über eine Rechenanlage, welche grobe Verunreinigungen entfernt, zum Sandfang. Dort setzen sich schwerere Feststoffe ab. Nach dem Sandfang gelangt das Wasser ins Vorklärbecken. Über eine Denitrifikationsstufe wird das Wasser ins Belebungsbecken geführt, in welchem die organische Substanz abgebaut wird. Im folgenden Nachklär- oder Absetzbecken wird der Schlamm aus dem Belebungsbecken vom nunmehr gereinigten Abwasser getrennt und das Wasser in den Vorfluter geleitet. Die Kläranlage in Wyhl wurde im Frühjahr 2003 über 3 Wochen (vom 10. März – 31. März) beprobt (s. Abb. 3).

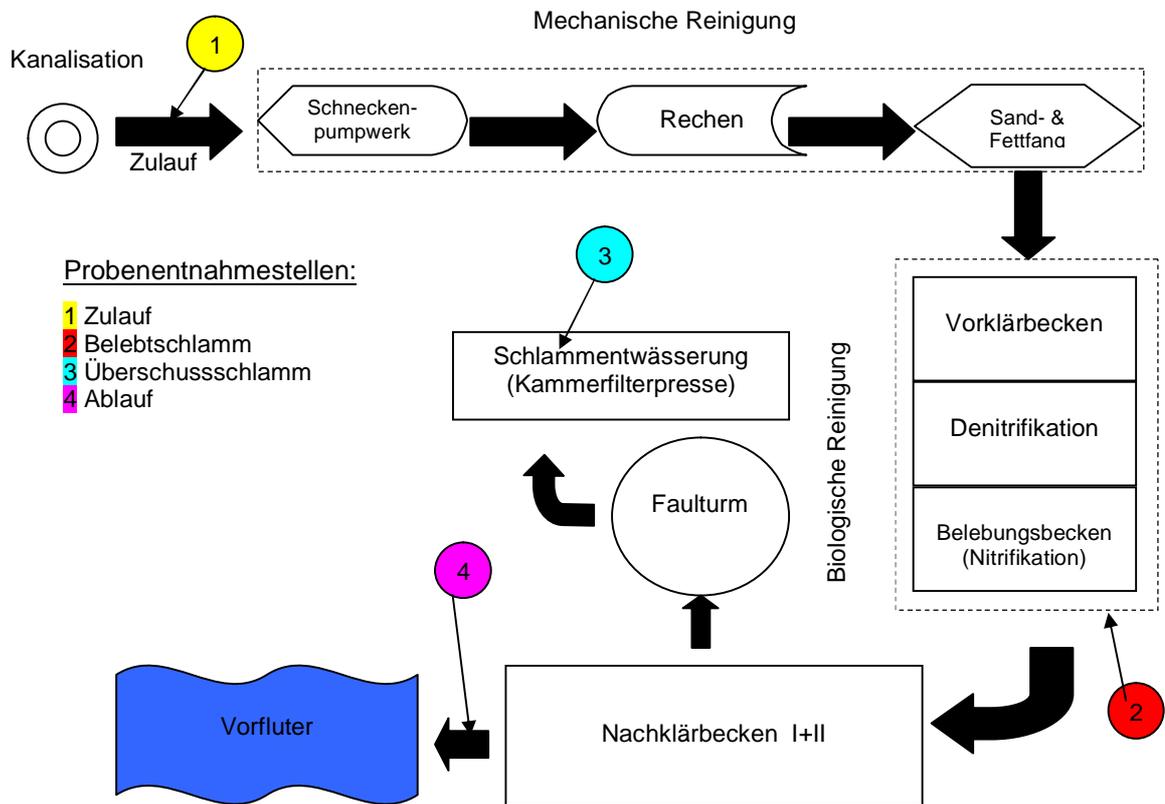


Abb. 3: Aufbau der Kläranlage Wyhl mit markierten Probennahmestellen

2.2.3 Analytische Verfahren zur Antibiotika-Bestimmung aus wässrigen Proben

Die Entwicklung von Analysemethoden war ein Projektziel. Da die Ergebnisse der Methodenentwicklung gleichzeitig für andere Projektbereiche verwendet wurden, sind die Ergebnisse bereits in diesem Kapitel aufgeführt.

Zur spurenanalytischen Bestimmung der in diesem Projekt ausgewählten Antibiotika-Wirkstoffe wurde eine Fest-Flüssig-Extraktion mit nachfolgender Hochleistungsflüssigkeitschromatografie gekoppelt mit der Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS-MS) angewendet (s. Abb. 4).



Abb. 4: Vorgehensweise bei der spurenanalytischen Bestimmung von Antibiotika-Rückständen aus Wasser mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie gekoppelt mit der Elektrospray-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS-MS) nach Fest-Flüssig-Extraktion.

In Tabelle 1 ist der abschließende Stand der Methodenentwicklung für die 18 Zielverbindungen dieses Projekts wiedergegeben. Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, ist es gelungen, für 14 der insgesamt 18 ausgewählten Antibiotika-Wirkstoffe eine geeignete *quantitative* Analysenmethode für deren Bestimmung aus der Wasserphase zu entwickeln und zu validieren.

Tab. 1: Übersicht über die verschiedenen Kombinationen von Extraktions- und HPLC-ESI-MS-MS-Methoden zur Bestimmung der 18 Zielverbindungen aus der Wasserphase; bezüglich der Beschreibung der Extraktions- und HPLC-ESI-MS-MS-Methoden s. 3.2.3.1-3.2.3.3

Nr.	Name	Extraktionsmethode	HPLC-ESI-MS-MS-Methode
1	Amoxicillin	I	3
2	Benzylpenicillin	I	3
3	Ceftriaxon	-	-
4	Cefuroxim	II	6
5	Chlortetracyclin	I	4
6	Clarithromycin	I	1
7	Clindamycin	I	1
8	Erythromycin	I	1
9	Gentamycin*	(I)	7
10	Imipenem	-	-
11	Metronidazol	I	2
12	Monensin*	(I)	2
13	Nystatin	III	7
14	Ofloxacin	I	5
15	Sulfamethoxazol	I	2
16	Tetracyclin	I	4
17	Trimethoprim	I	2
18	Vancomycin	III	7

* Keine Validierung über das Gesamtverfahren möglich (s. Text)

Zwei Wirkstoffe, das Aminoglykosid Gentamycin und der Polyether-Inophor Monensin, können für *qualitative* Untersuchungen realer Proben im niederen Konzentrationsbereich mitgeführt werden. Bei diesen beiden Wirkstoffen traten Reproduzierbarkeitsprobleme bereits auf der Ebene der reinen HPLC-ESI-MS-MS-Bestimmung auf. Diese Schwierigkeiten bei der Quantifizierung sind literaturbekannt (Heller et al. 2000, Volmer et al. 1998), hängen mit der chemischen Struktur dieser Wirkstoffe zusammen und konnten auch in diesem Projekt nicht gelöst werden.

Ceftriaxon und Imipenem ließen sich bislang selbst ohne Probenvorbereitung in keines der entwickelten Verfahren für den niederen Konzentrationsbereich integrieren.

Ein Erfahrungsaustausch mit einer Arbeitsgruppe an der EAWAG (Dübendorf, Schweiz) hat ergeben, dass dort dasselbe Phänomen bei Ceftriaxon beobachtet wurde. Dieser Wirkstoff lässt sich zwar bei direkter Infusion in das ESI-Interface des LC-MS-MS-Systems gut detektieren, sobald jedoch eine HPLC-Trennung vorgeschaltet wird, wird der Wirkstoff nicht mehr wiedergefunden. Aufgrund dieses ungelösten analytischen Problems und da eine ausreichend große Anzahl von analysier-

baren anderen Wirkstoffen zur Verfügung steht, wurde dieser Wirkstoff nicht bei Untersuchungen im niederen Konzentrationsbereich eingesetzt.

Ein Erfahrungsaustausch mit den Projektpartnern am IUK hat ergeben, dass der Wirkstoff Imipenem selbst bei höheren Konzentrationen im mg/l-Bereich in Lösung so instabil ist, dass er sich innerhalb von Minuten bis Stunden abbaut und sich daher einer quantitativen analytischen Bestimmung entzieht. Diese Beobachtung deckt sich auch mit der am TZW gemachten Erfahrung, dass dieser Wirkstoff im niederen Konzentrationsbereich nicht mehr wieder gefunden wird. Dies bedeutet gleichzeitig, dass in realen Kläranlagen nicht mit dem Auftreten des unveränderten Wirkstoffs zu rechnen ist. Damit war die Relevanz dieses Antibiotikums für weitere Untersuchungen im Rahmen dieses Projekts nicht mehr gegeben.

Im Folgenden sind die einzelnen analytischen Schritte beschrieben.

2.2.3.1 EXTRAKTION

Die Extraktion der Antibiotika-Wirkstoffe aus der Wasserprobe erfolgt mittels automatisierter Fest-Flüssig-Extraktion an einer Extraktionsapparatur des Typs Autotrace (Zymark). Die drei verschiedenen Extraktionsmethoden sind in Tabelle 2 gegenübergestellt.

Bei Extraktionsmethode I, mit der die meisten der Zielverbindungen aus der Wasserphase angereichert werden, werden 500 ml der Probe mit einem für die Umweltanalytik entwickelten Polymer-Festphasenmaterial (Isolute ENV+, IST) extrahiert. Optimierungsversuche für die Anreicherung von Wirkstoffen aus der Stoffklasse der Penicilline aus Karlsruher Trinkwasser ergab eine signifikante Steigerung der Wiederfindung durch Zusatz von EDTA zur Wasserprobe. Da dieser Zusatz keinen erkennbaren Nachteil auf die Extraktion anderer Wirkstoffe hat, wurde er bei allen Extraktionsmethoden beibehalten.

Auf Grund der größeren inneren Oberfläche besitzen die in den letzten Jahren in der Umweltanalytik verstärkt eingesetzten Adsorbermaterialien auf Polymerbasis ein Vielfaches der Adsorptionskapazität herkömmlicher RP-Phasen auf Kieselgelbasis. Daher wird für die Extraktion der Antibiotika-Wirkstoffe aus 500 ml Wasserprobe nur 100 mg Festphasenmaterial verwendet. Bedingt durch diese hohen Adsorptionskapazitäten sind Polymerphasen für eine möglichst unspezifische Adsorption, bei der ganz unterschiedlich polare Verbindungen gleichzeitig erfasst werden sollen, gut geeignet.

Tab. 2: Analytische Bedingungen bei den drei Fest-Flüssig-Extraktionsmethoden zur Bestimmung der ausgewählten Antibiotika-Wirkstoffe aus Wasser

	Methode I	Methode II	Methode III
Festphase	100 mg Isolute ENV+	100 mg Isolute ENV+	1000 mg Isolute C18
Konditionierung	1.) 5 ml Acetonitril	1.) 5 ml Methanol	1.) 5 ml Methanol
	2.) 5 ml Wasser	2.) 5 ml Wasser + 0,1% Ameisensäure	2.) 5 ml Wasser
Probe	500 ml, pH 5 mit HCl + 7 mmol/l EDTA-Dinatriumsalz	1000 ml + 7 mmol/l EDTA-Dinatriumsalz	1000 ml + 7 mmol/l EDTA-Dinatriumsalz
Anreicherungs-geschwindigkeit	7,0 ml/min	10 ml/min	10 ml/min
Trocknung	Stickstoff, 30 min	Stickstoff, 45 min	Stickstoff, 45 min
Elution	1.) 5 ml Acetonitril	1.) 5 ml Methanol	1.) 5 ml Methanol
	2.) 5 ml Acetonitril/ Wasser 90/10 (v/v) + 0,5 ml Triethylamin	2.) 5 ml Acetonitril/ Wasser 90/10 (v/v) + 0,5 ml Triethylamin	2.) 5 ml Acetonitril/ Wasser (pH 2,2 mit Trifluoressigsäure) 90/10 (v/v)
Rekonstitution	100 µl Wasser/ Acetonitril 95/5 (v/v) + 20 mmol Ammoniumacetat	100 µl Wasser/ Acetonitril 90/10 (v/v)	100 µl Wasser/ Acetonitril 95/5 (v/v)

Nachteilig an der Verwendung von Polymerphasen sind allerdings die großen Elutionsvolumina für gut adsorbierbare Verbindungen, sodass bei der Elution mit wenigen Millilitern organischen Lösungsmittels in manchen Fällen recht niedrige Wiederfindungsraten resultieren. Bei Versuchen im TZW-Labor hatte sich gezeigt, dass für bestimmte Verbindungen, z. B. für die Makrolide, Elutionsvolumina von 10 ml und mehr nötig sind, um die Zielverbindungen auch nur annähernd quantitativ wiederzufinden. Laut Lieferantenangaben ist das Isolute ENV+-Material an der Oberfläche zusätzlich partiell hydroxyliert. Dies erklärt die hohe Affinität und damit großen Elutionsvolumina O- und N-funktioneller Verbindungen gegenüber diesem Material. Die im Rahmen dieses Projekts zu bearbeitenden Antibiotika-Wirkstoffe besitzen teilweise gleich mehrere solcher Gruppen im Molekül, sodass manche Verbindungen nur recht schwer eluierbar sind. Dieser Effekt ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Analyten und dem Absorbiermaterial zurückzuführen. Um dem entgegenzuwirken, wird die Elutionsstärke des Eluenten durch Zugabe von Triethylamin im zweiten Elutionsschritt erhöht.

Bei Extraktionsmethoden II und III werden jeweils 1000 ml Probe extrahiert, wobei als Festphasenmaterial für die Extraktion von Vancomycin und Nystatin nach Methode III wegen der hohen Molmasse dieser Verbindungen anstelle des Polymermaterials 1 g Isolute C18-Material (IST) eingesetzt wird. Auch bei den Elutionsmitteln unterscheiden sich die drei verschiedenen Extraktionsmethoden (s. Tab. 2).

2.2.3.2 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

Für die Trennung und Detektion der ausgewählten Antibiotika-Wirkstoffe werden sieben verschiedene HPLC-ESI-MS-MS-Methoden angewendet (s. Abb. 4, Tab. 1). Zur flüssigchromatografischen Trennung wird ein HPLC-System des Typs 1090 Serie II (Hewlett Packard) mit binärem Gradientensystem, thermostatisierbarem Säulenraum, variablem Autoinjektor und automatischem Probengeber verwendet. Bei den Methoden 1 bis 3 findet die chromatographische Trennung auf einer Säule des Typs Nucleosil 120-3-C18 (250 x 2 mm, 3 µm Partikelgröße, 120 Å Porenweite, Bischoff, Leonberg) mit einer Vorsäule des Typs Nucleosil 120-7-C18 (10 mm x 2,1 mm, 7 µm Partikelgröße, 120 Å Porenweite, Bischoff, Leonberg) statt. Bei den Methoden 4 bis 7, bei denen mit stärker sauren Eluenten gearbeitet wird, kommt eine Säule des Typs Luna 5µ C18(2) (250 mm x 2,0 mm, 5 µm Partikelgröße, 100 Å Porenweite, Phenomenex, Aschaffenburg) zum Einsatz. Die Vorsäule ist hier eine SecurityGuard™-Säule (4 mm x 2 mm, Phenomenex, Aschaffenburg) mit derselben Festphase. Bei allen sieben Methoden beträgt die Temperatur im Säulenraum 40°C, die Flussrate bei der Gradientenelution 0,2 ml/min und das Injektionsvolumen an Extrakt 12,5 µl. Das Laufmittel A ist bei allen Methoden das wässrige Elutionsmittel, das Laufmittel B das organische Elutionsmittel. Neben den individuellen Detektionsparametern für jede einzelne Zielverbindung bei der Tandem-Massenspektrometrie unterscheiden sich die Methoden im pH-Wert der Laufmittel, in den Zusätzen zu den Laufmitteln und in den unterschiedlichen Gradientenprogrammen. Die Methoden 4 und 5 weisen gleiche Chromatografiebedingungen auf. Hier besteht der Unterschied nur in der zeitprogrammierten MRM-Detektion (MRM = Multiple Reaction Monitoring). Durch die Auftrennung in zwei Methoden wird die Zahl an substanzspezifischen Übergängen innerhalb eines Retentionszeitfensters klein und damit die Messzeit und die Empfindlichkeit groß gehalten.

Die Laufmittelzusammensetzungen und die Gradientenprogramme aller sieben Methoden sind in den Tabellen 3-8 aufgeführt.

Tab. 3: Chromatografische Bedingungen für die HPLC-Bestimmung von Clarithromycin, Erythromycin und Clindamycin

Methode 1 "Makrolide"		
Trennsäule:	Nucleosil 120-3-C18 (250 x 2 mm, 3 µm Partikelgröße, 120 Å Porenweite, Bischoff, Leonberg)	
Laufmittel A:	Wasser, 20 mmol/L Ammoniumacetat	
Laufmittel B:	Acetonitril:Wasser 2:1 (v:v), 20 mmol/l Ammoniumacetat	
Fluss:	0,2 ml/min	
Temperatur:	40°C	
Injektionsvolumen:	12,5 ml	
Zeit in min	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0	80	20
3	80	20
13	20	80
18	0	100
29	0	100
29,5	80	20
30	80	20

Tab. 4: Chromatografische Bedingungen für die HPLC-Bestimmung von Metronidazol, Monensin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim

Methode 2 "Chemotherapeutika"		
Trennsäule:	Nucleosil 120-3-C18 (250 x 2 mm, 3 µm Partikelgröße, 120 Å Porenweite, Bischoff, Leonberg)	
Laufmittel A:	Wasser, 20 mmol/l Ammoniumacetat, pH 5,1 (mit Essigsäure)	
Laufmittel B:	Acetonitril:Wasser 2:1 (v:v), 20 mmol/l Ammoniumacetat	
Fluss:	0,2 ml/min	
Temperatur:	40°C	
Injektionsvolumen:	12,5 ml	
Zeit in min	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0	98	2
1	98	2
6	90	10
20	0	100
29	0	100
29,5	98	2
30	98	2

Tab. 5: Chromatografische Bedingungen für die HPLC-Bestimmung von Amoxicillin und Benzylpenicillin

Methode 3 "Penicilline"		
Trennsäule:	Nucleosil 120-3-C18 (250 x 2 mm, 3 µm Partikelgröße, 120 Å Porenweite, Bischoff, Leonberg)	
Laufmittel A:	Wasser, 2 mmol/l Ammoniumformiat	
Laufmittel B:	Acetonitril:Methanol 2:1 (v:v), 2 mmol/l Ammoniumformiat	
Fluss:	0,2 ml/min	
Temperatur:	40°C	
Injektionsvolumen:	12,5 ml	
Zeit in min	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0	95	5
1	50	50
22	50	50
23	0	100
29	0	100
29,5	95	5
30	95	5

Tab. 6: Chromatografische Bedingungen für die HPLC-Bestimmung von Chlor-tetracyclin, Ofloxacin und Tetracyclin

Methode 4 "Tetracycline" und Methode 5 „Fluorchinolone“		
Trennsäule:	Luna 5µ C18(2) (250 mm x 2,0 mm, 5 µm Partikelgröße, 100 Å Porenweite, Phenomenex, Aschaffenburg)	
Laufmittel A:	Wasser, 5 mmol/l Oxalsäure, pH = 2,1	
Laufmittel B:	Acetonitril:Wasser + 10 mmol/l Oxalsäure 4:1 (v:v)	
Fluss:	0,2 ml/min	
Temperatur:	40°C	
Injektionsvolumen:	12,5 ml	
Zeit in min	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0	90	10
5	80	20
15	40	60
20	0	100
28	0	100
29,5	90	10
30	90	10

Tab. 7: Chromatografische Bedingungen für die HPLC-Bestimmung von Cefuroxim

Methode 6 „Cephalosporine“		
Trennsäule:	Luna 5 μ C18(2) (250 mm x 2,0 mm, 5 μ m Partikelgröße, 100 Å Porenweite, Phenomenex, Aschaffenburg)	
Laufmittel A:	Wasser, 0,1% Ameisensäure, pH = 2,3	
Laufmittel B:	Acetonitril:Methanol 2:1 (v:v), 0,1% Ameisensäure	
Fluss:	0,2 ml/min	
Temperatur:	40°C	
Injektionsvolumen:	12,5 ml	
Zeit in min	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0	98	2
1	98	2
15	0	100
26	0	100
29,5	98	2

Tab. 8: Chromatografische Bedingungen für die HPLC-Bestimmung von Vancomycin und Nystatin und Gentamycin

Methode 7 „Vancomycin“		
Trennsäule:	Luna 5 μ C18(2) (250 mm x 2,0 mm, 5 μ m Partikelgröße, 100 Å Porenweite, Phenomenex, Aschaffenburg)	
Laufmittel A:	Wasser, Trifluoressigsäure bis pH = 2,3	
Laufmittel B:	Acetonitril	
Fluss:	0,2 ml/min	
Temperatur:	40°C	
Injektionsvolumen:	12,5 ml	
Zeit in min	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0	90	10
5	80	20
15	40	60
20	0	100
28	0	100
29,5	90	10
30	90	10

2.2.3.3 ELEKTROSPRAY-TANDEM-MASSENSPEKTROMETRIE

Die Antibiotika-Wirkstoffe werden mit einem an das HPLC-System gekoppelten Elektrospray-Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie-System des Typs API 2000

LC/MS/MS-System (Applied Biosystems, Langen) quantitativ bestimmt. Der gesamte Eluent gelangt splitlos mit einer Flussrate von 200 µl/min in das sog. Turbolon-Spray-Interface. In diesem Interface wird die Trocknung des Sprays durch einen erhitzten Stickstoffgasstrom (Heater Gas: 200°C) unterstützt, wodurch die thermische Belastung der Analyten vergleichsweise gering gehalten wird.

Alle ausgewählten Antibiotika-Wirkstoffe werden im Positiv-Ionen-Modus detektiert. Folgende Ionisierungs-Spannungen (Ion Spray Voltage) werden bei den verschiedenen Methoden angewendet: 5,5 kV bei den Methoden 1 „Makrolide“, 2 „Chemotherapeutika“ und 3 „Penicilline“, 5,0 kV bei den Methoden 4 „Tetracycline“, 5 „Fluorchinolone“ und 6 „Cephalosporine“ sowie 4,5 kV bei der Methode 7 „Vancomycin“. Als sog. Nebulizer-Gas, Heater Gas, Curtain-Gas und als Stoßgas für die Fragmentierung der Vorläufer-Ionen in der Stoßzelle (CID, Collision Induced Dissociation bei einem Druck von etwa 3 torr im zweiten Quadrupol) dient Reinststickstoff.

Die MS-MS-Parameter der Zielverbindungen wurden zunächst im kontinuierlichen Durchfluss mit Einzelsubstanzlösungen optimiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zusammensetzung des Lösungsmittels etwa der Zusammensetzung entspricht, die später bei der Gradientenelution vorliegt. Zunächst wurden die besten Bedingungen zur Erzeugung des jeweiligen Vorläufer-Ions (Precursor Ion) ermittelt. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen ergaben die Quasi-Molekülionen $[M+H]^+$ für die meisten der Antibiotika-Wirkstoffe die intensivsten Signale im sog. Precursor Ion Scan. Nachdem die optimalen Bedingungen zur Isolierung dieser Precursor-Ionen festgelegt waren, wurden die Quadrupol- und Linsenbedingungen für die Fragmentierung in der Stoßzelle des Massenspektrometers optimiert. Die aus der gesamten Optimierungsprozedur hervorgehenden Übergänge, d. h. die Precursor/Product Ion-Paare sind in der Tabelle 9 aufgelistet. Obwohl sich für die eindeutige Identifizierung auch weitere, schwächere Übergänge eignen, wurden für die quantitative spurenanalytische Bestimmung der Antibiotika-Wirkstoffe im MRM-Modus jeweils nur zwei intensive und möglichst charakteristische Übergänge eines Wirkstoffs verwendet.

Tab. 9: Precursor- und Produkt-Ionen (m/z-Werte), die für die Bestimmung der 18 in diesem Projekt zu bearbeitenden Wirkstoffe im MRM-Modus verwendet wurden

	Precursor Ion	Product Ion I	Product Ion II
Amoxicillin	365,8	349,0	208,2
Benzylpenicillin	335,0	176,1	160,1
Ceftriaxon	555,0	396,1	167,1
Cefuroxim	442,1	363,9	335,9
Chlortetracyclin	478,9	462,0	444,2
Clarithromycin	748,3	590,2	158,2
Clindamycin	424,9	377,1	126,1
Erythromycin A	734,5	576,4	158,2
Dehydrato-Erythromycin A	716,6	558,4	158,2
Gentamycin C1	478,1	322,4	157,2
Gentamycin C1a	450,3	322,3	160,1
Gentamycin C2/C2a	464,3	322,2	160,1
Imipenem	300,3	142,0	98,2
Metronidazol	172,1	127,8	82,0
Monensin-Na	693,3	501,2	461,2
Nystatin	926,4	297,3	105,1
Ofloxacin	362,0	318,1	261,1
Sulfamethoxazol	254,1	155,8	107,8
Tetracyclin	445,0	427,1	410,1
Trimethoprim	291,1	261,2	230,2
Vancomycin	725,4	144,1	100,3

2.2.3.4 GRUNDVALIDIERUNG

Mit den ausgewählten Antibiotika-Wirkstoffen wurden verschiedene Validierungsuntersuchungen durchgeführt. Dabei wurden die Konzentrationen der Wirkstoffe in der für Umweltproben realistischen Größenordnung gewählt. Im Einzelnen wurden folgende Daten ermittelt:

- Ableitung der statistischen Verfahrenskenndaten Nachweisgrenze (NG), Bestimmungsgrenze (BG) und relative Verfahrensstandardabweichung (V_{x0}) nach DIN 32645, 1994 sowie des Korrelationskoeffizienten r an Hand einer 10-Punkte-Kalibrierung aus Karlsruher Trinkwasser im Bereich zwischen 5 und 110 ng/l des jeweiligen Wirkstoffes;

- Bestimmung der Wiederfindungsraten aus Karlsruher Trinkwasser (WF(TW)) und aus Oberflächenwasser (WF(OF), Matrix: Rhein bei Karlsruhe) auf dem Konzentrationsniveau 100 ng/l. Hierzu wurden jeweils fünf Parallelproben extrahiert und die mittlere Peakfläche nach Extraktion wurde ins Verhältnis zu der Peakfläche gesetzt, die sich aus einer 10-Punkte-Kalibrierung für die reine HPLC-ESI-MS-MS-Bestimmung ergibt;
- Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Gesamtverfahrens, ausgedrückt durch die Standardabweichungen $\sigma(\text{TW})$ und $\sigma(\text{OW})$, an Hand der fünffachen Konzentrationsbestimmung aus Trinkwasser und Oberflächenwasser auf dem Konzentrationsniveau 100 ng/l;
- Bestimmung der Reproduzierbarkeit der HPLC-ESI-MS-MS-Bestimmung, ausgedrückt durch die Standardabweichung $\sigma(\text{HPLC})$, an Hand der fünffachen Konzentrationsbestimmung auf dem gleichen Absolutniveau von 100 ng/l wie bei der Analyse über das Gesamtverfahren.
- Bei einzelnen Wirkstoffen wurde von der beschriebenen Validierungsprozedur leicht abgewichen. Es handelt sich hierbei um die drei Wirkstoffe Clindamycin, Nystatin und Vancomycin. Bei Nystatin und Vancomycin wurden wegen der geringeren Nachweisempfindlichkeit etwas höhere Konzentrationen für die Bestimmung der Verfahrenskenndaten gewählt. Die abgeänderten Bedingungen sind in der Fußnote von Tabelle 10 aufgeführt.

Die Ergebnisse dieser Validierungsversuche sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Nachweisgrenzen der in diesem Projekt relevanten und quantitativ analysierbaren Antibiotika-Wirkstoffe liegen für die Mehrzahl der Wirkstoffe unter 10 ng/l, die Bestimmungsgrenzen unter 25 ng/l. Lediglich Nystatin und Vancomycin, zwei Wirkstoffe mit relativ großen Molmassen von 1450 bzw. 926 g/mol weisen höhere Nachweisgrenzen von 27 bzw. 22 ng/l und Bestimmungsgrenzen von 94 bzw. 73 ng/l auf. Diese Werte zeigen, dass die entwickelte Methodik mit Ausnahme von Nystatin und Vancomycin ausreichend empfindlich und reproduzierbar ist, um Konzentrationen dieser Wirkstoffe im Bereich von etwa 10 bis 20 ng/l aus der Matrix Trinkwasser quantitativ zu bestimmen.

Auch Abwässer lassen sich mit den beschriebenen Verfahren analysieren. Durch Verdünnung mit der Kalibriermatrix Karlsruher Trinkwasser werden Matrixeffekte minimiert, da dadurch bei der Anreicherung realer Proben ähnliche Bedingungen wie bei der Kalibrierung über das Gesamtverfahren vorliegen. Bei der Untersuchung rea-

ler Abwasserproben wurde der Matrixeinfluss durch Aufstockung berücksichtigt. Die Konzentrationsbestimmungen in den Proben aus den verschiedenen Abbautests bei niedriger Konzentration (Modellkläranlagenversuche, anaerobe Abbautests, modifizierte Sturm-Tests) wurden anhand von Kalibrierungen aus den jeweiligen Matrices ausgewertet.

Tab. 10: Validierungsdaten für die Bestimmung ausgewählter Antibiotikawirkstoffe aus Wasser; bezüglich der Zuordnung der einzelnen Substanzen zu den analytischen Methoden s. Tab. 1; die Zielverbindungen dieses Vorhabens sind in Fettdruck hervorgehoben.

Substanz	NG in ng/l	BG in ng/l	V _{xo} in %	WF(TW) in %	WF(OW) in %	σ (TW) in %	σ (OW) in %	σ (HPLC) in %	r
Makrolide									
Clarithromycin	3,6	13	6,0	103	108	1,4	1,1	1,2	0,996
Erythromycin A	3,6	12	5,0	-	-	9,0	5,9	1,9	0,995
Dehydrato-erythromycin A	4,2	14	6,8	-	-	2,4	3,4	1,6	0,993
Oleandomycin	2,2	7,5	3,7	79	76	0,6	1,0	0,3	0,998
Roxithromycin	4,5	15	7,3	82	99	1,2	0,6	2,1	0,992
Spiramycin	3,8	13	6,1	68	43	2,1	1,5	1,3	0,995
Tylosin	1,9	6,7	2,8	57	59	0,4	1,1	1,3	0,999
Virginiamycin	2,2	7,8	3,6	82	75	2,9	2,7	2,6	0,998
Sulfonamide									
Sulfadiazin	2,6	9,1	4,2	25	14	2,8	2,7	2,2	0,998
Sulfadimidin	2,7	9,2	4,3	25	11	1,7	4,4	2,0	0,997
Sulfamethoxazol	1,8	6,2	2,8	32	21	3,2	3,6	2,0	0,999
Sulfamerazin	1,0	3,5	1,5	23	11	1,4	3,0	1,5	1,000
Penicilline									
Amoxicillin	4,6	15	4,9	36	36	4,1	5,9	6,0	0,994
Cloxacillin	3,9	13	6,5	98	101	4,5	2,5	2,7	0,995
Dicloxacillin	4,6	15	7,4	112	119	5,1	0,6	2,3	0,992
Nafcillin	4,4	15	7,1	69	82	6,9	1,9	1,8	0,994
Oxacillin	4,6	15	7,5	77	76	3,4	3,0	1,2	0,993
Benzylpenicillin	5,0	16	8,0	33	44	5,1	1,8	1,7	0,991
Phenoxy-methyl-penicillin	6,5	21	10,4	58	63	2,5	2,5	1,7	0,984
Cephalosporine									
Cefadroxil	4,0	14,6	4,0	36	40	2,3	2,8	0,9	0,999
Cefalexin	5,0	17,7	4,7	41	50	1,5	5,9	0,8	0,998
Cefaclor	11,0	38,0	11,6	71	69	1,5	2,6	2,1	0,993
Ceftiofur	2,0	7,2	1,9	45	66	2,6	2,6	1,2	1,000

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

Substanz	NG in ng/l	BG in ng/l	V _{xo} in %	WF(TW) in %	WF(OW) in %	σ(TW) in %	σ(OW) in %	σ(HPLC) in %	r
Cefuroxim	6,3	22,0	6,3	10	10	5,6	4,3	3,4	0,997
Ceftriaxon	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetracycline									
Oxytetracyclin	3,5	12,5	3,0	71	72	1,8	1,6	4,8	0,999
Tetracyclin	4,7	16,4	4,1	61	60	4,4	3,1	4,3	0,999
Chlortetracyclin	5,7	19,5	4,9	95	135	14,5	2,3	5,5	0,999
Doxycyclin	2,1	7,5	1,8	63	60	2,4	3,1	5,4	0,999
Fluorchinolone									
Enoxacin	4,1	14,6	3,6	17	17	1,8	2,1	5,2	0,999
Ofloxacin	3,3	11,8	3,0	67	68	6,6	1,2	1,6	0,999
Norfloxacin	6,3	21,3	4,1	15	16	5,4	2,6	3,7	0,997
Ciprofloxacin	5,4	18,8	4,7	17	17	3,1	1,6	1,6	0,998
Enrofloxacin	7,1	24,0	5,7	49	47	3,4	6,7	2,3	0,997
Nitroimidazole									
Ronidazol	3,2	11	5,4	59	52	2,9	3,5	3,5	0,996
Metronidazol	2,7	9,3	4,3	37	33	4,0	3,4	4,2	0,998
Carbapeneme									
Imipenem	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyether-Ionophore									
Monensin-Na	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyolefine									
Nystatin	26,5	93,6	4,6	20	6,5	14,1	2,8	5,6	0,998
Aminoglycoside									
Gentamycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycopeptide									
Vancomycin	22,	73,	6,6	74	32	13,2	34,6	15,1	0,995
Weitere Wirkstoffe									
Chloramphenicol	1,8	6,4	2,9	84	84	5,2	1,9	0,8	0,999
Clindamycin	5,5	19,5	5,0	10	5	9,9	7,1	1,3	0,998
Trimethoprim	1,3	4,8	2,2	55	50	2,6	0,5	2,0	0,999

NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze; V_{x0} = relative Verfahrensstandardabweichung; WF = Wiederfindung, TW = Karlsruher Trinkwasser, OW = Oberflächenwasser (Rhein bei Karlsruhe), σ = relative Standardabweichung einer Fünffachbestimmung, HPLC = nur HPLC-ESI-MS-MS-Bestimmung ohne Extraktion, r = Korrelationskoeffizient aus der Kalibrierfunktion des Gesamtverfahrens

Individuelle Kalibrierbereiche: Nystatin: 25-550 ng/l, Vancomycin: 25-275 ng/l

Individuelle Konzentrationsniveaus für die Wiederfindungs- und Reproduzierbarkeitsversuche: Clindamycin: 50 ng/l, Nystatin: 350 ng/l, Vancomycin: 200 ng/l

2.2.3.5 UNTERSUCHUNG VON MATRIXEFFEKTEN

Da mit den entwickelten Verfahren Bestimmungen aus Proben der verschiedenen Abbautests sowie aus realen Kläranlagenproben vorgenommen werden sollten, musste die Frage beantwortet werden, inwieweit die unterschiedlichen Matrices die Ergebnisse beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden Wiederfindungsversuche aus dem Zu- und Ablauf einer am IUK betriebenen Modellkläranlage sowie aus der Matrix des bei ECT durchgeführten anaeroben Abbautests sowie des modifizierten Sturm-Tests durchgeführt. Mit diesen Versuchen werden alle Einflüsse über das Gesamtverfahren in der Summe erfasst, eine Separierung einzelner Störeinflüsse ist auf diese Weise nicht möglich. Es kann z. B. nicht unterschieden werden, ob eine veränderte Wiederfindung primär auf die Probenvorbereitung (z. B. auf den Extraktionsschritt) oder auf die HPLC-ESI-MS-MS-Bestimmung (z. B. Beeinflussung der Ionisierungsausbeute bei der Elektrospray-Ionisierung) zurückzuführen ist. Eine solche weitergehende Differenzierung der auftretenden Effekte war für die Fragestellung nicht notwendig, da lediglich entschieden werden musste, ob überhaupt nennenswerte Einflüsse der verschiedenen Matrices auf das quantitative Analysenergebnis vorhanden sind, sodass eine Strategie zu deren Vermeidung entwickelt werden konnte.

Die bei den Matrixuntersuchungen erhaltenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 5 bis 8 dargestellt. Die quantitative Auswertung der Analysen zu den Matrix-Effekten erfolgte anhand einer Kalibrierung über das Gesamtverfahren aus der Matrix Karlsruher Trinkwasser. Wird mit der so erstellten Kalibrierung eine Wirkstoffkonzentration in Höhe der Soll-Konzentration von 200 ng/l ermittelt, so entspricht dies genau der Wiederfindung aus Trinkwasser oder 100% des Wertes für Trinkwasser. Ein Wert über 100% bedeutet eine bessere Wiederfindung als aus der Trinkwassermatrix, ein Wert unter 100% entsprechend einer geringeren Wiederfindung.

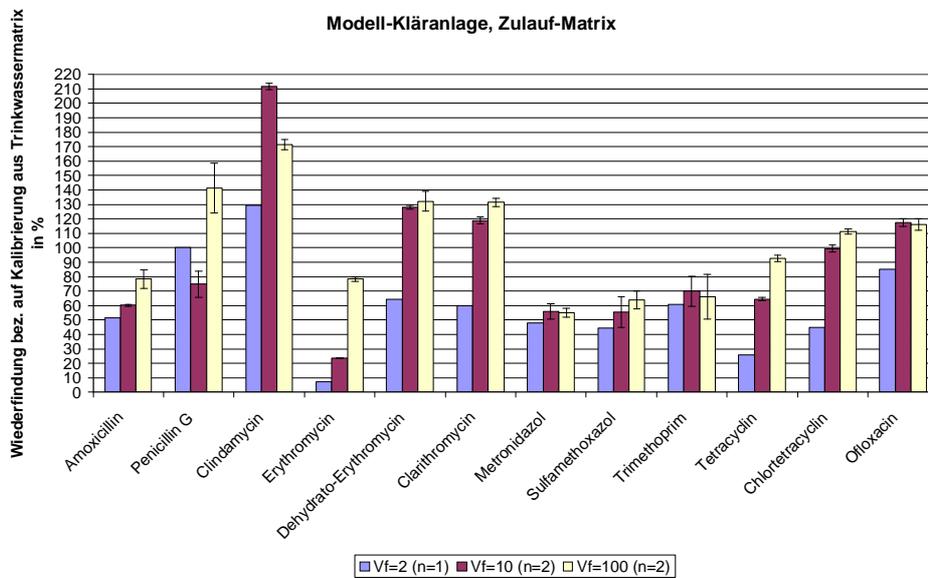


Abb. 5: Ergebnisse der Matrixuntersuchungen für den Modellkläranlagen-Zulauf; die Ausgangssollkonzentration jedes Wirkstoffs betrug 200 ng/l. Für die Verdünnungsfaktoren VF = 10 und VF = 100 sind die Mittelwerte und die Streubreite der Doppelbestimmungen dargestellt.

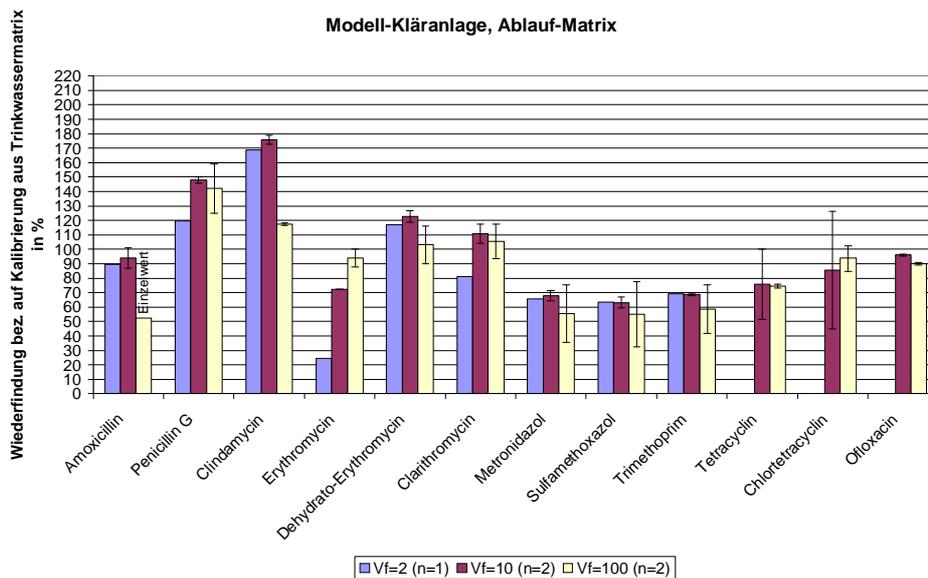


Abb. 6: Ergebnisse der Matrixuntersuchungen für den Modellkläranlagen-Ablauf; die Ausgangssollkonzentration jedes Antibiotika-Wirkstoffs betrug 200 ng/l. Für die Verdünnungsfaktoren VF = 10 und VF = 100 sind die Mittelwerte und die Streubreite der Doppelbestimmungen dargestellt.

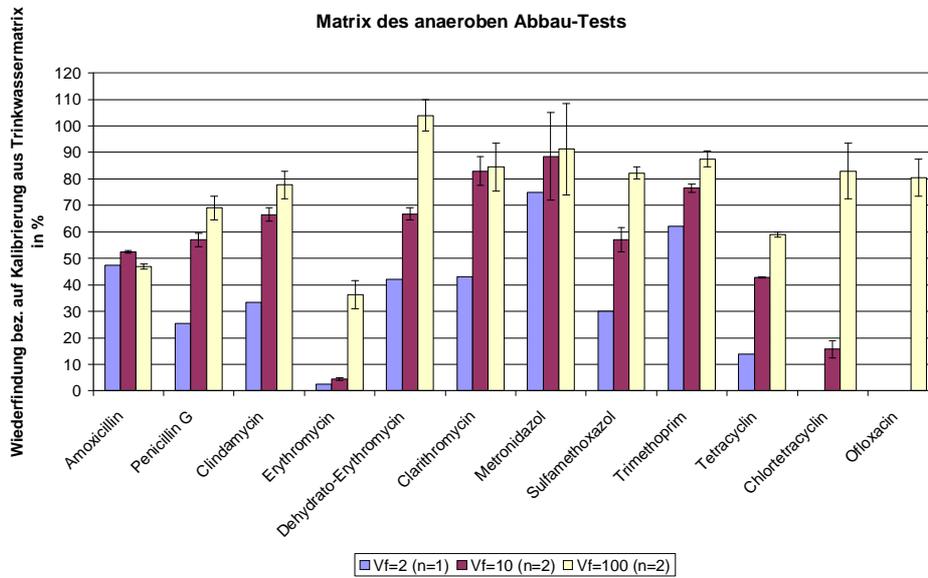


Abb. 7: Ergebnisse der Matrixuntersuchungen für den anaeroben Abbautest; die Ausgangssollkonzentration jedes Wirkstoffs betrug 200 ng/l. Für die Verdünnungsfaktoren VF = 10 und VF = 100 sind die Mittelwerte und die Streubreite der Doppelbestimmungen dargestellt.

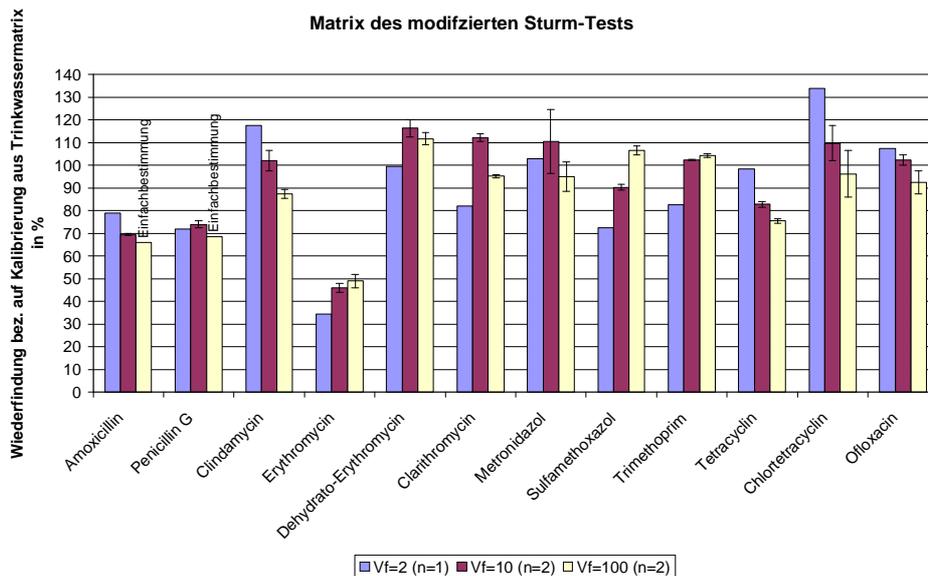


Abb. 8: Ergebnisse der Matrixuntersuchungen für den modifizierten Sturm-Test; die Ausgangssollkonzentration jedes Wirkstoffs betrug 200 ng/l. Für die Verdünnungsfaktoren VF = 10 und VF = 100 sind die Mittelwerte und die Streubreite der Doppelbestimmungen dargestellt.

Die in den Abbildungen 5 bis 8 dargestellten Ergebnisse lassen erkennen, dass die Wiederfindungen der zu untersuchenden Antibiotika-Wirkstoffe zum Teil stark von der Matrix abhängen. Die geringsten Abweichungen von den Wiederfindungen aus Trinkwasser traten bei der Matrix des modifizierten Sturmtests auf. Die starke Matrixabhängigkeit wird besonders bei den Wiederfindungen aus der nur zweifach mit Karlsruher Leitungswasser verdünnten Matrix-Proben ($VF = 2$) deutlich. Überwiegend führt eine geringe Verdünnung der Proben zu verminderten Wiederfindungen. Für die meisten Matrix-Wirkstoff-Kombinationen sind die Unterschiede zwischen den zehnfach und hundertfach verdünnten Ansätzen gering und liegen in der Größenordnung der Abweichung zwischen den Doppelbestimmungen. Die Streuungen der Parallelmessungen lagen in den meisten Fällen unter 20%.

Einzelne größere Abweichungen von der Wiederfindung aus Trinkwasser sollen an dieser Stelle nicht näher interpretiert werden, da als Gesamtergebnis aus den durchgeführten Tests feststeht, dass Matrixeffekte bei den zu untersuchenden Proben aus den Abbauversuchen zu erwarten waren und daher vermieden oder korrigiert werden mussten.

Eine Möglichkeit Matrixeffekte zu minimieren ist, wie die beschriebenen Untersuchungen gezeigt haben, die Verdünnung der Proben mit der Kalibriermatrix Karlsruher Trinkwasser. Damit können die Matrixeinflüsse jedoch nicht ganz eliminiert werden. Außerdem führt eine hohe Verdünnung zu entsprechend hohen Bestimmungsgrenzen. Für die anschließenden Laborversuche zum Abbau der Antibiotika-Wirkstoffe wurden daher folgende Maßnahmen ergriffen:

- Verdünnung der matrixbelasteten Proben mit Karlsruher Trinkwasser. Nach Möglichkeit wurde mindestens eine zehnfache Verdünnung vorgenommen. Bei den Closed-Bottle-Test-Ansätzen sowie bei den Modellkläranlagenabläufen wurden die Verdünnungen den Sollkonzentrationen angepasst, so dass die Wirkstoffkonzentrationen im Arbeitsbereich der Kalibrierungen lagen.
- Auswertung der Konzentrationsbestimmungen anhand einer Kalibrierung über das analytische Gesamtverfahren mit Bezugslösungen, die mit der im jeweiligen Test vorliegenden Matrix bei gleicher Verdünnung hergestellt wurden.

Damit lag eine praktikable Strategie für die Messung der Konzentrationsverläufe in den Abbauversuchen bei niedrigen Wirkstoffkonzentrationen vor.

2.2.3.6 TEILNAHME DES TZW-LABORS AM BLAC-RINGVERSUCH (EXTERNE QUALITÄTSSICHERUNG)

Im Juni 2000 nahm das TZW-Labor an dem ersten von zwei bundesweiten Ringversuchen zur Bestimmung von Arzneimittelrückständen aus Wasser teil (BLAC-Ringversuch). Nur in diesem ersten Ringversuch waren auch einige Antibiotika-Wirkstoffe enthalten. Veranstaltet wurde dieser Ringversuch von der AQS-Leitstelle des Bayerischen Landesamts für Wasserwirtschaft. Die Teilnahme des TZW und die Anerkennung der Ringversuchsergebnisse als Labor-Vergleichsuntersuchung im Rahmen dieses Projekts, wurde bereits bei der ersten Projektbesprechung im Oktober 1999 vom damaligen Projektbegleiter des UBA, Herrn Dr. Cohors-Fresenburg, vorgeschlagen.

Insgesamt waren für diesen Ringversuch 35 Einzelstoffe vom BLAC-Arbeitskreis „Arzneimittel in der Umwelt“ ausgewählt worden, die in vier verschiedenen Proben analysiert wurden. Unter den 35 zu bestimmenden Wirkstoffen befanden sich sieben Antibiotika-Wirkstoffe, von denen vier (Erythromycin, Clarithromycin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim) in der 18er-Liste dieses Vorhabens enthalten sind. Zur Bestimmung der Antibiotika-Wirkstoffe kamen bei diesem Ringversuch die Extraktionsmethode I sowie die beiden HPLC-ESI-MS-MS-Methoden 1 „Makrolide“ und 2 „Chemotherapeutika“ zum Einsatz.

Für eine detaillierte Auswertung und Darstellung der Ringversuchsergebnisse sei auf den Bericht des Bayerischen Landesamts für Wasserwirtschaft verwiesen (Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft 2000). Im Folgenden werden nur die Ergebnisse des TZW betrachtet.

Bei den vier Proben handelte es sich um eine in Methanol/10-15% Acetonitril gelöste Standardprobe (Probe 1), um ein aufgestocktes Oberflächenwasser (Probe 2), um ein kommunales Abwasser (Kläranlagenablauf, Probe 3) und um ein aufgestocktes kommunales Abwasser (Probe 4). In den Tabellen 11 bis 14 sind für die Gruppe der Antibiotika-Wirkstoffe die am TZW nachgewiesene Konzentration, der Sollwert (berechnet als Mittelwert aller abgegebenen Einzelergebnisse) sowie für die Proben 1 und 2 der Referenzwert (entspricht der aufgestockten Konzentration) zusammengefasst. Die statistische Auswertung durch das Bayerische Landesamt für Wasserwirtschaft erfolgte auf der Basis robuster Methoden (Huber, Q-Methode) und die Bewertung der einzelnen Parameter über sog. Z_u -scores. In der letzten Spalte jeder Tabelle ist das Ergebnis dieser Bewertung symbolisch dargestellt.

Tab. 11: Für die Antibiotika-Wirkstoffe am TZW nachgewiesene Konzentration $c(\text{TZW})$, Sollwert, Referenzwert sowie Bewertung B nach Z_u -score (+ = bestanden, - = nicht bestanden) für **Probe 1 (Standardlösung)**; die für das UBA-Projekt relevanten Wirkstoffe sind durch Schattierung hervorgehoben

Verbindung	$c(\text{TZW})$ in ng/l	Sollwert in ng/l	Ref.-wert in ng/l	B
Clarithromycin	191	178	140	+
Erythromycin	177	199	150	+
Roxithromycin	383	340	300	+
Sulfamethoxazol	198	238	190	+
Sulfadimidin	279	286	260	+
Trimethoprim	128	86	90	+
Chloramphenicol	195	151	200	+

Tab. 12: Für die Antibiotika-Wirkstoffe am TZW nachgewiesene Konzentration $c(\text{TZW})$, Sollwert, Referenzwert sowie Bewertung B nach Z_u -score (+ = bestanden, - = nicht bestanden) für **Probe 2 (dot. Oberflächenwasser)**; die für das UBA-Projekt relevanten Wirkstoffe sind durch Schattierung hervorgehoben

Verbindung	$c(\text{TZW})$ in ng/l	Sollwert in ng/l	Ref.-wert in ng/l	B
Clarithromycin	92	79	85	+
Erythromycin	128	100	110	+
Roxithromycin	232	169	225	+
Sulfamethoxazol	145	133	130	+
Sulfadimidin	103	120	100	+
Trimethoprim	83	59	60	+
Chloramphenicol	161	154	170	+

Tab. 13: Für die Antibiotika-Wirkstoffe am TZW nachgewiesene Konzentration c(TZW), Sollwert sowie Bewertung B nach Z_u -score (+ = bestanden, - = nicht bestanden) für **Probe 3 (kommunales Abwasser)**; die für das UBA-Projekt relevanten Wirkstoffe sind durch Schattierung hervorgehoben

Verbindung	c(TZW) in ng/l	Sollwert in ng/l	B
Clarithromycin	91	66	+
Erythromycin	195	200	+
Roxithromycin	66	58	+
Sulfamethoxazol	296	347	+
Sulfadimidin	< 25	-	
Trimethoprim	182	175	+
Chloramphenicol	< 25	-	

* Für diesen Wirkstoff war keine Bewertung möglich, da er in dieser nicht aufgestockten Wasserprobe nicht in messbarer Konzentration enthalten war

Tab. 14: Für die Antibiotika-Wirkstoffe am TZW nachgewiesene Konzentration c(TZW), Sollwert sowie Bewertung B nach Z_u -score (+ = bestanden, - = nicht bestanden) für **Probe 4 (dot. kommunales Abwasser)**; die für das UBA-Projekt relevanten Wirkstoffe sind durch Schattierung hervorgehoben

Verbindung	c(TZW) in ng/l	Sollwert in ng/l	B
Clarithromycin	285	238	+
Erythromycin	284	256	+
Roxithromycin	478	508	+
Sulfamethoxazol	453	463	+
Sulfadimidin	193	266	+
Trimethoprim	308	212	+
Chloramphenicol	219	402	+

Insgesamt wurden im Ringversuch 128 Einzelergebnisse bewertet, wovon das TZW-Labor nur zweimal die Beurteilung "nicht bestanden" erhielt¹; alle anderen Ergebnisse lagen innerhalb des zulässigen Intervalls. Die in den Tabellen angegebenen Daten für die sieben Antibiotika-Wirkstoffe bestätigen die gute Qualität der Analyseverfahren. Dieses Resultat zeigt, dass die angewendeten Analyseverfahren auch auf Abwasserproben anwendbar sind, sofern diese entsprechend verdünnt werden. Mit diesem Ergebnis kann die Teilnahme an einer Laborvergleichsuntersuchung als erfolgreich abgeschlossen angesehen werden.

¹ Es handelt sich um die Bestimmung der beiden Zytostatika Cyclophosphamid (Probe 1) und Ifosfamid (Probe 4) mittels GC/MS. Inzwischen werden diese Verbindungen zuverlässiger mittels HPLC-ESI-MS-MS bestimmt.

2.2.4 Analytisches Verfahren zur Antibiotika-Bestimmung aus Schlammproben

2.2.4.1 BESTIMMUNG VON WIRKSTOFFGEHALTEN IN FESTSTOFFEN

Da es vorgesehen war, auch Klärschlämme zu untersuchen, musste vor die eigentliche analytische Bestimmung der Wirkstoffe mittels HPLC-ESI-MS-MS auch ein Extraktionsverfahren für Feststoffe entwickelt werden.

Bezüglich eines – wie auch immer gearteten – Extraktionsverfahrens aus Feststoffen ist anzumerken, dass die Validierungsmöglichkeiten gegenüber homogenen Wasserproben grundsätzlich sehr eingeschränkt sind. Insbesondere können keine Wiederfindungsexperimente durchgeführt werden. Solche Versuche setzen voraus, dass ein homogenes Referenzmaterial bekannten Gesamtgehaltes vorhanden ist. Ein solches Referenzmaterial (z. B. ein getrockneter Klärschlamm, der bekannte Spurenverunreinigungen der interessierenden Wirkstoffe enthält) gibt es derzeit nicht.

Diese grundsätzlichen Gegebenheiten machen deutlich, dass es deshalb nur möglich ist, ein Extraktionsverfahren zu entwickeln und anzuwenden, mit dessen Hilfe die unter den Randbedingungen des Extraktionsverfahrens extrahierbaren Anteile der Antibiotika-Wirkstoffe ermittelt werden können. Die extrahierbaren Anteile können sich erheblich von den Gesamtgehalten in den untersuchten Feststoffen unterscheiden. Aufgrund der fehlenden Aussage über die Extraktionsausbeute muss also ein operationell definiertes Verfahren angestrebt werden. Diese Überlegungen führten dazu, dass im Rahmen dieses Projekts Versuchrandbedingungen getestet wurden, unter denen eine möglichst hohe Extraktionsausbeute der zu untersuchenden Antibiotika-Wirkstoffe zu erwarten ist.

Da die Zielverbindungen zu unterschiedlichen chemischen Stoffklassen gehören, weisen sie stark unterschiedliche Strukturen auf. Dennoch haben sie alle gemeinsam, dass sie eine oder mehrere basische, d. h. protonierbare Gruppen im Molekül aufweisen. Dies ist auch der Grund, warum alle ausgewählten Wirkstoffe bei der Elektrospray-Ionisierung (ESI) gut im sog. Positiv-Ionen-Modus detektiert werden können. Auch die chromatographische Trennung läuft unter sauren Bedingungen für die meisten Verbindungen am besten. Dies bedeutet, ein Extraktionsverfahren für diese Verbindungen aus Feststoffen sollte zweckmäßiger Weise mit einem sauren Extraktionsmittel durchgeführt werden, damit die adsorbierten Wirkstoffe durch Kationenaustausch von der festen Matrix verdrängt werden können. Voraussetzung hier-

für ist natürlich, dass die Wirkstoffe unter diesen Bedingungen stabil sind. Die Gruppe der β -Lactam-Antibiotika, insbesondere die Gruppe der Penicilline scheidet daher aus, weil diese Verbindungen im sauren wässrigen Milieu leicht hydrolysieren.

2.2.4.2 DIE SAURE EXTRAKTION

Zur Extraktion der Antibiotika-Wirkstoffe wurde das in der Abbildung 9 gezeigte Verfahren entwickelt (UVM 2002). Diese Extraktionsmethode wurde in Anlehnung an Vorarbeiten am TZW für andere organische Verbindungen konzipiert. Grundlage des Verfahrens ist eine Ultraschall-Extraktion des gefriergetrockneten Feststoffs mit 70% 0,1 M Salzsäure (pH = 1) und 30% Aceton. Um die Analyten nur kurzzeitig den sauren Bedingungen auszusetzen, wird der Extrakt sofort nach der Feststoffabtrennung durch Zentrifugation mit Natronlauge neutralisiert. Zur Erhöhung der Extraktionsausbeute wird der Extraktionsrückstand erneut mit dem Extraktionsmittel 70% 0,1 M HCl/30% Aceton versetzt und ein zweites Mal extrahiert. Nach Abschluss der eigentlichen Extraktion erfolgt ein Lösungsmittelwechsel in das Laufmittel für die anschließende HPLC-Trennung. Die über eine externe Kalibrierung für den HPLC-Bestimmungsschritt abgeschätzte Bestimmungsgrenze liegt bei 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (UVM 2002). Mit diesem Extraktionsverfahren wurden die Schlammproben aus den Modellkläranlagenversuchen, dem anaeroben Abbautest, dem modifizierten Sturm-Test sowie aus den drei untersuchten kommunalen Kläranlagen aufgearbeitet.

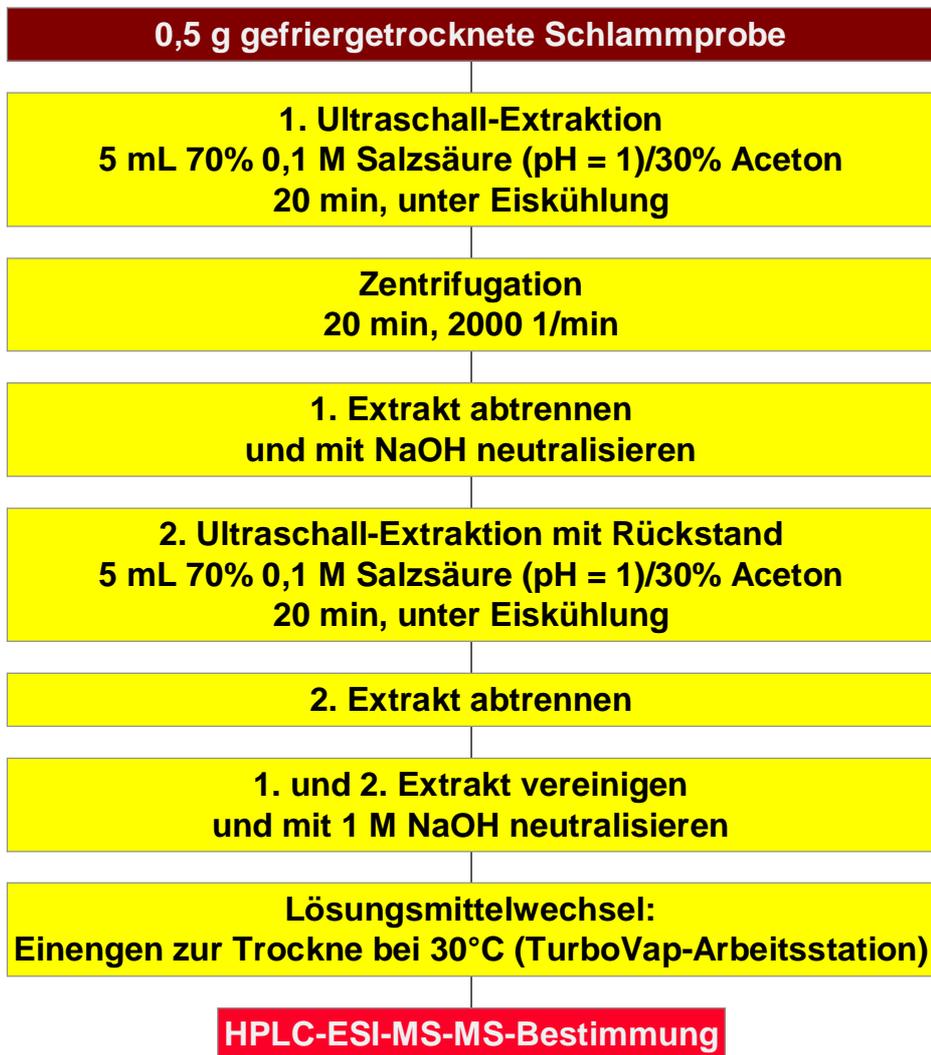


Abb. 9: Verfahrensfliessbild der sauren Extraktion von Schlammproben auf die ausgewählten Antibiotika-Wirkstoffe.

2.3 VERHALTEN, ABBAU UND ELIMINIERUNG VON ANTIBIOTIKA

2.3.1 Closed Bottle Test (OECD 301D : 1992)

Der Closed Bottle Test (CBT) ist ein Abbautest, mit dem organische Stoffe auf leichte biologische Abbaubarkeit (ready biodegradability) untersucht werden. Er zählt zur Stufe 0 der OECD-Testhierarchie (Organisation for Economic Co-operation and Development). Wird ein positives Ergebnis erzielt, d. h. erweist sich ein Stoff im Test der Stufe 0 als leicht biologisch abbaubar, gilt diese Substanz auch in der aquatischen Umwelt als leicht biologisch abbaubar (OECD 1992, Pagga und Strotmann 1997, Nyholm 1991).

Der CBT gehört zur Gruppe der diskontinuierlichen Testverfahren (*die-away-Tests*) im geschlossenen System mit relativ niedriger Bakteriendichte und niedriger Testsubstanzkonzentration (Wagner et al. 1988).

Herstellen des Mineralmediums

Für die Herstellung des Mineralmediums wurden vier verschiedene Stammlösungen (Tab. 15) in konzentrierter Form vorbereitet (OECD 1992), aliquotiert und bei -70°C bis zum Gebrauch gelagert. Für die Herstellung des Mineralmediums wurde von jeder Stammlösung 1 ml/l benötigt.

Tab. 15: Zusammensetzung der Stammlösung des Mineralmediums für den CBT

Bezeichnung der Lösung	Substanz	Konzentration [g/l]
A	Kaliumdihydrogenphosphat	8,50
	Dikaliumhydrogenphosphat	21,75
	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	33,40
	Ammoniumchlorid	0,50
B	Calciumchlorid-Dihydrat	36,40
C	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	22,50
D	Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	0,25

Behandlung des Inokulums

Zur Beimpfung des Testansatzes wurde Inokulum aus dem Ablauf der kommunalen Kläranlage Wyhl (Abwasserzweckverband Nördlicher Kaiserstuhl) verwendet. Am Tag des Testbeginns wurde eine Ablaufprobe entnommen und durch Papierfilter (S&S Faltenfilter 595 ¹/₂) filtriert. Die ersten 200 ml des Filtrates wurden verworfen. Bis zum Gebrauch wurde das Inokulum belüftet. Nach OECD (1992) sollte das Inokulum zwischen 10¹ und 10³ KBE/ml beinhalten. Parallel zum Testansatz wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) des filtrierten Inokulums bestimmt.

Ansatz der Testkulturen

Vor Testbeginn wurden die verwendeten Flaschen mit 10% (v/v) ethanolischer HCl-Lösung gereinigt, anschließend zweimal mit VE-Wasser und einmal mit hochreinem Wasser (Millipore-Wasser) gespült und im Trockenschrank getrocknet.

Am Vortag des Testbeginns erfolgte die Sauerstoffsättigung des VE-Wassers auf ungefähr 9 mg/l O₂ mit medizinischer Druckluft. Die belüfteten Kanister (2 * 28 l) wurden über Nacht bei 20°C im Thermoschrank gelagert.

In der Tabelle 4 sind die Testansätze übersichtlich dargestellt.

Tab. 16: Übersicht der Testansätze im CBT

Testansatz	Zusammensetzung
Blindansatz	Medium + Inokulum
Referenzkontrolle	Medium + Inokulum + Natriumacetat
Testansatz mit Substanz	Medium + Inokulum + Testsubstanz
Toxizitätskontrolle	Medium + Inokulum + Testsubstanz + Natriumacetat

Die Aktivität des Inokulums kann anhand der Referenzkontrolle abgelesen werden. Zudem dient sie zusammen mit dem Testansatz als Vergleichsparameter zur Auswertung der Toxizitätskontrolle, mit der toxische Einflüsse der Testsubstanzen festgestellt werden sollen (OECD 1992). Deren Aussagekraft ist nach Al-Ahmad und Kümmerer (1998) jedoch insofern eingeschränkt, da nur Effekte auf Mikroorganismen erfasst werden, die in Gegenwart von Natriumacetat die Testsubstanz unter Sauerstoffverbrauch abbauen können. Deswegen wurden als Ergänzung die KBE bestimmt (s. Kapitel 3.4.1). Damit wurden die kultivierbaren Keime erfasst.

Sowohl der Testansatz als auch die Toxizitätskontrolle wurden jeweils in einem Konzentrationsbereich von 2-130 µg/l und 2-6 mg/l durchgeführt. Die eingesetzten Substanzkonzentrationen richteten sich im Fall der mg/l-Konzentration, die der Vorgabe der standardisierten Testvorschrift entspricht, nach dem ThSB, der aufgrund der bekannten chemischen Zusammensetzung nach OECD 301D (1992) berechnet werden kann. Die mg/l-Konzentration wurde anhand eines theoretischen Sauerstoffsbedarfs von 5 mg/l berechnet, die µg/l-Konzentration sollte Belastungsspitzen im kommunalen Abwasser simulieren. Basis dafür waren bilanzierte Verbrauchsdaten von Antibiotika für BRD (Kümmerer und Henninger 2003).



Abb. 10: Messung des gelösten Sauerstoffs im Closed Bottle Test

Für jeden Versuchsansatz wurde pro Liter Probenvolumen je 1 ml der Stammlösungen A-D sowie 2 Tropfen des vorbereiteten Inokulums eingesetzt. Für die Referenzkontrolle wurde jeweils 6,41 mg/l Natriumacetat (entspricht ca. 5 mg O₂/l ThSB) verwendet. Die Testsubstanz wurde im Testansatz und in der Toxizitätskontrolle in der gleichen Konzentration eingesetzt (Tab. 17). Die Ansätze erfolgten jeweils in 10 l Polyethylenkanistern, aus denen anschließend das luftblasenfreie Abfüllen der Enghalsflaschen erfolgte. Nach dem Verschließen wurden die Flaschen im Dunkeln bei 20°C im Thermoschrank inkubiert. Der Test wurde im Doppelansatz durchgeführt (Abb. 10).

Sauerstoff-, pH- und Temperaturmessung

Während der Versuchsdauer wurde an sechs Versuchstagen (0., 1., 7., 14., 21. und 28. Tag) von jedem Ansatz die Sauerstoffzehrung mittels einer Sauerstoffsonde in Parallelmessungen bestimmt. Bei einigen Stoffen im µg/l- und mg/l-Konzentrationsbereich wurde die Konzentration zur Erfassung der Primärelimination mittels HPLC bestimmt.

Messungen des pH-Wertes und der Temperatur wurden zur Qualitätssicherung durchgeführt.

Tab. 17: Angesetzte Konzentrationen der Testsubstanzen und des Natriumacetats im CBT

Testansatz mit Substanz	Konzentration der Testsubstanz		Konzentration des Natriumacetats	
	Niedriger Ansatz [µg/l]	Hoher Ansatz [mg/l]	Niedriger Ansatz [µg/l]	Hoher Ansatz [mg/l]
Amoxicillin	130,00	3,27	255,00	6,41
Benzylpenicillin, Natriumsalz	5,00	3,01	10,64	6,41
Ceftriaxon, Dinatrium	5,00	5,32	6,03	6,41
Cefuroxim, Natriumsalz	10,00	4,80	13,30	6,41
Chlortetracyclin, Hydrochlorid	3,00	3,65	5,27	6,41
Clarithromycin	3,00	2,43	4,75	3,85
Clindamycin	3,00	3,07	3,76	3,85
Erythromycin	3,00	2,46	4,70	3,85
Gentamycin, Sulfat	3,00	3,05	6,31	6,41
Imipenem	3,50	3,47	6,46	6,41
Metronidazol	5,95	5,95	3,85	3,85
Monensin, Natriumsalz	10,00	2,35	16,40	3,85
Nystatin	3,00	2,56	7,50	6,41
Ofloxacin	3,30	3,05	4,15	3,85
Sulfamethoxazol	35,00	3,76	59,68	6,41
Tetracyclin	3,00	3,09	6,23	6,41
Trimethoprim, Naphthoat	4,60	3,25	5,45	3,85
Vancomycin, Hydrochlorid	2,88	3,55	3,20	3,85

Gültigkeit

Der Test kann gemäß der Testvorschrift als valide betrachtet werden, wenn

- innerhalb von 14 Tagen ein mindestens 60%iger Abbau der Referenzsubstanz Natriumacetat erfolgt,
- die Abbauwerte in den Parallelansätzen um weniger als 20% voneinander abweichen (im Plateau, am Testende oder am Ende des 10-Tage-Fensters in dem der mindestens 60%iger Abbau der Testsubstanz stattgefunden hat),
- in der Toxizitätskontrolle die Referenzsubstanz zu mehr als 25% abgebaut wird (bei Werten unter 25% gilt die Substanz als Inhibitor),

- im Blindansatz die Konzentration an gelöstem Sauerstoff nicht mehr als um 1,5 mg nach 28 Tagen abnimmt,
- die Konzentration an gelöstem Sauerstoff in den Testansätzen nicht unter 0,5 mg/l fällt.

Berechnung der Ergebnisse

Der Abbau einer Testsubstanz wurde nach OECD (1992) über deren Sauerstoffzehrung (BSB) ermittelt, von der die Zehrung eines mitgeführten Blindansatzes, der nur aus Mineralmedium und Inokulum besteht, abzuziehen ist (s. Gleichung 2).

Diese Differenz wird als prozentualer Anteil am theoretischen Sauerstoffbedarf (ThSB) bzw. im Falle der Toxizitätskontrolle als ThSB des Gemisches aus beiden Komponenten als Abbauwert angegeben (s. Gleichung 3).

$$(2) \quad \text{BSB [mg O}_2\text{/mg Testsubstanz]} = \frac{(O_2)_{T,n} - (O_2)_{B,n}}{(c_T)}$$

$$(3) \quad \text{Abbau [\%]} = \frac{\text{BSB}}{\text{ThSB}} \cdot 100$$

BSB gemessener biologischer Sauerstoffbedarf in mg O₂/mg Testsubstanz,

ThSB theoretischer Sauerstoffbedarf bzw. CSB in mg O₂/mg Testsubstanz,

(O₂)_{T,n} Sauerstoffzehrung am Tag n im Ansatz mit Testsubstanz,

(O₂)_{B,n} Sauerstoffzehrung am Tag n im Blindansatz,

(c_T) Konzentration der Testsubstanz in mg/l.

Als leicht biologisch abbaubar gilt eine Testsubstanz dann, wenn sie innerhalb eines „10 Tage-Fensters“, das ab dem Zeitpunkt eines 10%igen Abbaus beginnt, zu mindestens 60% abgebaut wird.

Bestimmung der Antibiotikakonzentration mittels HPLC

Um eine mögliche abiotische Elimination der Antibiotika zu überprüfen, wurden die Substanzen, für die eine analytische Messmethode vorlag, in 2-130 µg/l- und 2-6 mg/l-Konzentration mittels HPLC untersucht.

Die Proben im Konzentrationsbereich von 2-130 µg/l (CBT) wurden von DVGW-Technologiezentrum analysiert. Die Methoden werden von Lange et al. (2001) und Sacher et al. (2001) ausführlich beschrieben.

Die Messung in 2-10 mg/l Konzentrationen (CBT, Licht- und Temperaturempfindlichkeit, Adsorption) erfolgte mit einer HPLC-Anlage von Shimadzu (Duisburg) mit einer RP 18-Säule (Nucleosil 100-5 C18, 250 x 4.6 mm, Macherey-Nagel, Düren) im IUK. Ein linear binärer Gradient ausgehend von 2% Acetonitril und 98% Phosphatpuffer pH 2,5 wurde innerhalb von 20 min auf 58% Acetonitril und 42% Phosphatpuffer gesteigert. Die Flussrate lag bei 1 ml/min und das Injektionsvolumen betrug 50 µl. Die Detektion erfolgte bei allen Substanzen außer Ofloxacin mit einem UV-Vis-Detektor (SPD-10A, Shimadzu, Duisburg) bei 210 nm. Bei Ofloxacin wurde ein Fluoreszenzdetektor (RF-10A, Shimadzu, Duisburg) bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm und einer Emissionswellenlänge von 500 nm angewendet. Das Injektionsvolumen betrug 150 µl.

Zunächst wurde mittels eines Doppelansatzes von Standardverdünnungen eine Kalibriergerade erstellt. Bei der Erstellung der Kalibriergeraden wurde ein Regressionskoeffizient von mindestens 0,99 ermittelt. Damit kann der Bereich zwischen 0 und 10 mg/l als linear angenommen werden. Anschließend wurden aus den jeweiligen Peakflächen der Proben die Konzentrationen über die Kalibriergerade berechnet. Aus den Doppelansätzen bzw. dreifachen Ansätzen eines Versuchstages wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und die Standardabweichungen berechnet.

2.3.2 Kombinationstest (Inhärente Abbaubarkeit)

2.3.2.1 KOMBINATIONSTEST BEI HOHEN ANTIBIOTIKAKONZENTRATIONEN

Die inhärente Abbaubarkeit wird üblicherweise dann bestimmt, wenn die Prüfsubstanz die Kriterien für leichte biologische Abbaubarkeit in einem der Tests der OECD 301 Reihe nicht eingehalten hat. Im Vergleich zu den OECD 301 Tests werden für die inhärenten Abbautests höhere Inokulum- und Substratkonzentrationen verwendet, so dass die Bedingungen für biologischen Abbau insgesamt günstiger sind.

Methodenentwicklung

Der Zahn-Wellens-Test (OECD 302 B) ist der weitverbreitetste Test zur Bestimmung der inhärenten Abbaubarkeit von Chemikalien und wurde auch in die Parameterliste der Abwasserverordnung aufgenommen. Bestimmt wird die DOC- oder CSB-Elimination im Standversuch mit Belebtschlamm (0,2 -1 g TS/l) als Inokulum. Ein wichtiger Nachteil des Zahn-Wellens-Tests ist jedoch, dass er strenggenommen nicht zwischen den Eliminationsfaktoren Bioabbau, Adsorption und Strippung unterscheidet.

den kann. Hilfsweise wird die Elimination im Testansatz nach 3 Stunden mit dem adsorbierten Anteil gleichgesetzt und die Elimination in einem parallel mit getesteten abiotischen Kontrollansatz ohne Belebtschlamm als physiko-chemische Elimination bezeichnet.

Tab. 18: Vergleich des Kombinationstests mit den OECD-Tests

	CO₂-Entwicklungs-Test	Zahn-Wellens-Test	Kombinationstest
Norm	OECD 301 B	OECD 302 B	
Testkategorie	leichte biol. Abbaubarkeit	potentielle biol. Abbaubarkeit	potentielle biol. Abbaubarkeit
Inokulum	Belebtschlamm 30 mg TS/l	Belebtschlamm 0,2-1 g TS/l	Belebtschlamm 0,2 g TS/l
Prüfkonzentration	10-20 mg/l TOC è ThCO ₂ 37-73 mg/l	>50 mg DOC/l	100 mg TOC/l è ThCO ₂ 367 mg/l
Gültigkeitskrit. Blindwerte	40-70 mg CO ₂ /l in 28 d	keine Vorgaben	Interne Forderung < 50% des ThCO ₂
Versuchszeit	28 d	28 d	28 d
Messwerte	CO ₂ -Entwicklung	DOC-Elimination	CO ₂ -Entwicklung und DOC-Elimination
Vorteil in Bezug auf Verhalten in KA	Bestimmung der Endabbaubarkeit	Verhalten in Kläranlagen	Differenzierung von Endabbaubarkeit und Elimination
Nachteil in Bezug auf Verhalten in KA	Verhältnismäßig geringe Inokulumdichte	Keine Unterscheidung von Bioabbau und Adsorption möglich; Hemmwirkung bei höherer Konz.	Mögliche Hemmwirkung aufgrund höherer Konzentration

Während die Sauerstoffzehrung als indirekter Hinweis auf eine Mineralisierung der Prüfsubstanz angesehen werden kann, ist die Freisetzung von CO₂ ein eindeutiger Nachweis des biologischen Abbaus. Der CO₂-Entwicklungstest oder auch Sturmtest

(OECD 301 B) ist einer der am häufigsten angewandte Abbautest zur Bestimmung der leichten biologischen Abbaubarkeit von Chemikalien. Dabei werden gegen die Atmosphäre verschlossene Testansätze mit kohlendioxidfreier Luft belüftet und das entstehende CO₂ in nachgeschalteten Absorberflaschen in NaOH als NaHCO₃/Na₂CO₃ absorbiert und nachfolgend quantifiziert.

Durch die Kombination des Zahn-Wellens-Tests mit dem konventionellen Sturm-Test läßt sich die über die CO₂-Entwicklung bestimmte inhärente biologische Endabbaubarkeit eindeutig von anderen Eliminationsfaktoren wie Adsorption und Strippung unterscheiden, die bei der DOC-Bestimmung miterfasst werden (vgl. Tab 18).

Ein ähnliches Versuchsdesign wurde bereits von Strotmann et al. (1995), Baumann et al. (1996) sowie von Jiang et al. (2002) beschrieben.

Durchführung

Der Versuchsaufbau des Kombinationstest entsprach dem des klassischen Sturmtests zur Bestimmung der vollständigen aeroben biologischen Abbaubarkeit nach OECD 301 B. Um die Luft CO₂-frei zu waschen, wurde diese über eine Kolonne mit zwei in Reihe geschalteten Gaswaschflaschen und mit Natronkalk (3-5 mm, Fa. Roth 8652.1) geleitet. Danach folgten eine Waschflasche mit 0,1 M NaOH, eine mit 0,05 M Ba(OH)₂ als Indikator, ob alles CO₂ absorbiert wurde und eine mit deionisiertem Wasser. Anschließend wurde die CO₂-freie Luft nach einer Aufteilung in zwei Kanäle über je eine leere Gaswaschflasche zum Abtropfen des Kondenswassers geleitet und mit einem Luftrechen verbunden, von dem wiederum 20 Luftkanäle zu den eigentlichen 2000 ml Reaktoren führten. Jeder Ansatz bestand aus einem 2000 ml Gaswaschflasche (ohne Fritte) als Reaktor und zwei nachgeschalteten Absorberflaschen mit 0,2 M NaOH, wobei bei der dem Absorber näher gelegenen Absorberflasche eine Fritte verwendet wurde. Sowohl an der Reaktorflasche als auch an der ersten Absorberflasche befanden sich Septen zur Probeentnahme. Im Gegensatz zur Standardvorschrift nach OECD 301 B wurden die Absorberflaschen nicht gewechselt, um den Zutritt von Raumluft in das System zu minimieren. Die Probenahme von DIC (dissolved inorganic carbon) und DOC (dissolved organic carbon) erfolgte über die Septen, wobei die entnommene NaOH bei der Auswertung berücksichtigt wurde. Die DOC- und IC-Bestimmungen erfolgten mittels eines TOC-Messgerätes (TOC-5000A, Shimadzu). Das Messprinzip beruht auf Verbrennung des organisch gebundenen Kohlenstoffs bei 680°C mit Platinkatalysator (TOC) bzw. Ausstripfen des an-

organischen Kohlenstoffs nach Ansäuerung mit Phosphorsäure (DIC) und nachfolgender Bestimmung des CO₂ im Sauerstoffstrom in einem non-dispersiven Infrarotgasanalysator (NDIR). Für die DOC-Bestimmung wurden die Proben 0,45 µm filtriert (Weissrandfilter, Schleicher&Schuell).

Tab. 19: Synthetisches Verdünnungswasser Kombinationstest

Lösung A:	KH ₂ PO ₄	8,50 g
	K ₂ HPO ₄	21,75 g
	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	33,40 g
	NH ₄ Cl	0,50 g
in deion. H ₂ O. lösen und auf 1 Liter auffüllen, pH soll 7,4		
Lösung B:	CaCl ₂ *2H ₂ O	36,4 g
in deion. H ₂ O. lösen und auf 1 Liter auffüllen		
Lösung C:	MgSO ₄ * 7H ₂ O	22,5 g
In deion H ₂ O. lösen und auf 1 Liter auffüllen.		
Lösung D:	FeCl ₃ * 6H ₂ O	0,25 g
In deion H ₂ O. lösen und auf 1 Liter auffüllen, .Zugabe von 1Tropfen HCl		
Je Liter Verdünnungswasser werden 10 ml der Lösung A sowie je 1 ml der Lösungen B bis D in deion. Wasser gelöst und auf 1 Liter aufgefüllt.		

Der Belebtschlamm wurde für jeden Versuch frisch der Kläranlage Whyll entnommen und durch Absetzen lassen, abdekantieren des Überstandes und Resuspendierung in Verdünnungswasser gewaschen. Dann wurde das Verdünnungswasser (entsprechend OECD 302 B, vgl. Tab. 19) mit dem Belebtschlamm (entsprechend 200 mg TS/l) in die Reaktoren gegeben und das gesamte System über 24 +/- 2 h mit CO₂-freier Luft belüftet. Anschließend erfolgte die Zugabe der Prüfsubstanzen bzw. der Referenzsubstanz Natriumbenzoat. Je 200 ml der 0,2 M NaOH wurden in die Absorberflaschen gefüllt und der Versuch gestartet. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die Prüfkonzentration der Prüfsubstanzen mindestens 80 – 90 mg C/l betragen sollte, um in den Testansätzen eine doppelt so hohe CO₂-Entwicklung erwarten zu können wie in den Kontrollen. Die Prüfkonzentration wurde daher auf 100 mg C/l eingestellt.

Die Testflaschen wurden mit einer konstanten Rate von 50-100 ml/Min. belüftet und mittels Magnetrührer gerührt. An den Werktagen wurden die Belüftung und die Funktion der Magnetrührer per Augenschein überprüft; alle Abweichungen wurden protokolliert.

Mindestens wöchentlich wurden aus den Absorberflaschen und den Reaktoren Proben für die Bestimmung von DIC und DOC entnommen. Am 28. Tag wurde in jedes Reaktorgefäß 1 ml konzentrierte Salzsäure zugegeben, um den Restgehalt an CO₂ in den Prüfsuspensionen auszutreiben. Am 29. Tag erfolgte die letzte Bestimmung des DIC in den Absorberflaschen.

Auswertung

Die theoretisch erwartete CO₂-Menge ThCO₂ [mg] errechnet sich zu:

$$(4) \quad \text{ThCO}_2 \text{ [mg]} = \text{Einwaage [mg]} * \text{Kohlenstoffgehalt [mg/mg]} * 44/12$$

Die aus den Reaktoren freigesetzte CO₂-Menge errechnet sich aus den IC-Werten in den Absorberflaschen (200 ml) wie folgt:

$$(5) \quad \text{CO}_2 \text{ [mg/1500 ml]} = \text{IC [mg/l]} * V_{\text{absorber [l]}} * 44/12$$

Die Abbaurate errechnet sich über die DIC-Messungen wie folgt:

$$(6) \quad \text{Abbau}_{\text{CO}_2} \text{ [\%]} = 100 * (\text{CO}_{2\text{Test}} \text{ [mg]} - \text{CO}_{2\text{Blindwert}} \text{ [mg]}) / \text{ThCO}_2 \text{ [mg]}$$

CO_{2Test} freigesetzte CO₂-Menge im Prüfansatz [mg]

CO_{2Blindwert} freigesetzte CO₂-Menge in Blindwertansätzen [mg]

V_{absorber} NaOH-Volumen der Absorberflaschen [l] (0,2 l – Probenahmenvolumen)

ThCO₂ theoret. CO₂-Entwicklung bei vollständigem Abbau des Prüfgegenstands [mg]

Die Abbaurate der Toxizitätskontrolle wird ebenso berechnet, wobei der ThCO₂ des Gemisches von Prüfgegenstand und Referenzsubstanz aus der Summe der ThCO₂ der Einzelsubstanzen berechnet wird.

Durch die Probeentnahme aus den Reaktoren verringern sich das Volumen und damit die absolute Biomasse sowie die CO₂-Entwicklung im Reaktor.

Gleichzeitig verringert sich durch die Probeentnahme in den Absorbern das Absorbervolumen, wodurch die DIC-Konzentration bei gleichem CO₂-Eintrag ansteigt.

Das aus den Absorberflaschen (200 ml Inhalt) entnommene Volumen von 5 ml pro Messung wurde bei der Berechnung der absorbierten CO₂-Menge berücksichtigt. Die aus den Reaktoren für die DOC-Messungen entnommene Probenmenge von maximal 50 ml wurde hingegen als vernachlässigbar angesehen (max. 3% von 1500 ml). Der Abbau in der Hemmkontrolle wurde auf die Summe der ThCO₂ von Prüf- und Referenzgegenstand bezogen. Während für die Hemmkontrollen der OECD 301 Tests auf leichte biologische Abbaubarkeit Kriterien für eine Hemmwirkung auf das Inokulum aufgestellt wurden (<25% Abbau bezogen auf den ThCO₂) fehlen diese für Test auf inhärente Abbaubarkeit.

Die Eliminationsrate errechnet sich über die DOC-Messungen folgendermaßen:

$$(7) \quad \text{Elimination [\%]} = 100 - 100 \cdot (\text{DOC}_{\text{Test}} [\text{mg/l}] - \text{DOC}_{\text{Blindwert}} [\text{mg/l}]) / \text{TOC}_{\text{Prüfgegenstand}} [\text{mg/l}]$$

$$(8) \quad \text{TOC}_{\text{Prüfgegenstand}} = \text{berechnete TOC-Konzentration des Prüfgegenstands} [\text{mg/l}]$$

2.3.2.2 KOMBINATIONSTEST BEI NIEDRIGEN ANTIBIOTIKAKONZENTRATIONEN

Ergänzende Angaben zur Durchführung

Für den Niedrigkonzentrationsbereich wurden Hydrotox, um dieselben analytischen Standards zu verwenden, Stammlösungen der Antibiotika (1 mg/l) vom TZW zur Verfügung gestellt. Alle Stammlösungen wurden in Methanol als Lösungsmittel (Ausnahmen Benzylpenicillin und Amoxicillin: Aceton) angesetzt. Als Testkonzentration wurde 3,5 µg/l eingestellt. Alle Proben für die substanzspezifische Analytik wurden mit einer Spatelspitze Natriumazid (NaN₃, entsprechend etwa 50 mg/l) konserviert und bis zur Abholung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Die inhärente Abbaubarkeit wurde in Anlehnung an den Kombinationstest mit hoher Inokulumdichte (200 mg TS Belebtschlamm) durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.2.1). Um Verschleppungen aus vorangegangenen Versuchen zu vermeiden, wurden neue 1 Liter Bechergläser, neue Pasteurpipetten zur Belüftung, neue Perfusorspritzen (50 ml) und neue Fläschchen (100 ml Braunglas) für die Probenahme verwendet. Die Testkonzentration wurde dann auf 3,5 µg/l eingestellt, indem zu Beginn die Stammlösung unmittelbar in die Reaktoren gegeben wurde und das Lösungsmittel über 24 h abdampfte.

Der Belebtschlamm aus der Kläranlage Wyhl wurde wiederum auf 200 mg TS/l eingestellt. Je Antibiotikum waren zwei Parallelansätze für 6 Messungen (Doppelbestimmungen) nach 0 h, 3 h, 7 d, 21 d, 27 d und 28 d vorgesehen. Hinzu kam je eine abiotische Kontrolle (mit Belebtschlamm), die mit je 50 mg/l NaN_3 vergiftet wurden. Letztere dienten der Erfassung abiotischer Eliminationsfaktoren wie Adsorption und Stripping. Weiterhin wurde je eine Hemmkontrolle mit Natriumbenzoat (100 mg/l C Standardkonzentration) und den Antibiotika angesetzt. Zudem wurden zwei Referenzansätze mit 100 mg/l C Natriumbenzoat und zwei Blindwerte vorgesehen.

2.3.3 Anaerobe Abbaubarkeit

2.3.3.1 ANAEROBE ABBAUBARKEIT BEI HOHEN ANTIBIOTIKAKONZENTRATIONEN

Grundlagen

Die Bestimmung der anaeroben Abbaubarkeit nach EN ISO 11734 ist ein etabliertes Verfahren, so dass hier keine eigentliche Methodenentwicklung erforderlich war. Verwendet wird Faulschlamm einer kommunalen Kläranlage, der zur Reduzierung des IC mit mineralischem Medium gewaschen und um etwa das Verhältnis 1:10 auf einen TS-Gehalt von 1-3 g/l verdünnt wird. Die Inkubationszeit beträgt 60 d bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Die Prüfsubstanzkonzentration beträgt vorzugsweise 100 mg/l an organischem Kohlenstoff. Gemessen wird der Überdruck des Faulgases, das durch die Umsetzung kohlenstoffhaltiger Verbindungen zu CO_2 und Methan entsteht. Dem Medium ist ein Redoxindikator (Resazurin) zugesetzt, der aerobe Verhältnisse im Ansatz durch Farbumschlag in das Rötliche anzeigt. Als einzige Neuerung zur Standarddurchführung wurde eine zusätzliche Adsorptionskontrolle vorgesehen, bei der der Impfschlamm mit dem Biozid $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (20 mg Cu^{++}/l) vergiftet wurde. Ferner wurde neben der Endabbaubarkeit zu Faulgas zusätzlich die DOC-Elimination mitbestimmt.

Durchführung

Das Versuchsprotokoll wurde mit dem Umweltbundesamt (Herr Meinecke) abgestimmt. Zur Inkubation bei 35°C wurden 610 ml Reaktoren mit Septen verwendet. Das Ansetzen des Impfschlammes mit den mineralischen Nährlösungen entsprach dem Vorgehen für die Durchführung des anaeroben Hemmtests (vgl. Tab. 39, jedoch ohne Hefeextrakt). Der Faulschlamm wurde wiederum dem Faulturm der Kläranlage Wyhl entnommen und einmal durch Zentrifugation und Wiederaufnahme in mineralischer Nährlösung gewaschen, um den IC in den Blindwerten zu reduzieren. Die Schlammkonzent-

ration wurde auf 1 g TS/l eingestellt. Als Referenzsubstanz wurde Natriumbenzoat (100 mg C/l) eingesetzt. Jeweils ein zusätzlicher Ansatz wurde für die Hemmkontrolle (Prüf- und Referenzsubstanz) und die Adsorptionskontrolle (Schlamm mit dem Biozid $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ vergiftet) vorgesehen. Die Testkonzentration wurde auf 100 mg/l TOC festgelegt. Der über das Faulgas in Form von Methan oder CO_2 freigesetzte Kohlenstoff in der Gasphase wurde anhand von Druckmessungen ermittelt. Nach Versuchsende wurde der IC bestimmt, um das in der wässrigen Phase gelöste CO_2 mitzufassen. Zusätzlich wurde der DOC in der wässrigen Phase bestimmt.

Auswertung

Ein Mol Methan und ein Mol CO_2 enthalten je 12 g Kohlenstoff. Nach Umrechnung über das Gasgesetz gilt für den in der Gasphase freigesetzten Kohlenstoff:

$$(9) \quad m_h = \frac{12000 * 0,1 * (\Delta p * V_h)}{RT}$$

Dabei ist:

m_h	die Netto-Masse an gebildeten Kohlenstoff im Faulgas in mg,
Δp	der Gasdruck im jeweiligen Gefäß abzüglich des entsprechenden Mittelwertes der Blindwerte in mbar,
V_h	Volumen der Gasphase im Gefäß in Litern,
0,1	Umrechnungsfaktor für Newton je Quadratmeter in Millibar und Kubikmeter in Litern,
R	die Gaskonstante [8,314 J/(mol*K)],
T	die Inkubationstemperatur in Kelvin.

Bei einer üblicherweise gewählten Inkubationstemperatur von 35°C (308 K) errechnet sich hieraus:

$$(10) \quad m_h = 0,468 (\Delta p * V_h)$$

Neben der Faulgasmenge muss auch der Kohlenstoffgehalt in der wässrigen Phase berücksichtigt werden, der anhand von TIC -Messungen bestimmt wird:

$$(11) \quad m_l = \Delta \text{IC} * V_l$$

Dabei ist:

- m_i die Kohlenstoffmassenkonzentration in der wässrigen Phase in mg,
 ΔIC der IC im jeweiligen Gefäß abzüglich des entsprechenden Mittelwertes der Blindwerte in mg/l,
 V_i das Flüssigkeitsvolumen im Testgefäß in Litern.

Der biologische Abbaugrad errechnet sich aus dem Kohlenstoffgehalt in der Gasphase und dem in der wässrigen Phase zu:

$$(12) \quad D_t = \frac{(m_h + m_l) * 100}{m_v} = \frac{(m_h + m_l) * 100}{mg C * V_l}$$

Dabei ist:

- D_t der biologische Abbaugrad aufgrund des in der Gas- und Wasserphase gebildeten CO_4 und CO_2 (m_l wird nur bei Versuchsende berücksichtigt),
 m_v die Massenkonzentration an Kohlenstoff der zugegebenen Prüfsubstanz in mg,
 $mg C$ die Kohlenstoffmassenkonzentration des Prüfgegenstandes im Test in mg/l,
 V_l das Flüssigkeitsvolumen im Testgefäß in Litern.

2.3.3.2 ANAEROBE ABBAUBARKEIT BEI NIEDRIGEN ANTIBIOTIKAKONZENTRATIONEN

Ergänzende Angaben zur Durchführung

Die Versuchsdurchführung erfolgte in Anlehnung an EN ISO 11734 (s. Kapitel 3.3.3.1), wobei diese Versuche aufgrund der Gefahr von Verschleppungen mit neuen 100 ml Simax Flaschen mit Buthylgummistopfen und 45er Lochkappe (Gesamtvolumen 121 ml, Füllvolumen 80 ml) angesetzt wurden.

Die Entnahme von Proben für die Analytik unter anaeroben Bedingungen erwies sich als zu störanfällig, so dass nach Rücksprache mit dem Auftraggeber beschlossen wurde, die Anzahl der parallelen Testansätze zu erhöhen und analog zum Closed Bottle Test je zwei Flaschen für jeden Messzeitpunkt zu opfern. Bei 6 Messzeitpunkten ergab sich daraus die Notwendigkeit von 12 Flaschen je Antibiotikum. Aufgrund der Matrixuntersuchungen wurde festgelegt, dass der die Analytik störende Redoxindikator (Resazurin) nicht zugegeben wurde. Die Testkonzentration der Antibiotika wurde auf 3,5 µg/l eingestellt, indem zu Beginn des Versuches die Stammlösungen

direkt in die Reaktoren gegeben wurden und das Lösungsmittel über 24 h unter dem Abzug abdampfte.

Zusätzlich wurde je eine abiotische Kontrolle (mit Schlamm), die mit 4 mg NaN_3 auf 80 ml (= 50 mg/l) vergiftet wurde sowie je zwei Hemmkontrollen mit Natriumbenzoat (100 mg/l C) angesetzt (Erfassung von Adsorptionseffekten bzw. von Hemmwirkungen auf den Faulschlamm). Als Referenzprobe wurde Natriumbenzoat (100 mg/l C) verwendet, als Kontrolle wurden 4 Blindwerte mitgeführt.

Die Faulschlammkonzentration wurde wie bei den Ansätzen im hohen Konzentrationsbereich auf 1 g TS/l, die Inkubationstemperatur auf 35°C festgelegt. Der Faulschlamm wurde der KA Wyhl entnommen. Druckmessungen zur Bestimmung der Faulgasproduktion wurden nur bei Hemmkontrollen, Referenzproben und Blindwerten durchgeführt (Funktionskontrolle), da die Druckmessung im niedrigen Konzentrationsbereich zu unempfindlich ist, um den Abbau der getesteten Antibiotika auf diese Weise zu verfolgen. Unmittelbar nach der Probenahme wurden die zurückgestellten Flaschen mit je einer Spatelspitze NaN_3 konserviert (etwa 8 mg NaN_3 auf 80 ml Endkonzentration). Die Probenahme der abiotischen Kontrollen und der Hemmkontrollen wurde nach Versuchsende vorgenommen.

2.3.4 Kläranlagensimulationstest OECD 303 A : 1981 (modifiziert) und Draft Document : 2000

2.3.4.1 BELEBTSCHLAMM- UND VERFAHRENSPARAMETER

Vier Modellkläranlagen wurden parallel betrieben wobei nach einer Einfahrphase bis zu drei Anlagen mit der Testsubstanz beaufschlagt wurden, während die andere(n) als Kontrollanlage(n) ohne Zusatz der Prüfsubstanz jedoch unter ansonsten gleichen Bedingungen betrieben wurde / wurden. Anhand verschiedener Verfahrensparameter wurden

- a) die Einflüsse der Testsubstanz auf die Reinigungsleistung der Kläranlage,
- b) die Abbaubarkeit der Antibiotika und
- c) die Effekte auf die Belebtschlammzönose untersucht.

Versuchsaufbau

Die Modellkläranlagen sind nach folgendem Schema aufgebaut:

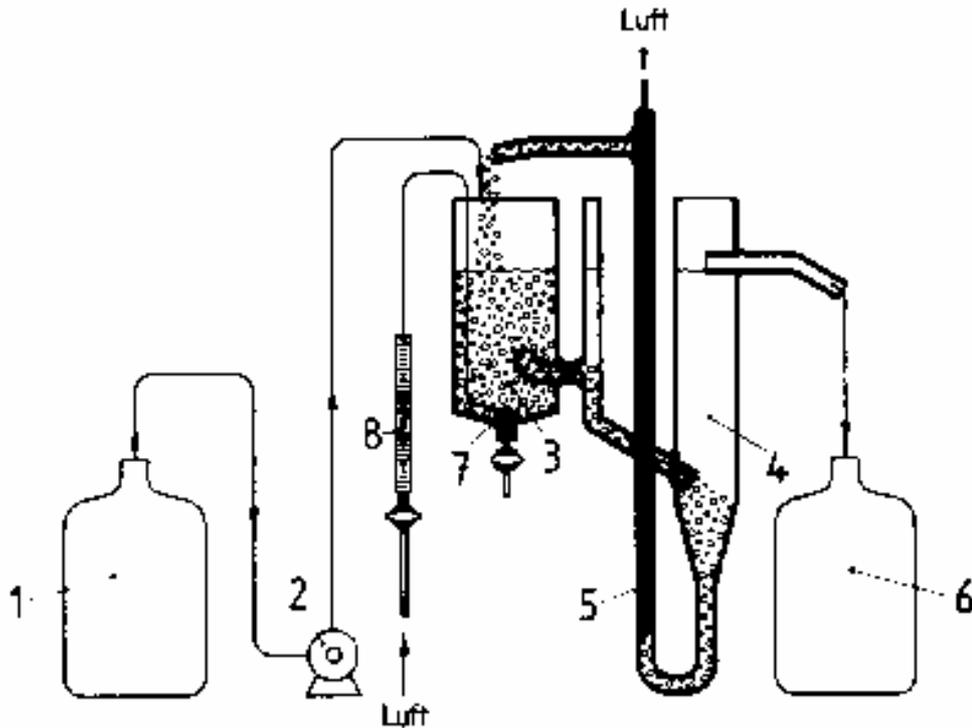


Abb. 11: Schema einer Modellkläranlage:

1 = Vorratsgefäß; 2 = Dosierpumpe; 3 = Belebungsbecken; 4 = Absetzbecken; 5 = Mammutpumpe zur Schlammrückführung; 6 = Sammelgefäß für den Ablauf; 7 = Belüftungsfritte; 8 = Air-flow-Messgerät (wurde nicht eingesetzt)

Das Belebungsbecken jeder Anlage fasst drei Liter, das Absetzbecken zwei Liter. Die Anlagen sind aus Glas, um die Adsorption möglichst gering zu halten.

Die Belüftung des Schlammes erfolgte mit Aquariumpumpen über zwei Glasrohre am Boden des Belebungsbeckens. Die Konstruktion der Belüftungsrohre muss auch am Beckenboden für eine ausreichende Durchmischung des Schlammes sorgen. Der Belebtschlamm ging mit einer Rate von 0,5 l/h ins Absetzbecken über und wurde mit einer Mammutpumpe alle 20 min für 10 sec zurück ins Belebungsbecken gepumpt. In Abweichung von der OECD-Vorschrift (1981) erfolgt kein Austausch von Belebtschlamm zwischen Test- und Kontrollanlage, da die Einflüsse der Antibiotika auf die Belebtschlammpopulationen mittels Chemotaxonomie verfolgt werden sollten. In einem Vorschlag zur Aktualisierung der Testvorschrift (Draft Document) wird von der OECD zudem darauf hingewiesen, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen

gekoppelten und nicht gekoppelten Einheiten bestehen, so dass der Aufwand des Austausches nicht gerechtfertigt ist.

Mit Hilfe von Aquarienheizstäben wurde die Temperatur auf 23°C eingestellt (Ausnahme 1. Kläranlagenversuch).

Die Nährstoffe und Salze des synthetischen Abwassers wurden dem Belebungsbecken als gekühltes Konzentrat (4°C) getrennt vom Trinkwasser mit einer Schlauchpumpe zugeführt. Die chemische Zusammensetzung und die Konzentration des synthetischen Abwassers entsprachen nach der Verdünnung mit Trinkwasser der OECD-Norm. Die Zufuhrschläuche wurden einmal wöchentlich mit 70%igem Ethanol gespült, wodurch die Verkeimung der Substratschläuche verringert wurde.

Inokulum

Alle Anlagen wurden mit Belebtschlamm aus der kommunalen Kläranlage Wyhl (Abwasserzweckverband Nördlicher Kaiserstuhl) beaufschlagt. Im Einzugsgebiet der Kläranlage befinden sich keine Krankenhäuser, Alten- und Pflegeheime, weshalb das Abwasser und damit der Belebtschlamm gering belastet sein dürften.

Bis zum Einsatz wurde der Belebtschlamm belüftet. Der Belebtschlamm hat nach Auskunft der Wyhler Kläranlage einen Trockensubstanzgehalt von 8-9 g/l.

Synthetisches Abwasser

Tab. 20: Zusammensetzung des synthetischen Abwassers

Substanz	Menge [mg/l]
Pepton aus Casein	160
Fleischextrakt	110
Harnstoff	30
NaCl	7
CaCl ₂ * 2H ₂ O	4
MgSO ₄ * 7H ₂ O	2
NaHCO ₃	196

Testsubstanzen

Tab. 21: Einteilung der Kläranlagensimulationsversuche

Ver- such- Nr.	Ansatz	Klär- anlage	Kon- zen- tra- tion [µg/l]	Datum	Sommer/ Winter	Dauer [d]	
						Einfahr- phase	Ge- samt
I	Kontrolle	1	-	19.04.-07.06.01	Sommer	24	49
I	Ofloxacin	2	22	19.04.-07.06.01	Sommer	24	49
I	Vancomycin	3	7	19.04.-07.06.01	Sommer	24	49
I	Kontrolle	4	-	19.04.-07.06.01	Sommer	24	49
II	Kontrolle	1	-	29.10.-14.12.01	Winter	21	47
II	Kontrolle	2	-	29.10.-14.12.01	Winter	21	47
II	Tetracyclin	3	40	29.10.-14.12.01	Winter	21	47
II	Amoxicillin	4	520	29.10.-14.12.01	Winter	21	47
III	Metronidazol	1	16	14.01.-01.03.02	Winter	21	47
III	Gentamycin	2	1,2	14.01.-01.03.02	Winter	21	47
III	Erythromycin	3	10	14.01.-01.03.02	Winter	21	47
III	Kontrolle	4	-	14.01.-01.03.02	Winter	21	47
IV	Clindamycin	1	8	21.05.-08.07.02	Sommer	20	49
IV	Chlortetracyclin	2	30	21.05.-08.07.02	Sommer	20	49
IV	Kontrolle	4	-	21.05.-08.07.02	Sommer	20	49
V	Kontrolle	1	-	04.11.-20.12.02	Winter	21	47
V	Cefuroxim	2	50	04.11.-20.12.02	Winter	21	47
V	Sulfamethoxazol	3	222	04.11.-20.12.02	Winter	21	47
V	Vancomycin	4	7	04.11.-20.12.02	Winter	21	47

Versuchsablauf

Es wurden fünf Kläranlagensimulationsversuche mit elf unterschiedlichen Antibiotika durchgeführt. Das Antibiotikum Vancomycin wurde zweimal untersucht, da sich bei der ersten Untersuchung Probleme bei der statistischen Auswertung ergaben. Bei den Simulationsversuchen wurden jeweils vier Anlagen parallel betrieben, wobei mindestens eine Anlage als Kontrolle diente, während die restlichen Anlagen nach einer Einfahrphase von drei Wochen mit Antibiotika beaufschlagt wurden. Dabei wurden die Konzentrationen so gewählt, dass sie um den Faktor 20 höher lagen als die bilanzierten Werte für Zuläufe kommunaler Kläranlagen (Alexy 2003), um Konzentrationsspitzen im Abwasser zu simulieren. Die gesamte Versuchsdauer eines Kläranlagensimulationstests betrug sieben Wochen. Um jahreszeitlich bedingte Unterschiede in der Zusammensetzung des Schlammes zu erfassen, wurden die Simulationsversuche in Winter- und Sommersversuche eingeteilt. Es wurde versucht, un-

terschiedliche Wirksubstanzen mit ähnlichen Strukturen und Eigenschaften im „Sommer-“ sowie im „Winterversuch“ zu testen.

Die Überwachung der Betriebsfähigkeit der Kläranlage erfolgte durch regelmäßige Messungen der Temperatur, des Sauerstoffgehalts, des pH-Werts, der Schlamm Trockensubstanz, des Schlammvolumens und des Schlammvolumenindex, Schlammalter und -belastung, dem Verhältnis aus DOC in Zu- und Ablauf sowie dem Gehalt an Nitrat, Nitrit, Ammonium und Gesamtstickstoff.

Sollwerte

Während des gesamten Versuches sind laut Vorschrift (OECD 1981; OECD 303 A) für einige Parameter Sollwerte vorgeschrieben. Diese Sollwerte sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tab. 22: Sollwerte des Kläranlagensimulationstests OECD 303A

Sauerstoffgehalt	>2 mg/l
pH-Wert	7-8
Temperatur	18-25°C
TS-Gehalt	2,5 g/l
DOC-Elimination	>80%

Sauerstoff, pH-Wert und Temperatur

Die Temperatur, die Sauerstoffkonzentration sowie der pH-Wert im Belebungsbecken der vier Laborkläranlagen wurden werktäglich mittels Elektroden gemessen (MultiLab P4, WTW, Weilheim).

Biologischer Abbaugrad des synthetischen Abwassers

Nach OECD ist der Kläranlagensimulationstest nur dann gültig, wenn das synthetische Abwasser zu mehr als 80% abgebaut wird. Die Abbauleistung des Belebtschlammes wurde über den Eliminationsgrad des zugeführten gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) bestimmt. Hierfür wurde zwei- bzw. dreimal wöchentlich eine Probe mit Hilfe einer 10 ml-Spritze direkt aus dem Ablaufbecken jeder Anlage entnommen und mittels eines Filteraufsatzes durch einen Cellulose-Nitrat-Filter (Porenweite 0,45 µm, Sartorius, Göttingen) filtriert. Die Probenröhrchen wurden mit Pa-

rafilm verschlossen und bis zur Messung im Kühlschrank gelagert (max. 1 Woche). Vor der Messung wurden die Nährmediumsproben verdünnt und mit einigen Tropfen 2 M Salzsäure angesäuert. Die Bestimmung des DOC erfolgte mit einem DOC-Messgerät (TOC 5000/ASI 5000, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg). Die DOC-Werte des Nährmediums und des Zulaufwassers ergeben unter Berücksichtigung ihrer Flussraten die DOC-Zulaufkonzentration. Mit der gemessenen DOC-Konzentration im Ablauf lässt sich der Eliminationsgrad wie folgt bestimmen:

$$(13) \quad \text{Elimination} = \left[1 - \frac{(\text{DOC}_{\text{Ablauf}})}{(\text{DOC}_{\text{Zulauf}})} \right] \cdot 100 [\%]$$

DOC gelöster organischer Kohlenstoff in [mg/l].

Trockensubstanz (DIN 38414/2, 1985)

Der Trockensubstanzgehalt des Belebtschlammes wurde zwei- bis dreimal wöchentlich in den Belebungsbecken aller vier Modellkläranlagen bestimmt. Es wurden Papierrundfilter (S&S Faltenfilter 595 ½, Schleicher & Schuell, Dassel), die zuvor mit 100 ml Wasser gespült wurden, bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Aus dem Belebungsbecken wurden abweichend von der Norm 20 ml Belebtschlamm nach guter Durchmischung entnommen und über einen Filter bekannten Gewichts filtriert. Der Filter wurde erneut bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und sein Gewicht bestimmt. Die Differenz der Filtergewichte ergab die Trockenmasse für 20 ml Belebtschlamm, die dann auf ein Liter umgerechnet wurde.

Schlammvolumen

Die Bestimmung des Schlammvolumens wurde abweichend von der Norm (DIN 38414, Teil 10, 1981) in einem 100 ml statt einem 1000 ml Messzylinder durchgeführt. Bei einem Fassungsvermögen des Belebungsbeckens von drei Litern ist die Entnahme eines Liters für die Bestimmung des Schlammvolumens nicht praktikabel. Jede Woche wurden zwei- (Einfahrphase) bzw. dreimal (Testphase) 100 ml Schlamm aus dem Belebungsbecken entnommen und das Volumen bestimmt, das der Schlamm nach 30 min Absetzzeit einnimmt. Das Schlammvolumen wird in ml/l angegeben.

Schlammvolumenindex (DIN 38 414 Teil 10, 1981)

Der Schlammvolumenindex ist ein wichtiger Parameter in der Abwasserbehandlung und gibt das Absetzvolumen bezogen auf 1 g Belebtschlamm an. Der Schlammvolumenindex wird gemäß Gleichung 14 bestimmt:

$$(14) \quad SVI = \frac{SV}{TS}$$

SVI Schlammvolumenindex in ml/g,

SV Schlammvolumen in ml/l,

TS Trockensubstanzgehalt in g/l.

Schlammalter

Das Schlammalter beschreibt die mittlere Verweildauer des Belebtschlammes im Belebungsbecken. Ein gewisses Schlammalter (ca. 2-3 Generationszeiten der Nitrifikanten) ist Voraussetzung für eine Nitrifikation. Nitrifikanten können nur dann im Belebtschlamm überleben, wenn das Schlammalter größer als deren Generationszeit ist. Für eine weitgehende Nitrifikation sollte das Schlammalter zwei- bis dreimal so hoch sein wie die Generationszeit der Nitrifikanten (Mudrack und Kunst 1994).

Die allgemeine Formel zur Berechnung lautet:

$$(15) \quad t_s = \frac{TS \cdot V_{BB}}{Q_{\ddot{U}S} \cdot TS_{\ddot{U}S} + Q \cdot TS_E}$$

t_s Schlammalter in d,

TS Trockensubstanzgehalt des Belebtschlammes in g/l,

V_{BB} Volumen des Belebungsbeckens in l,

$Q_{\ddot{U}S}$ tägliche Überschussschlammmenge in l/d,

$TS_{\ddot{U}S}$ Feststoffgehalt des Überschussschlammes in g/l,

Q tägliche Abwassermenge in l/d,

TS_E Feststoffgehalt des Ablaufs in g/l.

Da der Feststoffgehalt im Ablauf bei allen Kläranlagen vernachlässigbar klein war und der Feststoffgehalt des Überschussschlammes dem Trockensubstanzgehalt des Belebtschlammes im Belebungsbecken entspricht, kann Gleichung 15 verkürzt werden zu:

$$(16) \quad t_s = \frac{V_{BB}}{Q_{\dot{U}S}}$$

Schlammbelastung

Als einer der wichtigsten Bemessungswerte in der biologischen Abwasserreinigung gibt die Schlammbelastung an, welche Menge an organischem Substrat von einer bestimmten Biomasse umgesetzt werden muss (Mudrack und Kunst 1994). Um für Nitrifikanten geeignete Bedingungen zu erhalten, sollte die Schlammbelastung bei 0,1 mg DOC/(mg TS*d) liegen (Schöberl 1991). Die Schlammbelastung lässt sich wie folgt bestimmen:

$$(17) \quad DOC_{TS} = \frac{F_{dDOC}}{V_{BB} \cdot TS}$$

DOC_{TS} Schlammbelastung der Kläranlage in mg DOC/(mg TS*d),

F_{dDOC} DOC-Fracht des Zulaufs pro Tag in mg/d,

V_{BB} Volumen des Belebungsbeckens in ml,

TS Trockensubstanzgehalt des Belebtschlammes in mg/ml.

Stickstoffparameter

Aus dem Ablauf der Kläranlagen und aus den Kanistern für das Zulaufwasser wurden zwei- (Einfahrphase) bis dreimal (Testphase) pro Woche ca. 40 ml Flüssigkeit entnommen und über einen Cellulose-Acetat-Filter (Porenweite 0,45 µm, Sartorius, Göttingen) in 50 ml Probenröhrchen (Cellstar, 50 ml, Greiner bio-one) filtriert. Das Nährmedium wurde ungefiltert in die Probenröhrchen gegeben. Bis zur Messung wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

Die Stickstoffparameter Ammonium, Nitrat, Nitrit wurden zum Teil photometrisch (Reagenzientest Spectroquant®, Merck, Darmstadt; Spektralphotometer Ultraspec® III, Pharmacia, Freiburg; s. Kapitel 3.4.4) sowie teilweise mit Hilfe eines Ionenchromatografen (Dionex, Idstein; Säule: IonPac AG4A, Dionex; Suppressor: ASRS Ultra 4 mm, Dionex) bestimmt. Hierbei wurden 50 µl der Probe bei einer Flussrate von 2 ml/min gemessen. Die Bestimmung wurde isokratisch mit einem Eluenten (0,18 mM Na₂CO₃/ 0,17 mM NaHCO₃) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem Leitfähigkeitsdetektor (CD25 Conductivity Detector, Dionex, Idstein).

Gesamtstickstoff

Für die Gesamtstickstoffbestimmung wurden insgesamt fünfmal während der Testphase ca. 300 ml Ablauf sowie ca. 80 ml des Nährmediums in PE-Flaschen abgefüllt und eingefroren. Am Ende des Versuches wurde außerdem die Hälfte des Belebtschlammes aus dem Belebungsbecken entnommen, zentrifugiert, lyophilisiert und bis zur Bestimmung eingefroren. Die Bestimmung erfolgte fotometrisch mit einem Autoanalyser (Skalar, Erkelenz).

Mikroskopische Schlammentersuchung

Aus jeder Anlage wurde in der Testphase wöchentlich 5 ml Schlamm entnommen und mit Glutardialdehyd fixiert. Bis zum Mikroskopieren wurden die Proben bei 4°C aufbewahrt. Zur Untersuchung wurde ein Mikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena) mit Phasenkontrast verwendet.

2.3.4.2 STOFFSPEZIFISCHE ANALYTIK

Die stoffspezifische Analytik wurde vom Technologiezentrum Wasser in Karlsruhe durchgeführt. Aus dem Ablauf der Kläranlagen wurden in der Testphase dreimal wöchentlich ca. 300 ml entnommen, in 500 ml PE-Flaschen gefüllt und eingefroren. Zur analytischen Untersuchung des Zulaufes genühten 50 ml der Antibiotikumlösung (2 x wöchentlich). Am Ende des Versuches wurde die Hälfte des Belebtschlammes zur Antibiotikabestimmung entnommen und zentrifugiert, lyophilisiert und eingefroren. Die Bestimmung erfolgte mittels LC-ESI-MS-MS wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

2.3.4.3 UNTERSUCHUNG DER POPULATIONSDYNAMIK

2.3.4.3.1 Chemotaxonomie

Experimentelle Untersuchung

Mit Hilfe der Chemotaxonomie können Aussagen über die Zusammensetzung mikrobieller Biozönosen getroffen werden. Dabei dienen Polyamine und Chinone als Biomarker für bestimmte Bakteriengruppen. Chinone kommen in der Cytoplasmamembran vor, sie spielen eine Rolle bei der Energiegewinnung der Zelle durch Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung. Die chemotaxonomisch genutzten Chinone sind die Ubi- und die Menachinone. Polyamine finden sich innerhalb der bakteriellen Zelle und haben vielfältige Funktionen bei der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese.

Chinone

Aus jeder Anlage wurden zweimal pro Woche 150 ml Schlamm entnommen. Der Schlamm wurde zunächst zentrifugiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert. Die Extraktion der Chinone erfolgte leicht modifiziert nach Hiraishi (1988). Etwa 150 ml Belebtschlammprobe wurde bei 5000 g 10 min abzentrifugiert und ca. 3 Tage lyophilisiert (Lyovac GT2, Amsco, Finnland). Es wurden ca. 170 mg des Lyophilisates in ein Teflonröhrchen abgewogen. Danach wurde der Schlamm mit 20 ml des Extraktionsgemisches (Aceton/Methanol - 2:1 V/V) versetzt und im Eisbad stehend mit Ultraschall (Sonoplus HD 200, Bandelin, Berlin) 2 min lang aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die Röhrchen zentrifugiert und der Überstand über einen Faltenfilter (Schleicher & Schuell 595 ½) in einen Rundkolben filtriert. Das Pellet wurde mit 20 ml des Extraktionsgemisches auf Eis und unter Rühren eine Stunde lang extrahiert. Der Überstand wurde ebenfalls in den Rundkolben filtriert. Dieser Extraktionsvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die vereinigten Extrakte wurden dann mit einem Rotationsverdampfer (Labo Rota S 300, resona technics, Buchs) bei 25°C bis zur Trocknung eingeeengt. Die so eingeeengten Chinone wurden zweimal in je 4 ml Aceton gelöst, in 4 ml-Analysefläschchen überführt und unter Stickstoff so eingeeengt, dass sie in 1,5 ml-Analysefläschchen überführt werden konnten.

Die Auftrennung der Chinone in Mena- und Ubichinone erfolgte mittels Festphasenextraktion (SPE). Dazu wurden die in Aceton gelösten Proben bis zur Trockene eingeeengt und in 1 ml n-Hexan (Merck, Darmstadt) aufgenommen. Die SiOH-Säulen (Chromabond®, Macherey-Nagel, Düren) wurden mit 7 ml n-Hexan konditioniert. Anschließend wurden 200 µl der Probensubstanz auf die Säule aufgebracht. Die Störkomponenten wurden jeweils mit n-Hexan entfernt. Als Elutionsmittel für die Menachinone diente ein Gemisch aus 3% tert.-Butylmethylether (Merck, Darmstadt) in n-Hexan und für die Ubichinone ein Gemisch aus 15% tert.-Butylmethylether (Merck, Darmstadt) in n-Hexan.

Die Bestimmung der Chinone erfolgte mit der HPLC (LC 10, Shimadzu, Duisburg) auf einer RP 18-Säule (HD) (CC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18, Macherey & Nagel, Düren). Die Detektion der Ubichinone erfolgte bei 275 nm, die der Menachinone bei 270 nm mit einem UV/VIS-Detektor (Modell SPD-M10A, Shimadzu, Duisburg). Die

Flussrate betrug 1 ml/min, es wurde isokratisch mit Methanol/Isopropylether (78:22, v/v) bei 25°C aufgetrennt. Die gleichzeitige Aufnahme der Spektren mit Hilfe des Di-odenarray (SPD-M10A, Shimadzu, Duisburg) wurde neben der Retentionszeit und Standardaddition zur Identifizierung herangezogen. Die Auswertung erfolgte als Molprozent der einzelnen Chinone.

Polyamine

Die Extraktion der Polyamine erfolgte leicht modifiziert nach Scherer und Kneifel (1983). Etwa 150 ml Belebtschlammprobe wurde bei 5000 g 10 min abzentrifugiert und ca. 3 Tage lyophilisiert (Lyovac GT2, Amsco, Finnland). Zirka 170 mg des Lyophilisates wurden in ein Schraubglas abgewogen und mit 13 µmol des internen Standards Diamonooctan, sowie mit 2,5 ml 0,2 M Perchlorsäure (Merck, Darmstadt) versetzt. Die Probe wurde bei 100°C für 30 min im Wasserbad hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurden die Proben 10 min bei 3500 g zentrifugiert. Zur Derivatisierung wurden 0,2 ml des Überstandes in ein 4 ml-Analysenfläschchen (Alltech, München) überführt, mit 0,3 ml Natriumcarbonatlösung (100 g/l in Aqua dest., Merck) sowie 0,8 ml Dansylchloridlösung (7,5 mg/ml in Aceton, Merck) vermischt und für 20 min auf 60°C erwärmt. Um das überschüssige Dansylchlorid nach der Derivatisierung zu entfernen, wurde 0,1 ml Prolinlösung (50 mg/ml in Aqua dest.) dazugegeben und für weitere 10 min auf 60°C erwärmt. Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe von 0,1 ml Toluol (Merck, Darmstadt). Nach kräftigem Mischen und anschließender Phasentrennung wurde die obere Toluolphase in 1,5 ml-Analysenfläschchen überführt. Nach erneuter Zugabe von 0,1 ml Toluol wurde die letzte Prozedur noch einmal wiederholt.

Die Bestimmung der Polyamine erfolgte mit HPLC (LC 10, Shimadzu, Duisburg) auf einer RP 18-Säule (HD) (CC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18, Macherey & Nagel). Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenz-Detektor (RF-10A, Shimadzu, Duisburg). Ein linear binärer Gradient, ausgehend von 40% Acetonitril / 60% H₂O, wurde innerhalb von 35 min auf 85% Acetonitril / 15% H₂O gesteigert. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 1 ml/min bei 40°C. Aus den Chromatogrammen wurden die Anteile der sechs Polyamine in Molprozenten bestimmt.

Statistische Methoden

In diesem Abschnitt werden die Daten und die verwendeten Methoden dargestellt, die verwandt wurden, um die chemotaxonomischen Messungen während der Versuche auszuwerten.

Datenmaterial, Datenaufbereitung und Datenqualität

Das zur Verfügung stehende Datenmaterial lässt sich in 4 Gruppen von Variablen einteilen: Zunächst die Gruppe der Einflussvariablen sowie die drei Gruppen der chemotaxonomischen Zielvariablen. Die Gruppen und die einzelnen Variablen sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tab. 23: Übersicht über die beobachteten Variablen

Gruppe	Variablen [Abkürzung]
Einflussgrößen – gemessen - erstellt	O ₂ [O], pH-Wert [P], Temperatur [T] Heizer [H], Antibiotikum [A], wahre Zudosierung [W]
Polyamine	Hydroxyputrescin [HPut], Diaminopropan [DAP], Putrescin [Put], Cadaverin [Cad], Spermidin [SPD], symhomo-Spermidin [HSPD]
Menachinone	M-6 [M6], M-7 [M7], M-8 [M8], M-8(H ₂) [M8H2], M-9/M-8(H ₄) [M9M8], M-9(H ₂) [M9H2], M-10/M-9(H ₄) [M10M9], M-9(H ₄) [M9H4]
Ubichinone	Q-8 [Q8], Q-9 [Q9], Q-10 [Q10]

Die Verwendung von Abkürzungen ist für die Übersichtlichkeit bei der Programmierung sowie für die Darstellung der Ergebnisse notwendig geworden.

Die chemotaxonomischen Variablen wurden in Form der Peakflächen aus den HPLC-Messungen in der Analyse verwendet. Dies geschah in erster Linie wegen fehlender Standards für einige der chemotaxonomischen Variablen. Die übliche Aufzeichnung als prozentuale Anteile der Peakfläche je Messung ist nicht für eine statistische Auswertung geeignet. Eine Änderung des Prozentanteils je Messung kann eine Änderung der Menge des jeweiligen Stoffes zum Teil hervorheben aber auch unterdrücken. Auch wird auf diese Weise eine Korrelation zwischen den Zielgrößen

erzeugt, die bei der Auswertung berücksichtigt werden muss, aber schwankt. Durch die Verwendung der Peakflächen wird in Kauf genommen, dass das Rauschen aufgrund unterschiedlicher Einwaage größer wird, aber eine Schaffung von Scheinzusammenhängen vermieden. Eine Erfassung der mmol/gTS Werte war nicht für alle Variablen möglich, weshalb diese Maßskala, trotz der besseren Vergleichbarkeit der Werte, nicht zum Einsatz kam.

Sauerstoff wurde in mg/l und Temperatur in Grad Celsius erfasst.

Alle Daten wurden über den zeitlichen Verlauf der Versuche aufgezeichnet, weshalb die Messungen zeitliche Abhängigkeiten aufweisen.

Der Gruppe der Einflussgrößen (Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Temperatur) sind drei weitere Variablen zugefügt worden (vgl. Tabelle 23): Heizer, Antibiotikum und wahre Zudosierung. Diese Variablen sind dichotom, d. h. sie nehmen nur zwei Ausprägungen an (Null für „nicht aktiv“ bzw. „keine Zudosierung“ und Eins für „aktiv“ bzw. „Zudosierung“). Mit der Variable Heizer wurde der Einsatz von Heizern zur Stabilisierung der Temperatur modelliert. Die Einführung dieser Variable war notwendig, da die Heizer im ersten Versuch nicht über die gesamte Beobachtungsperiode installiert waren. Die Variable Antibiotikum beinhaltet die Information über die *angenommene* Zudosierung eines Antibiotikums für die entsprechende Anlage. Diese Variable diente der Untersuchung, ob auch zusätzliche Kontrollen sich nach der Einlaufphase verändern und damit feststellen zu können, ob die Anlage der Versuche geeignet ist, um die interessierenden Veränderungen zu erfassen.

Software

Die Rohdaten standen im MS-Excel Format zur Verfügung. Sie wurden zunächst aufbereitet und als Textdatei für die statistische Analyse abgelegt. Für die statistische Auswertung des Datenmaterials wurde die GPL Software R (Ihaka und Gentleman 1997, <http://www.r-project.org>) für Windows bzw. Linux in der Version 1.7.0. vom 28.02.2003 verwendet.

Statistische Verfahren und Begriffe

Im Folgenden sollen kurz die statistischen Verfahren genannt und vorgestellt werden, die in dieser Analyse Verwendung fanden. Dabei wird das Augenmerk eher auf eine verständliche denn auf eine formale mathematische Darstellung gerichtet. Die Darstellung basiert dabei auf Hartung et al. (1999) und Toutenbourg (1992).

Stetige und diskrete (Zufalls-) Variablen

Im analysierten Datensatz finden sich zwei Klassen von Variablen, nämlich stetige und diskrete Beobachtungen. Diskrete Variable können nur abzählbar (aber nicht notwendigerweise endlich) viele Werte annehmen. Als Beispiel für diskrete Variablen seien die dichotomen Einflussgrößen genannt, die im vorliegenden Fall die Werte 0 und 1 annehmen können. Dagegen können stetige Variablen überabzählbar viele Werte annehmen, z. B. alle reellen Zahlen oder alle Zahlen aus dem Intervall $[0, 1]$. Die gebildeten Differenzen der chemotaxonomischen Messwerte sind Beispiele für stetige Beobachtungen.

Korrelationskoeffizient

Der Korrelationskoeffizient (nach Bravais-Pearson) lässt sich zwischen zwei stetigen Zufallsvariablen berechnen. Der Korrelationskoeffizient hat dabei die Eigenschaft, dass er Werte zwischen -1 und 1 annimmt. Liegt der Koeffizient „nahe“ bei 1 , so besteht eine starke positive lineare Abhängigkeit zwischen den Variablen. Hat eine Variable einen großen Wert, so wird die andere auch einen großen Wert annehmen. Liegt der Koeffizient „nahe“ bei -1 , so besteht zwischen den Variablen eine negative lineare Abhängigkeit – zeigt eine Variable große Werte, wird die andere kleine Werte annehmen und umgekehrt. Beträgt die Korrelation „ungefähr“ Null, so ist zwischen den betrachteten Variablen keine lineare Abhängigkeit festzustellen. Daraus lässt sich jedoch nicht schließen, dass die Variablen unabhängig sind! Besteht z. B. ein quadratischer oder exponentieller Zusammenhang zwischen zwei Variablen, wird diese Abhängigkeitsstruktur durch den Korrelationskoeffizienten nicht gemessen.

Als Scheinkorrelation bezeichnet man betragsmäßig hohe Korrelation zwischen zwei (beobachteten) Variablen, die tatsächlich aber gar nicht existiert. Verantwortlich dafür ist oft eine Hintergrundvariable, die nicht betrachtet wird. Bekanntes Beispiel dafür ist die Scheinkorrelation zwischen der sinkenden Geburtenrate und der sinkenden Zahl an Störchen in der BRD. Erklärt werden kann die hohe Korrelation zwischen den beiden Variablen mit der zunehmenden Industrialisierung in diesem Jahrhundert.

Autokorrelation

Autokorrelation beschreibt im Unterschied zur Korrelation eine lineare Abhängigkeit von Beobachtungen x_t , die zu aufeinander folgenden Zeitpunkten $t \in \{1, \dots, T\}$ am

selben Objekt gemacht wurden, zu den vorhergehenden Beobachtungen. Das bedeutet, dass in der Beschreibung der Korrelation y durch x_t ersetzt wird und x durch x_{t-r} für ein $r \in \{1, \dots, t-1\}$ ersetzt wird. Nichtlineare zeitliche Zusammenhänge werden damit wiederum nicht erfasst.

Wiederholte Messungen

Als wiederholte Messungen (Repeated Measurements) werden mehrfache Messungen an derselben Beobachtungseinheit bezeichnet. Solche Messungen weisen oft Autokorrelation auf, weshalb sie eine besondere Behandlung bei der Analyse verlangen.

Varianzanalyse (ANOVA)(für Wiederholte Messungen)

Varianzanalysemodelle versuchen, die Unterschiede in den Beobachtungen durch die Stufen eines Faktors (hier: Antibiotikum) zu erklären. Die Varianzanalyse vergleicht die Größe der mittleren quadratischen Abstände zwischen den Faktorstufen mit der Fehlervarianz, welche den quadratischen mittleren Abständen aller Beobachtungen zu den jeweils zugehörigen Stufenmittelwerten entspricht. Wenn dann die mittleren quadratischen Abstände zwischen den Stufenmittelwerten wesentlich größer sind als die Fehlervarianz, wird ein signifikanter Einfluss des Faktors Antibiotikum erkannt.

Der Hauptunterschied zwischen gewöhnlicher Varianzanalyse und der Varianzanalyse für „wiederholte Messungen“ liegt in der Berücksichtigung der möglicherweise vorhandenen Autokorrelation in den Beobachtungen (vgl. z. B. Vonesh und Chinchilli 1997) durch Aufspaltung der Varianzschätzung in einen generellen Anteil und einen Autokorrelationsteil. Nachteil dieser Methode ist die größere Anzahl zu schätzender Parameter, die wiederum eine größere Anzahl Beobachtungen erfordert.

Lineare Regression

Die lineare Regressionsanalyse dient dazu zwischen gegebenen Einflüssen und beobachteten Zielvariablen einen Zusammenhang zu bestimmen, der linear in den Parametern ist. Das bedeutet, dass zwar die Einflussgrößen durch beliebige Funktionen transformiert werden dürfen, aber die Anpassung an die beobachteten Größen durch die Veränderung von Vorfaktoren und nicht durch Parameter innerhalb dieser Transformationen stattfindet. So wird beispielsweise versucht bei nur einer Einflussgröße

und einer Zielgröße eine Gerade so durch die zu bestimmten Werten der Einflussgröße beobachteten Werte zu legen, dass die Summe der quadrierten Abstände minimal wird.

Die eben beschriebene Varianzanalyse ist eine spezielle Form der linearen Regression, in der nur diskrete Einflussvariablen vorkommen. Wenn diskrete und stetige Einflussgrößen gemischt auftreten spricht man auch von Kovarianzanalyse.

Eine typische formale Darstellung ist die folgende:

$$(18) \quad y = b_1 + b_2x + e$$

Dabei bezeichnet y die Zielgröße, x den Einfluss und e einen normalverteilten Störterm. β_1, β_2 sind die Parameter im Modell. Die Bedeutung dieser Parameter können im Fall von normalverteilten Störtermen durch t-Tests überprüft werden.

Um eine Schätzung eines solchen Modells sinnvoll durchführen zu können, müssen mehr Beobachtungen vorliegen als Anzahl Parameter im Modell sind, da sonst keine Möglichkeit zur Varianzschätzung besteht. Diese Varianzschätzung ist aber nötig, damit die Güte des Modells und die Bedeutung der Parameter eingeschätzt werden kann. Auch kommt es sonst möglicherweise zur Überanpassung, so dass das Modell zwar jeden einzelnen beobachteten Datenpunkt erklärt, aber keine Aussage über das Verhalten der beobachteten Population liefert.

Wechselwirkung

Unter einer Wechselwirkung versteht man in der Regression das Phänomen, dass zwei Variablen sich gegenseitig in ihrer Wirkung verstärken, oder schwächen. Dies wird in einem Regressionsmodell durch ein Produkt dieser beiden Variablen abgebildet und die Stärke des Effektes der Wechselwirkung wird wiederum durch den Koeffizienten vor diesem Produkt quantifiziert.

Anpassungsgüte

Die Anpassungsgüte oder auch das Bestimmtheitsmaß R^2 misst die Korrelation der geschätzten Werte der Zielgröße zu den beobachteten Werten. Wenn ein lineares Modell mit nur einer Einflussgröße bestimmt wird, entspricht die Anpassungsgüte der quadrierten Korrelation zwischen Ziel- und Einflussgröße. Das adjustierte R^2 ($R^2_{\text{adj.}}$) korrigiert nach der Anzahl der Einflussgrößen im Modell und hat im Allgemeinen ein

Maximum, während das normale R^2 mit wachsender Anzahl im Modell berücksichtigter Einflussgrößen wächst.

Eine Alternative zum adjustierten R^2 ist das Akaike Informationskriterium. Das AIC beruht im Wesentlichen auf der Idee der Likelihood-Funktion für die zu schätzenden Modellparameter. Unter der Likelihood im Fall des linearen Regressionsmodells versteht man die Mutmaßlichkeit der Schätzung für die Parameter, gegeben die tatsächlich beobachteten Datenpunkte. Durch logarithmische Transformation der Likelihood, Multiplikation mit -1 und Berücksichtigung eines Strafterms für die Anzahl der Einflussgrößen ergibt sich schließlich das generelle AIC², das möglichst klein sein sollte.

Algorithmus zur Modellbestimmung

Vergleicht man die Anzahl der Beobachtungen pro Versuch von 14 mit der Anzahl möglicherweise interessierender Einflüsse und ihrer Zweifach-Wechselwirkungen, wird deutlich, dass in allen drei Gruppen die Anzahl der Datenpunkte geringer ist als die Anzahl Parameter in der Regression. Deshalb ist es notwendig, ein Verfahren einzusetzen, das zunächst eine Selektion der Einflussgrößen vornimmt.

Zum Einsatz kam ein schrittweiser Algorithmus³ der im Softwarepaket R implementiert ist. Im Wesentlichen lässt sich die Funktionsweise des Algorithmus wie folgt beschreiben:

1. Ein Modell der Dimension n wird formuliert und weitere k mögliche Einflussgrößen (einfach oder aus Interaktionen) werden festgelegt.
2. Das AIC für das gegebene Modell wird bestimmt. Dieses Modell wird als Startmodell bezeichnet.
3. Das AIC wird für jedes Modell bestimmt aus dem Startmodell, das entsteht durch a) entfernen einer Einflussgröße oder b) hinzufügen einer Einflussgröße aus den k weiteren.
4. Die Modelle werden in aufsteigender Ordnung gemäß dem jeweiligen AIC geordnet. Das Modell mit dem kleinsten AIC wird als modifiziertes Modell bezeichnet.
5. Ist das AIC des modifizierten Modells *größer* als das AIC des Startmodells, stoppt das Verfahren – das Startmodell wird ausgegeben. Ist das AIC des

² Die genaue Berechnungsformel findet sich in der Online-Dokumentation des Softwarepakets.

³ Es handelt sich dabei um die STEP-Prozedur von Brian D. Ripley. Weitere Informationen sowie der Quellcode der Prozedur finden sich in der Online-Dokumentation des Softwarepakets.

modifizierten Modells *kleiner* als das AIC des Startmodells, wird aus dem modifizierten Modell das Startmodell für die nächste Iteration. Das Verfahren fährt mit dem neuen Startmodell bei Punkt 3 fort.

2.3.4.3.2 FISH (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung)

Spezifische Analyse der Bakterienpopulationen nach Antibiotika Dosierung

Der Einfluss verschiedener Antibiotika hinsichtlich der Zusammensetzung der Bakterienpopulationen in Belebtschlammproben aus Laborkläranlagen wurde mittels der FISH-Technik untersucht. Als Vergleich wurde dabei jeweils auch der Belebtschlamm aus einer entsprechenden Kontrollanlage, die nicht mit Antibiotika behandelt wurde, mit dem identischen Gensondensatz und zu denselben Zeitpunkten untersucht. Sämtliche Laborkläranlagen wurden vom IUK mit Mutterschlamm einer kommunalen Kläranlage beimpft und nach einer 3-wöchigen Vorlaufphase wurde begonnen, das entsprechende Antibiotikum zuzudosieren. Zu diesem Zeitpunkt und vor Dosierung des Antibiotikums wurde die erste Probe (Probe 1) entnommen, stabilisiert und bei – 80°C eingefroren. Diese Behandlung garantiert, dass keine Veränderungen der Populationen mehr auftreten können. Nach einer Woche ständiger Antibiotika-Dosierung wurde die 2. Probe entnommen, stabilisiert und eingefroren. Nach weiteren 3 Wochen und somit insgesamt nach 4-wöchiger Antibiotika Dosierung wurde die 3. Probe entnommen, stabilisiert und der Versuch abgebrochen. Die entsprechenden Stabilisierungs- und Hybridisierungsprotokolle für die bakterielle FISH-Technik wurden entsprechend Manz et al. (1992) durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden mit einer für Belebtschlamm typischen Auswahl an Gruppen-, Gattungs- und Art-spezifischen Gensonden begonnen, die einerseits einen Überblick über die relevanten Bakterienhauptgruppen gewährleisten und andererseits einen detaillierten Eindruck über das Vorkommen häufig auftretender fädiger Bakterien vermitteln (Übersicht über die eingesetzten Gensonden siehe Anlagendatei Vermicon 6.1). Die Sondensequenzen wurden Manz et al. (1992), Wagner et al. (1994), Amann et al. (1995) sowie Hugenholtz et al. (2001) entnommen. Im Verlauf der Studie und nach Auswertung der ersten Ergebnisse wurde der Gensondensatz auf insgesamt 7 Haupt-Gruppensonden beschränkt (in Anlagendatei Vermicon 6.1 grau hinterlegt), die die größte Populationsdichten in den Laborkläranlagen darstellten.

Die Ergebnisse der Haupt-Gruppensonden, deren Vertreter in der Gesamtheit in Belebtschlammproben i.d.R. mehr als 85% aller Bakterien ausmachen, sind in den An-

lagendateien Vermicon 6.1-6.6 mit Fettdruck dargestellt. Alle angeführten Zahlenwerte geben den relativen prozentualen Anteil der jeweiligen Bakterienpopulation im Verhältnis zur Bakterien-Gesamtpopulation an. Die Bakterien-Gesamtpopulation der Probe wird durch den Einsatz einer universellen *Bacteria*-spezifischen Gensonde ermittelt, welche den allgemein gültigen Maßstab für den Anteil an nachweisbaren, lebensfähigen Bakterien in Umweltproben darstellt.

Auswahl der untersuchten Antibiotika

Aus den verschiedenen Stoffklassen der Antibiotika wurden folgende 9 Antibiotika zu den entsprechenden Laborkläranlagen dosiert und deren Einfluss auf die Zusammensetzung der Bakterienzönose untersucht:

Tab. 24: Ausgewählte Antibiotika

Stoffklasse	Ausgewählte Antibiotika
Penicilline	Amoxicillin
Lincosamide	Clindamycin
Cephalosporine	Cefuroxim
Aminoglykosid-Antibiotika	Gentamycin
Makrolid-Antibiotika	Erythromycin
Tetracycline	Tetracyclin, Chlortetracyclin
Glykopeptid-Antibiotika	Vancomycin
Stoffe u.a. gegen parasitäre Erkrankungen	Metronidazol

2.3.5 Kläranlagensimulationstest OECD 303 A : 1981 mit radioaktiv markierten Substanzen

2.3.5.1 BELEBTSCHLAMM- UND VERFAHRENSPARAMETER

Versuchsaufbau

Um mit der von der OECD 303 A empfohlenen Laborkläranlage Abbautests mit ¹⁴C-markierten Substanzen durchführen zu können, mussten zunächst sowohl aus Grün-

den der Bilanzierung als auch aus Arbeitsschutzgründen zahlreiche Modifikationen vorgenommen werden.

Die verwendete Laborkläranlage arbeitete ohne Denitrifikationsstufe und ohne Kontrollanlage. Um mit realitätsnahen Konzentrationen arbeiten zu können, wurden radioaktiv (^{14}C) markierte Testsubstanzen verwendet. Da die richtlinienkonforme Anlage nicht für den Betrieb mit radioaktiven Stoffen vorgesehen ist, ergab sich die Notwendigkeit, die Anlage zu einem weitgehend geschlossenen System umzugestalten. Hierzu waren zahlreiche Modifikationen notwendig, die schließlich eine vollständige Bilanzierung der Testsubstanz und ihrer Metabolite in Belebtschlamm, Ablauf und Abluft sowie eine Differenzierung in Abbau und Mineralisation ermöglichten.



- 1 = Nährmedium
- 2 = Pumpe Zufuhr Nährmedium
- 3 = Pumpe Zufuhr Wasser
- 4 = Belebungsgefäß
- 5 = Absetzgefäß
- 6 = Pumpe Schlammrückführung
- 7 = Ablauf
- 8 = Aktivkohlefilter

Abb. 12: Modifizierte Laborkläranlage

Die Entwicklung dieser modifizierten Laborkläranlage (Abb. 12) erfolgte schrittweise über einen Zeitraum von mehreren Monaten (Junker 2001). Abbildung 13 zeigt eine schematische Darstellung der modifizierten Laborkläranlage.

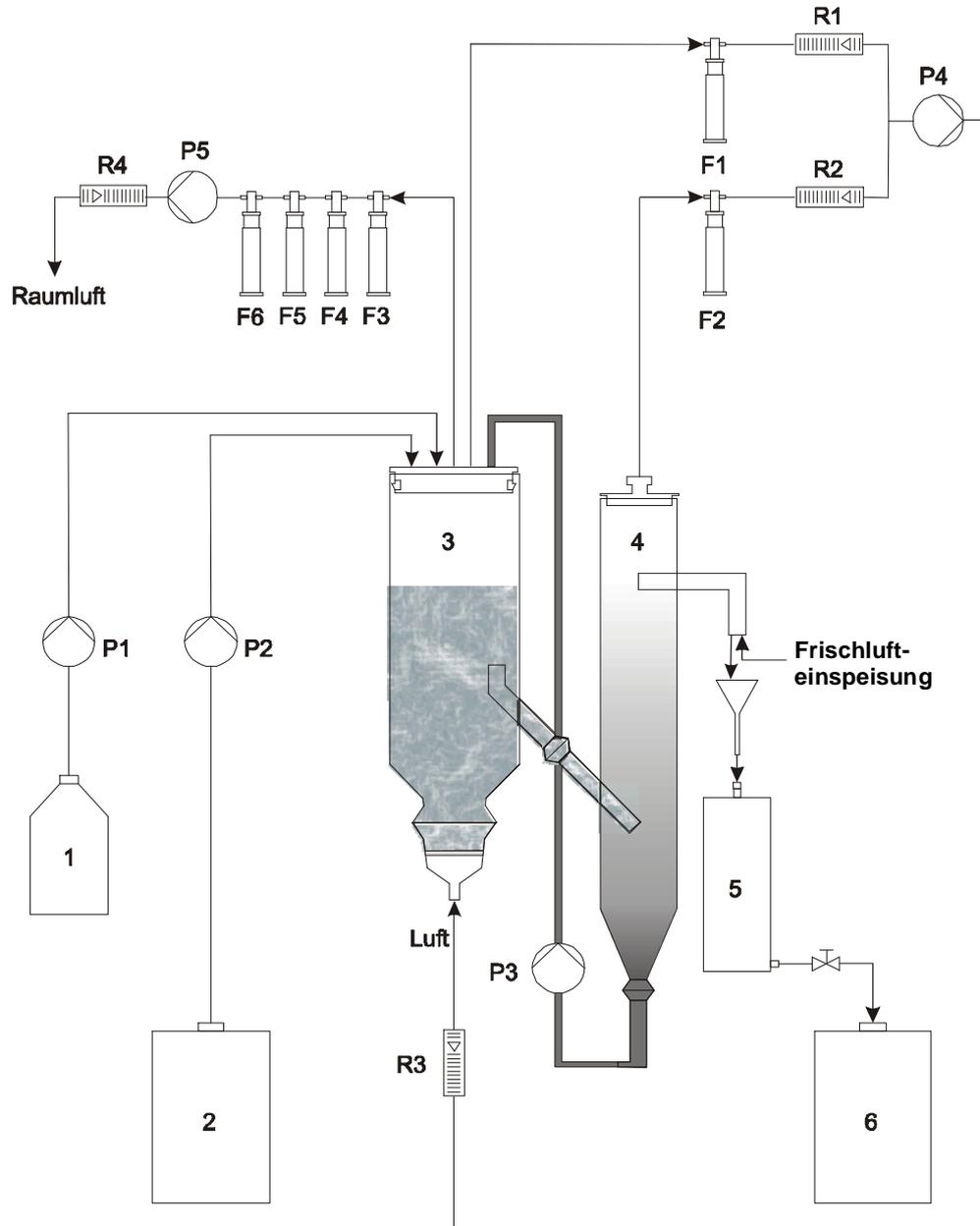


Abb. 13: Schematische Darstellung der modifizierten Laborkläranlage

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 1 = Zulauf Nährmedium | F1 = Kühlfalle Abluft Belebungsgefäß |
| 2 = Zulaufkanister Leitungswasser | F2 = Kühlfalle Abluft Absetzgefäß |
| 3 = Belebungsgefäß | F3 = TEG |
| 4 = Absetzgefäß | F4 = NaOH 1 |
| 5 = Aktivkohlefilter | F5 = NaOH 2 |
| 6 = Ablaufkanister | F6 = NaOH 3 |
| P1 = Nährmediumpumpe | R1 = Rotameter Abluft Belebungsgefäß |
| P2 = Pumpe Leitungswasser | R2 = Rotameter Abluft Absetzgefäß |
| P3 = Pumpe Schlammrückführung | R3 = Rotameter Belüftung |
| P4 = Pumpe Belüftung | R4 = Rotameter Waschflaschen |
| P5 = Pumpe Waschflaschen | |

Um den geschlossenen Betrieb der Anlage zu ermöglichen, wurde ein druckdichter Deckel mit Rührwellendurchführung für das Belebungsgefäß angefertigt. Dem Belebungsgefäß wurde über zwei getrennte Pumpen [P1; P2] synthetisches Abwasser, bestehend aus Nährmedium und Leitungswasser, zugeführt. Die Rückführung des Schlammes aus dem Absetz- in das Belebungsgefäß erfolgte diskontinuierlich mittels einer Schlauchpumpe [P3]. Der Belebtschlamm wurde in Suspension gehalten, indem Luft über eine weitere Pumpe [P4] von unten durch eine Fritte in das Belebungsgefäß geblasen wurde. Da die Abluft der Anlage über Waschflaschen geleitet wurde, diese aber nur bei begrenztem Durchfluss betrieben werden können, wurde ein Teil der Luft im Kreislauf geführt. Eine Membranpumpe [P4] saugte dazu die Luft aus den oberen Gasräumen des Belebungs- und Absetzgefäßes ab. Beide Gefäße waren mit abgedichteten Deckeln verschlossen. Die Luftmengen wurden über Nadelventile geregelt und mit Rotametern [R1; R2] gemessen. Um eine Ansammlung von Kondenswasser in Rotametern und Ventilen zu verhindern, wurden zwei Kühlfallen [F1; F2] vorgeschaltet. Die aus dem Absetzgefäß abgesaugte Luft wurde über den Ablauf durch Frischluft ersetzt und sorgte somit für die Sauerstoffversorgung des Belebtschlammes. Der aus dem Belebungsgefäß abgesaugte Anteil diente zur Erhöhung der zur Suspension benötigten Luftmenge, die durch ein weiteres Rotameter [R3] kontrolliert wurde.

Um bei der Mineralisation der Testsubstanzen entstandenes $^{14}\text{CO}_2$ und andere flüchtige radioaktive Bestandteile aufzufangen, wurde zusätzlich Luft über eine Pumpe [P5] durch die Rührwellendurchführung aus dem oberen Gasraum des Belebungsgefäßes abgesaugt und über Waschflaschen geleitet. Die erste Waschflasche [F3] enthielt Triethylenglykol (TEG) zur Absorption der flüchtigen radioaktiven Stoffanteile, die drei anderen Waschflaschen [F4, F5, F6] enthielten 1,5 n Natronlauge (NaOH) zur Absorption des $^{14}\text{CO}_2$. Die Regelung der Luftmenge erfolgte hier über eine Schlauchklemme und wurde mit einem Massendurchflussgerät [R4] gemessen. Die so von radioaktiven Bestandteilen gereinigte Luft wurde der Raumluft zugeführt. Sämtliche im System verwendeten Schläuche bestanden aus PTFE (Polytetrafluorethylen), da dieses Material nur eine minimale Adsorption der Testsubstanzen zulässt. Lediglich die in den Pumpen verwendeten Schläuche waren aus Gründen der Flexibilität aus anderen Materialien gefertigt.

Um die großen Abwassermengen entsorgen zu können, wurden im Ablauf enthaltene radioaktive Bestandteile über einen Aktivkohlefilter [5] entfernt, der Inhalt des Ablaufkanisters [6] aber zusätzlich vor jeder Entsorgung auf Radioaktivität überprüft.

Inokulum

Bei dem verwendeten Inokulum handelte es sich um Belebtschlamm aus dem Belebungsbecken der Abwasserreinigungsanlage in Niedernhausen. Diese erhält kommunales Abwasser ohne Krankenhausabwässer und ist für 18.500 Einwohnergleichwerte ausgelegt (Informationen des Schwarzbachverbandes Main-Taunus, Hofheim am Taunus). Die Auswahl dieser Abwasserreinigungsanlage erfolgte in Absprache mit dem Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene (IUK) in Freiburg, um eine möglichst große Übereinstimmung mit dem für die dortigen Versuche vom Klärwerk Wyhl entnommenen Belebtschlamm zu gewährleisten.

Synthetisches Abwasser

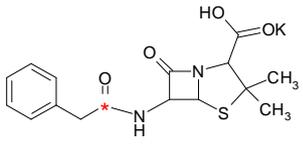
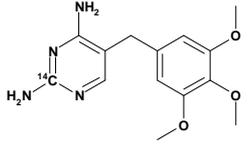
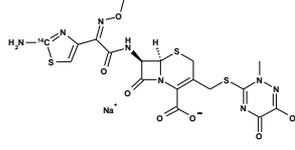
s. Kapitel 3.3.4.1

Testsubstanzen

Die Testsubstanzen wurden aus einer Liste von 243 Substanzen ausgewählt. Einen begrenzenden Faktor stellte dabei die kommerzielle Verfügbarkeit der radioaktiven Substanzen dar. Letztlich konnten Benzylpenicillin, Trimethoprim und Ceftriaxon in radioaktiv markierter Form beschafft werden (Tab. 25).

Die radioaktiven Testsubstanzen wurden in alkoholischen Stammlösungen bevorratet. Aliquots dieser Stammlösungen wurden über eine Mikroliterspritze mit Einwegkanüle durch das Septum im Deckel der Nährmediumflasche nach dem Autoklavieren zudosiert. Die Zudosierung radioaktiver Testsubstanz wurde so gewählt, dass im Zulauf eine Radioaktivität von ca. 500 dpm/ml (8,33 Bq/ml) erreicht wurde. Zusätzlich zu dem ¹⁴C-markierten Substrat wurde eine weitere Stammlösung unmarkierter Testsubstanz zugefügt, deren Menge so gewählt wurde, dass im Zulauf die jeweilige Konzentration erreicht wurde, die einer simulierten Spitzenbelastung in Kläranlagen entspricht (Tab. 25). Um eine gleichmäßige Verteilung der Testsubstanz im Nährmedium zu gewährleisten, wurde das Gemisch auf einem Magnetrührer gerührt.

Tab. 25: Wichtige Eigenschaften der radioaktiv markierten Testsubstanzen und eingesetzte Testsubstanz-Konzentrationen

Testsubstanz	Benzylpenicillin	Trimethoprim	Ceftriaxon
Name:	¹⁴ C-Benzylpenicillin-Kalium	¹⁴ C-Trimethoprim	¹⁴ C-Ceftriaxon
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₄ SK (freie Säure)	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	C ₁₈ H ₁₈ N ₈ O ₇ S ₃
Strukturformel:			
Spez. Radioaktivität:	58 mCi/mmol	39,94 µCi/mg	51,2 µCi/mg
Radiochem. Reinheit:	96,8 %	97,0 %	> 95,0 %
Lösungsmittel:	Ethanol	Ethanol (80 %)	Methanol (90 %)
Konzentration an ¹⁴ C-Testsubstanz im Zulauf	1,45 µg/l	5,60 µg/l	4,40 µg/l
Konzentration an Testsubstanz im Zulauf (=simulierte Spitzenbelastung)	28,00 µg/l	30,00 µg/l	14,00 µg/l

Versuchsablauf

Es erfolgte die Überwachung der Betriebsfähigkeit der Anlage in Anlehnung an Kapitel 3.3.4.1.

Der Verbleib der Prüfsubstanz wurde durch regelmäßige Beprobung und Radioaktivitätsmessung im Zulauf, Ablauf und den Waschflaschen bestimmt.

Bestimmung der Radioaktivität

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte durch eine Flüssigkeits-Szintillationszählung (LSC) mit einem TriCarb TM 2500 TR (Fa. Packard, Dreieich) bei automatischer Lumineszenz- und Quenchkorrektur.

Um eine vollständige Bilanzierung der Radioaktivität zu ermöglichen, wurden Zulauf, Ablauf, Belebtschlamm, Kühlfallen und Waschflaschen beprobt. Die Probenahme erfolgte in regelmäßigen Abständen in 20 ml-Zählfläschchen unter Zugabe eines geeigneten Szintillationscocktails. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

¹⁴C-Bilanzierung und Wiederfindungsrate

Nach Testende wurde der gesamte Inhalt der Laborkläranlage in einen Behälter gepumpt und gerührt. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden hiervon Proben entnommen und per LSC gemessen. Anschließend wurde die Anlage mehrmals mit

Wasser befüllt und das Vorgehen wiederholt, wodurch die gesamte noch in der Anlage befindliche Radioaktivität bestimmt werden konnte.

Die ^{14}C -Bilanzierung wurde getrennt nach Zulauf, Belebtschlamm, Ablauf, Kühlfallen und Waschflaschen durchgeführt. Somit konnte ermittelt werden, welche Aktivität der Anlage über den Zulauf zudosiert wurde, wie viel Radioaktivität am Ende noch in der Anlage vorhanden war und welche Menge an Radioaktivität die Anlage über entnommene Proben, über den Ablauf und als $^{14}\text{CO}_2$ über die Abluft verlassen hat.

Die Wiederfindungsrate ergibt sich aus dem Quotient der im gesamten Versuchsverlauf über den Zulauf zudosierten Radioaktivität und der Summe der in allen Proben (Belebtschlamm, Ablauf, Waschflaschen, Kühlfallen) gemessenen Radioaktivität (s. Gleichung 19).

$$(19) \quad \text{Wiederfindungsrate [\%]} = \frac{\text{gemessene Aktivität}}{\text{zudosierte Aktivität}} \cdot 100$$

Die Bestimmung der Verfahrensparameter (z. B. Sauerstoff, pH-Wert, DOC, SVI, Trockensubstanz usw.) erfolgte in Anlehnung an die Untersuchungen in Kapitel 3.3.4.1.

2.3.5.2 STOFFSPEZIFISCHE ANALYTIK: PRIMÄRELIMINATION

Neben den beschriebenen Probenahmen wurden zusätzlich weitere Proben (Nährmedium, Belebtschlamm, Ablauf) für die stoffspezifische Analytik am IUK Freiburg entnommen, um den Anteil der Testsubstanz und deren Metabolite an der Gesamtradioaktivität zu bestimmen. Die Proben wurden bis zu ihrer Messung bei -21°C gelagert.

Aus Kapazitätsgründen konnten jedoch nur die Proben des Versuchs mit ^{14}C -Trimethoprim analysiert werden.

2.3.6 Licht- und Temperaturempfindlichkeit

Mikroorganismen spielen eine zentrale Rolle bei vielen Abbauprozessen in der Natur. Der Abbau von Substanzen lässt sich aber nicht ausschließlich auf biologische Aktivitäten zurückführen. Viele Substanzen neigen auch aufgrund ihrer chemischen Struktur zur Hydrolyse oder zu einem Zerfall unter Licht- oder Wärmeeinwirkung. Besonders bei einigen Abbautests kann dies einen höheren biologischen Primärabbaugrad vortäuschen. Um diesen Grad des Abbaus abzuschätzen, wurde die Licht- und

Temperaturempfindlichkeit der Wirkstoffe untersucht, für die eine analytische Messmethode am IUK vorlag.

Es wurde eine sterilfiltrierte Antibiotikallösung definierter Konzentration hergestellt (s. Tab. 26) und anschließend an Orten unterschiedlicher Temperatur- und Lichtverhältnissen ausgesetzt. Nach festgelegten Zeiträumen wurde deren Konzentration mittels HPLC bestimmt.

Herstellung des Ansatzes

Es wurden im gesamten Test Chemikalien der Reinheitsstufe „zur Analyse“ bzw. bidestilliertes Wasser verwendet.

Das Antibiotikum wurde in einen Messkolben eingewogen, in Wasser gelöst und anschließend bis zur Marke aufgefüllt. Von der Lösung wurde mit Hilfe einer Einwegspritze 10 ml entnommen und über einen Sterilfilter direkt in ein 15 ml Proberöhrchen filtriert.

Im Verlauf des Tests wurden jeweils drei Teströhrchen an drei unterschiedlichen Orten aufbewahrt:

- bei Temperatur 20°C (Raumtemperatur), bei Tageslicht,
- im Wärmeschrank bei 20°C, in der Dunkelheit,
- im Kühlschrank bei 4°C, in der Dunkelheit.

Tab. 26: Einwaage der hinsichtlich Licht- und Temperaturstabilität untersuchten Wirkstoffe

Antibiotikum	Konzentration [mg/l]
Amoxicillin	3,30
Benzylpenicillin	3,00
Ceftriaxon	3,50
Cefuroxim	4,80
Chlortetracyclin	3,70
Metronidazol	6,00
Sulfamethoxazol	3,80
Tetracyclin	3,10
Trimethoprim	2,00
Vancomycin	3,60

Direkt nach der Herstellung des Ansatzes sowie nach 1, 7, 14, 21 und 28 d wurden drei Teströhrchen entnommen und bei -80°C tiefgefroren. Nach Ablauf des Testes wurden die Konzentrationen mittels HPLC bestimmt (s. Kapitel 3.3.1).

Bestimmung der Elimination

Als Ergebnis wurden die Konzentrationen graphisch über den Zeitverlauf dargestellt und der prozentuale Abbau des Antibiotikums angegeben.

Unter der Annahme, dass der Zerfall nach einer Reaktionskinetik 1. Ordnung bzw. für die Hydrolyse einer Kinetik pseudo-1. Ordnung erfolgt, wurden aus den Abbaukurven soweit möglich die Halbwertszeiten berechnet (s. Gleichung 20).

$$(20) \quad c(t) \text{ [mg/l]} = c_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

$c(t)$ Konzentration zum Zeitpunkt t in mg/l,

c_0 Konzentration zum Zeitpunkt $t=0$ in mg/l,

k Geschwindigkeitskonstante in 1/d,

t Zeit in d.

Die Halbwertszeit lässt sich mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten bestimmen. Es ergibt sich aus der Gleichung 20 mit $t=t_{1/2}$ und $c_{t_{1/2}}=c_0/2$:

$$(21) \quad t_{1/2} \text{ [d]} = \frac{\ln 2}{k}$$

$t_{1/2}$ Halbwertszeit in d.

Aus der Arrhenius Gleichung 22 lässt sich ableiten, dass der Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten umgekehrt proportional zur absoluten Temperatur ist. Damit lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten bzw. Halbwertszeiten von Zerfallsreaktionen bei beliebigen Temperaturen berechnen (z. B. des Antibiotikums bei $14-15^{\circ}\text{C}$ - durchschnittliche Temperatur in Kläranlagen).

$$(22) \quad k \text{ [1/d]} = k_0 \cdot e^{-\frac{E_A}{R \cdot T}} \quad \text{oder} \quad \ln k \text{ [1/d]} = \ln k_0 - \frac{E_A}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

k_0 präexponentieller Faktor in 1/d,

E_A Aktivierungsenergie in J/mol,

R molare Gaskonstante: 8,314 J/mol*K,
T absolute Temperatur in K.

2.3.7 Adsorption

Bei Substanzen, die zur Adsorption neigen, kann es bei der Prüfung der biologischen Abbaubarkeit zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse durch Adsorption, z. B. an Gefäßwänden oder Biomasse, kommen. Gerade bei Systemen mit hoher Schlammichte wie Modellkläranlagen kann die Adsorption der Testsubstanz an Belebtschlamm einen biologischen Abbau vortäuschen. Diese Adsorption kann physikalische, chemische oder auch physiologische Ursachen haben und zur Akkumulation von Antibiotika im Belebtschlamm führen. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden mehrere Versuchsansätze mit Ofloxacin gewählt, die eine Prüfung der Adsorption an Belebtschlamm ermöglichten.

Testdurchführung

Es wurden drei Versuchsansätze erstellt:

1. Ansatz mit Nährlösung, Quecksilberchlorid und Antibiotikum (physikalisch-chemische Kontrolle),
2. Ansatz mit Belebtschlamm, Nährlösung, Quecksilberchlorid und Antibiotikum (Sorption),
3. Ansatz mit Belebtschlamm, Nährlösung und Antibiotikum (biot. Elimination).

Um zwischen abiotischer Elimination und biologischem Abbau unterscheiden zu können, wurden der 1. und 2. Versuchsansatz mit Quecksilberchlorid, welches die Stoffwechselforgänge bei Mikroorganismen hemmt, vergiftet. Der 1. Versuchsansatz diente als Blindprobe zur Messung der Primärelimination, die ohne Zusatz von Belebtschlamm stattfindet (Elimination durch Hydrolyse, Licht etc.). Der zweite und dritte Versuchsansatz erfasste die Adsorption an den Belebtschlamm und die biotische Elimination.

Pro Versuchsansatz gab es zwei verschiedene Ansätze mit den Antibiotikakonzentrationen von 1 mg/l und 10 mg/l. Als Behälter dienten 1 l Enghalskolben. Der Belebtschlamm wurde direkt am Versuchstag aus der Kläranlage Wyhl (Abwasserzweckverband Nördlicher Kaiserstuhl) entnommen und bis zur Verwendung belüftet. Nach Angaben der Kläranlagenbetreiber wies der Schlamm zu diesem Zeitpunkt einen Trockensubstanzgehalt von 8 g/l auf. Ein Aliquot von 312,5 ml Belebtschlamm

zur Einstellung eines Trockensubstanzgehaltes von 2,5 g/l wurde jedem Ansatz der Versuchsansätze 2 und 3 hinzugefügt. Zu Versuchsansatz 1 und 2 wurden 5 ml Quecksilberchlorid gegeben (Stammlösung 1 g / 100 ml). Zu jedem Ansatz wurden 100 ml zehnfach konzentrierte Nährlösung entsprechend des Kläranlagensimulationstestes nach OECD 303A zugegeben. Anschließend wurde mit VE-Wasser auf 1 l aufgefüllt. Die Ofloxacin-Stammlösung wurde am Ende zugegeben. Die Behälter wurden mit medizinischer Druckluft belüftet. Kurz vor der Messung wurde das entsprechende Volumen der Ofloxacin-Stammlösung (Konzentration 100 µg/l) zugegeben.

Bestimmung der Elimination

Die Messung der Konzentration erfolgte direkt nach dem Ansetzen sowie 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 5 h und 24 h nach Zugabe des Antibiotikums. Dazu wurden jeweils 10 ml aus dem Ansatz entnommen, 15 min zentrifugiert, der Überstand durch einen Cellulose-Nitrat-Filter filtriert, in ein 1,5 ml-Analysefläschchen überführt und bei 4°C aufbewahrt. Die Proben wurden mittels HPLC vermessen (s. Kapitel 3.3.1).

2.4 WIRKUNG VON ANTIBIOTIKA AUF BAKTERIEN

2.4.1 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) im CBT

Parallel zur Messung der Sauerstoffzehrung im CBT wurden von jedem Ansatz die KBE bestimmt. Damit können Aussagen über mögliche Auswirkungen der Testsubstanzen auf Bakterien sowohl im Testsystem als auch in der Umwelt getroffen werden.

Die Anzucht der KBE erfolgt auf einem für Abwasserbakterien besonders geeigneten Nährmedium (Kappesser 1990), welches unter anderem Spurenelemente und Pyruvat, das im Bakterienstoffwechsel eine zentrale Rolle einnimmt, enthält (Tab. 27 und 28).

Tab. 27: Zusammensetzung der Spurenelementlösung

Substanz	Konzentration [mg/l]
EDTA Ethylendiamintetraacetat, Natriumsalz	500
Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat	200
Zinksulfat-Heptahydrat	100
Borsäure	30
Cobalt(II)chlorid-Hexahydrat	30
Natriummolybdat-Dihydrat	20
Mangan(II)chlorid-Dihydrat	10
Kupferchlorid-Dihydrat	2
Nickelchlorid-Dihydrat	2

Es wurden jeweils 10 ml der Lösung in Polycarbonatröhrchen eingefüllt und bei -24°C bis zum Gebrauch gelagert.

Tab. 28: Nährmedium nach Kappesser (1990)

Substanz	Konzentration [g/l]
D(+)-Glucose wasserfrei	0,5
Pyruvat (Brenztraubensäure, Natriumsalz)	0,5
Pepton aus Casein	0,5
Hefeextrakt	0,5
Dikaliumhydrogenphosphat	0,5
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,1
Agar Agar	12,0
Spurenelementlösung	10 ml

ad 1l aqua dest., pH 7,0.

Anschließend wurde das Nährmedium für 15 min bei 121°C autoklaviert. Die flüssige Nährlösung wurde unter sterilen Bedingungen in Petrischalen überführt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Zur KBE-Bestimmung wurden aus den verschiedenen Ansätzen des CBT jeweils dekadische Verdünnungsreihen in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt. Dabei wurde eine Koloniezahl von etwa 20 bis 300 KBE pro Platte angestrebt, um den Fehler bei der Auszählung möglichst klein zu halten.

Die Agarplatten wurden mit je 100 µl aus diesen Verdünnungsstufen im Spatelverfahren beimpft und bei 30°C für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Auszählung der Kolonien.

2.4.2 *Pseudomonas putida* Wachstumshemmtest (EN ISO 10712 : 1995) und Modifikation für *Enterococcus faecalis*

Grundlage des Verfahrens ist die Bestimmung der Wachstumshemmung von *Pseudomonas putida* bzw. *Enterococcus faecalis* unter dem Einfluss unterschiedlicher Verdünnungen der Testsubstanz mittels Trübungsmessung.

Herstellen der Nährlösungen

Es wurden im gesamten Test Chemikalien der Reinheitsstufe „zur Analyse“ bzw. vollentsalztes Wasser (VE) verwendet.

Tab. 29: Nährlösungen für den Wachstumshemmtest mit *Pseudomonas putida*

Bezeichnung der Lösung	Substanz	Konzentration [g/l]
I	Natriumnitrat	20,00
	Dikaliumhydrogenphosphat	4,80
	Kaliumdihydrogenphosphat	2,40
	Hefeextrakt	2,00
II	Natriumnitrat	20,00
	Dikaliumhydrogenphosphat	4,80
	Kaliumdihydrogenphosphat	2,40
III	D(+)-Glucose, wasserfrei	72,72
IV	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	4,00
	Eisen(III)citrat	0,01

Die Nährlösung wurde bei 121°C 15 min autoklaviert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Tab. 30: Nährlösung (Medium 53)¹ für den Wachstumshemmtest mit *Enterococcus faecalis*

Substanz	Konzentration [g/l]
Trypton/Pepton aus Casein	10,00
Hefeextrakt	5,00
Natriumchlorid	5,00
Glucose	5,00

Bei dem Nährmedium 53 wurde ein pH-Wert von 7,2-7,4 eingestellt. Es wurde bei 121°C 15 min autoklaviert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Herstellen der Stammkultur

Für den Wachstumshemmtest mit *Pseudomonas putida* wurden 18 g Agar (hoher Reinheitsgrad) in H₂O unter Erhitzen gelöst. Dazu wurden 50 ml der Lösung I, 125 ml der Lösung III und 100 ml der Lösung IV zugeben und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die flüssige Nährlösung wurde unter sterilen Bedingungen in Petrischalen abgefüllt und bei 2-4°C gelagert. Der Keim *Pseudomonas putida* wurde zunächst auf Blutagar überimpft, 24 h bebrütet und dann auf das Nährmedium überimpft und bei 25 ± 4°C gelagert. Wöchentlich wurde eine neue Stammkultur angelegt.

Für den Wachstumshemmtest mit *Enterococcus faecalis* wurde 18 g Agar (hoher Reinheitsgrad) in 1 l des Mediums 53 unter Erhitzen gelöst. Diese flüssige Nährlösung wurde unter sterilen Bedingungen in Petrischalen überführt und bei 4°C gelagert. Der Keim *Enterococcus faecalis* wurde zunächst auf Blutagar überimpft, 24 h bebrütet und dann auf das Nährmedium überimpft und bei 37 ± 4°C gelagert. Mindestens dreimal pro Woche wurde eine neue Stammkultur angelegt.

Ansatz der Vorkulturen

Für den Wachstumshemmtest mit *Pseudomonas putida* wurde in ein steriles Gefäß 180 ml sterilisiertes Wasser überführt und dazu 5 ml der Lösung I und III sowie 10 ml

¹ nach DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) für *Enterococcus faecalis* empfohlenes Medium

der Lösung IV hinzugefügt (pH ca. $7,2 \pm 0,2$). Von diesem Medium wurde unter sterilen Bedingungen 90 ml in eine 250 ml Kulturflasche gefüllt.

Für *Enterococcus faecalis* wurden 90 ml von dem Medium 53 unter sterilen Bedingungen in eine 250 ml Kulturflasche abgefüllt.

Eine höchstens 7 Tage (*Ps. putida*) bzw. 2 Tage (*E. faecalis*) alte Stammkultur wurde vom Nähragar im Nährmedium suspendiert und so verdünnt, dass sich rechnerisch eine Trübung von 100 FNU (Formazine Nephelometric Units) ergab. 10 ml dieses Inokulums wurde in die Kulturflasche mit den 90 ml Vorkulturnährmedium gegeben (Trübung der Vorkultur: 10 FNU). Dieses wurde mit luftdurchlässigem Stopfen verschlossen. Der Vorkulturansatz wurde etwa $5 \pm 0,5$ h bei $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (*Ps. putida*) bzw. etwa $3 \pm 0,5$ h bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (*E. faecalis*) unter Schütteln inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubation wurde die Bakteriensuspension so verdünnt, dass sich rechnerisch eine definierte Trübung ergab (z. B. 50 FNU). Diese Kulturen wurden zusätzlich unter dem Mikroskop beobachtet, da die Bakterien *Ps. putida* nicht in Kettenform vorliegen dürfen und bei *E. faecalis* die Morphologie der Bakterien verfolgt wurde.

Ansatz der Testkulturen

Die Antibiotika-Stammlösung wurde mit vollentsalztem Wasser im Testansatz verdünnt. Das Endvolumen der Testlösung betrug 16 ml, die Verdünnung betrug jeweils 1:1.

Als Referenzstammlösung wurden 25 mg/l (*Ps. putida*) bzw. 35 mg/l (*E. faecalis*) 3,5-Dichlorphenol verwendet. Unter Berücksichtigung der Ausgangskonzentration, der 1:10-Verdünnung und der Verdünnung beim Ansetzen des Tests, ergibt sich im Referenzansatz eine Konzentration von 20 mg/l bzw. 28 mg/l.

Es wurden 6 Ansätze sowie ein Kontrollansatz (ohne Testgut) und ein Referenzansatz (mit 3,5-Dichlorphenol) in 50-ml-Kulturflaschen folgendermaßen angesetzt.

Tab. 31: Testansätze im Wachstumshemmtest mit *Pseudomonas putida*

Verdünnung [µg/l]	H ₂ O [ml]	Stammlsg. [ml]	Nährlsg. II [ml]	Nährlsg. III [ml]	Nährlsg. IV [ml]	Inokulum [ml]	Endvol umen [ml]
Kontrolle	16	0	0,5	0,5	1	2	20
5	15,5	0,5	0,5	0,5	1	2	20
10	15	1	0,5	0,5	1	2	20
20	14	2	0,5	0,5	1	2	20
40	12	4	0,5	0,5	1	2	20
80	8	8	0,5	0,5	1	2	20
160	0	16	0,5	0,5	1	2	20
Referenz 20 mg/l	0	16	0,5	0,5	1	2	20

Die Gefäße wurden mit luftdurchlässigen sterilen Stopfen verschlossen und bei $23 \pm 1^\circ\text{C}$ im Dunkeln in einem Schüttelbad 16 ± 1 h inkubiert.

Tab. 32: Testansätze im Wachstumshemmtests mit *Enterococcus faecalis*

Verdünnung [µg/l]	H ₂ O [ml]	Stammlsg. [ml]	Medium 53 [ml]	Inokulum [ml]	Endvol. [ml]
Kontrolle	16	0	2	2	20
5	15,5	0,5	2	2	20
10	15	1	2	2	20
20	14	2	2	2	20
40	12	4	2	2	20
80	8	8	2	2	20
160	0	16	2	2	20
Referenz 28 mg/l	0	16	2	2	20

Die Gefäße wurden mit luftdurchlässigen sterilen Stopfen verschlossen und bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ im Dunkeln in einem Schüttelbad 6 ± 1 h inkubiert.

Messprinzip

Sofort nach Beendigung der Inkubation wurde die Trübung der Ansätze bei $\lambda = 436$ nm gemessen (s. Bestimmung der Trübung).

Gültigkeit

Der Test kann als valide betrachtet werden, wenn

- sich das Inokulum im Kontrollansatz (5 FNU) innerhalb der Testzeit mindestens um den Faktor 60 (*Ps. putida*) bzw. Faktor 30 (*E. faecalis*) vervielfacht hat (s. Kapitel 5.3.2.1 Methodenentwicklung),
- die EC_{50} der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol im Bereich von 10 mg/l und 30 mg/l liegt.

Auswertung

Die prozentuale Hemmung der Zellvermehrung (I) wurde für jede getestete Konzentration an Testgut wie folgt berechnet:

$$(23) \quad I \text{ [\%]} = \frac{B_c - B_n}{B_c - B_0} \cdot 100$$

wobei,

I Zellvermehrungshemmung in Prozent,

B_n gemessene Trübung der Biomasse nach Ablauf der Testzeit für die n-te Verdünnung des Testguts (z. B. 1:2),

B_c gemessene Trübung der Biomasse nach Ablauf der Testzeit im Kontrollansatz,

B_0 gemessener Anfangswert der Trübung der Biomasse zum Zeitpunkt t_0 im Kontrollansatz.

Bei der Einschätzung der Wirkschwellen der Antibiotika gegenüber *Pseudomonas putida* und *Enterococcus faecalis* wurde nur in wenigen Fällen im ersten Ansatz eine für die Probit-Auswertung verwendbare Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht. Die Wachstumshemmtests wurden daher mit einem Antibiotikum mehrmals in unterschiedlichen, sich jedoch überlappenden Konzentrationsbereichen durchgeführt, um eine für die Probit-Auswertung geeignete Wachstumshemmkurve zu erhalten.

Bestimmung der Trübung (EN 27027 : 1994)

Die Grundlage des Verfahrens besteht darin, dass eine Probe, die ungelöste Substanzen enthält, die einfallende Strahlung schwächt, indem sie in alle Richtungen gestreut wird.

Behandlung des Wassers

Es wurden im gesamten Test Chemikalien der Reinheitsstufe „zur Analyse“ bzw. vollentsalztes Wasser (VE) verwendet.

Membranfilter der Porenweite 0,1 µm (für bakteriologische Untersuchung) wurden für 1 h in 100 ml destilliertes Wasser gelegt. 250 ml destilliertes Wasser wurden durch diesen Filter filtriert und das Wasser verworfen. Dann wurde 500 ml destilliertes Wasser zweimal durch denselben Filter filtriert und das Verfahren wiederholt. So behandeltes Wasser wurde für die Herstellung der Standardlösung und Bezugslösungen aufbewahrt.

Herstellen der Formazin-Lösung

Es wurden 5 ml der Lösung A mit 5 ml der Lösung B zusammengemischt (Tab. 33) und bei $23 \pm 3^\circ\text{C}$ im Dunkeln 24 h stehen gelassen, danach wurde mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Tab. 33: Lösungen für die Herstellung der Formazin-Lösung

Bezeichnung der Lösung	Substanz	Konzentration [g/100 ml]
A	Hexamethylentetramin	10,00
B	Hydrazinsulfat	1,00

Die Trübung dieser Stammlösung in Formazin-Nephelometrieinheiten (FNU = Formazine Nephelometric Units) beträgt 400. Diese Lösung ist bei einer Aufbewahrung im Dunkeln bei einer Temperatur von $25 \pm 3^\circ\text{C}$ etwa vier Wochen haltbar. Aus der Formazin-Lösung wurde dann ein Volumen V [ml] für die Herstellung der Formazin-Bezugslösungen für die Kalibrierung entnommen (s. Gleichung 24).

$$(24) \quad V \text{ [ml]} = \frac{100 \text{ ml} \cdot x \text{ FNU}}{400 \text{ FNU}}$$

Die optische Dichte der Bakteriensuspension wurde bei $\lambda = 436$ nm in Formazin-nephelometrischen Einheiten gemessen. Zur Kalibrierung der FNU dürfen nur optische Dichten $<0,4$ verwendet werden; bei optischen Dichten $>0,4$ sollte die Bakteriensuspension auf Werte zwischen 0,1 und 0,4 verdünnt werden.

Diese Bezugslösungen sind nur eine Woche haltbar.

2.4.3 Respirationshemmtest (OECD 209 : 1984)

Mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens kann die potentielle Toxizität der Testsubstanz gegenüber Mikroorganismen der Abwassereinigung abgeschätzt werden. Mit dieser Methode können Substanzen ermittelt werden, die einen negativen Einfluss auf die biologische Reinigungsstufe der Kläranlagen erwarten lassen. Im Gegensatz zum Wachstumshemmtest wird eine Mischpopulation untersucht. Konzentrationen, bei denen noch keine Hemmwirkung besteht, lassen sich bestimmen.

Die Respirationsrate eines Belebtschlammes (unter Zugabe eines Nährmediums) wird nach halbstündiger oder dreistündiger Inkubationszeit gemessen und mit den jeweiligen Respirationsraten der Schlämme verglichen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert wurden.

Herstellen der Nährlösung und der Referenzstammlösung

Es wurden im gesamten Test Chemikalien der Reinheitsstufe „zur Analyse“ verwendet. Als Wasser kam VE-Wasser (vollentsalztes Wasser) zum Einsatz.

Tab. 34: Herstellung der Nährlösung

Substanz	Konzentration [g/l]
Trypton/Pepton aus Casein	16,00
Fleischextrakt	11,00
Harnstoff	3,00
Natriumchlorid	0,70
Calciumchloriddihydrat	0,40
Magnesiumsulfatheptahydrat	0,20
Dikaliumhydrogenphosphat	2,80

Die Nährlösung wurde 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Für die Herstellung der Referenzstammlösung wurden 0,5 g 3,5-Dichlorphenol in 10 ml 1 n Natronlauge gelöst, und mit destilliertem Wasser zu ungefähr 30 ml verdünnt. Unter Rühren wurde 1 n Schwefelsäure zugegeben, bis sich ein Niederschlag zu bilden beginnt (ca. 8 ml). Die Lösung wurde mit Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Alle Lösungen wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt.

Behandlung des Belebtschlamm

Das Inokulum für den Test wurde der kommunalen Kläranlage in Wyhl entnommen, an die kein Krankenhaus und kein Altenheim angeschlossen ist, da die Antibiotikabelastung so gering wie möglich sein sollte. Der Trockensubstanzgehalt des Schlamm wurde nach DIN 38414 S2 (1985) bestimmt.

Bei Einsatz eines Belebtschlamm aus einer realen Anlage muss mit Stoffen gerechnet werden, die evtl. eine hemmende Wirkung haben. Der Schlamm wurde deshalb folgendermaßen gewaschen:

Der Überstand des Schlamm wurde zunächst abdekantiert. Der Schlamm wurde dann 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde der Schlamm in Leitungswasser resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Danach wurde der Schlamm mit Leitungswasser so suspendiert, dass der Trockensubstanzgehalt bei etwa $4 \text{ g/l} \pm 10\%$ lag. Im Testmedium lag der Trockensubstanzgehalt dann bei $1,6 \text{ g/l}$. Der Test wurde bei $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Wenn der Schlamm nicht innerhalb eines Tages eingesetzt werden konnte, mussten pro Liter (Belebtschlamm) und Tag 50 ml synthetisches Abwasser zugegeben werden. Über Nacht wurde der Schlamm bei $20 \pm 2^\circ\text{C}$ belüftet. Vor dem Einsatz wurde der pH-Wert überprüft, er sollte zwischen 6 und 8 liegen und musste ggf. durch die Zugabe von Natriumhydrogencarbonatlösung abgepuffert werden. Der Belebtschlamm durfte maximal 4 Tage gelagert werden.

Ansatz und Inkubation

Angesetzt wurden 5 bzw. 6 Testansätze (T_{1-5}) in unterschiedlichen Konzentrationen sowie zwei Blindansätze ($T_{\text{blind}1+2}$), 3 Referenzansätze (T_{R1-3}) und ein Ansatz zur Bestimmung des chemisch-physikalischen Sauerstoffverbrauchs (T_{PC}) (Abb. 14).



Abb. 14: Aufbau des Respirationshemmtests

Synthetisches Nährmedium, Wasser und ggf. Antibiotikumlösung wurden in einem 1000-ml-Erlenmeyerkolben vereinigt. Der Reihe nach (z.B im 15-Minuten-Abstand) wurde der Belebtschlamm zugegeben und die Ansätze mit medizinischer Druckluft belüftet. Zu Beginn und am Schluss wurde jeweils ein Blindansatz angesetzt.

Eine halbe Stunde bzw. drei Stunden nach Herstellung des ersten Ansatzes wurde mit der Sauerstoffmessung begonnen. Der erste Ansatz wurde in eine Enghals-Standflasche überführt und der Sauerstoffverbrauch über einen Zeitraum von bis zu 10 Minuten unter Rühren (Magnetrührer) gemessen. Diese Vorgehensweise wurde bei allen Testansätzen durchgeführt.

Auswertung

Die Sauerstoffverbrauchsrate R wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$(25) \quad R \text{ [mg/(l·h)]} = \frac{\rho_1 - \rho_2}{\Delta t} \times 60$$

wobei,

ρ_1 erste Messung der Konzentration an gelöstem Sauerstoffs, in mg/l - auf dem linearen Teil der Kurve,

p_2	letzte Messung der Konzentration an gelöstem Sauerstoffs, in mg/l – auf dem linearen Teil der Kurve,
Δt	Zeitintervall zwischen den beiden Messungen in min.

Die prozentuale Hemmung des Sauerstoffverbrauchs I bei jeder Konzentration wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$(26) \quad I \text{ [%]} = 1 - \frac{2R_s}{RK_1 + RK_2} \times 100$$

wobei,

R_s	Sauerstoffverbrauchsrate im Testansatz T_x (T_{1-5}),
RK_1	Sauerstoffverbrauchsrate im Kontrollansatz 1 (T_{blind1}),
RK_2	Sauerstoffverbrauchsrate im Kontrollansatz 2 (T_{blind2}).

Die prozentuale Hemmung des Sauerstoffverbrauchs wird gegen den Logarithmus der Testgutkonzentration aufgetragen (Hemmkurve). Aus der Hemmkurve wurden die EC_{50} ermittelt.

Gültigkeit

Der Test ist valide, wenn:

- die Respirationsraten in den beiden Kontrollansätzen nicht mehr als 15% voneinander abweichen,
- die Empfindlichkeit (EC_{50}) des Belebtschlammes für 3,5-Dichlorphenol zwischen 5 mg/l und 30 mg/l liegt.

Ansonsten ist die Untersuchung nicht valide und mit einem Belebtschlamm anderer Herkunft zu wiederholen.

2.4.3.1 VERLÄNGERTER RESPIRATIONSHEMMTEST

Zur Ermittlung der verzögert eintretenden Hemmung wurde der Test auf 20 bzw. 24 h verlängert. Der Test wurde zunächst wie bereits beschrieben durchgeführt. Nach einer halben Stunde Inkubationszeit wurde die Sauerstoffzehrung gemessen. Der Inhalt der Messflasche wurde nach der Sauerstoffmessung dann jedoch in den Erlenmeyerkolben zurückgegeben und der Ansatz weiter belüftet. Nach 3 h wurde die Sauerstoffzehrung erneut gemessen. Der Belebtschlamm wurde nach der Messung wieder in den Erlenmeyerkolben zurückgegeben und belüftet. Es wurden zu jedem

Kolben 5 ml Nährmedium zugegeben, alle Ansätze wurden nach insgesamt 20 h bzw. 24 h erneut gemessen. Aus praktischen Gründen wurde die Messung der Sauerstoffsverbrauchsrate im Verlauf der Untersuchungen anstatt nach 24 h bereits nach 20 h vorgenommen.

2.4.4 Nitrifikationshemmtest (DIN EN ISO 9509 : 1995)

Grundlage des Verfahrens ist die Bestimmung der kurzzeitigen Hemmwirkung eines in verschiedenen Konzentrationen eingesetzten Testguts auf nitrifizierende Bakterien in Belebtschlamm.

Herstellen der Stamm- und Nährlösungen und des Referenzinhibitors

Es wurden im gesamten Test Chemikalien der Reinheitsstufe „zur Analyse“ verwendet, als Wasser kam VE-Wasser (vollentsalztes Wasser) zum Einsatz.

Tab. 35: Zusammensetzung der Nährlösung

Substanz	Konzentration [g/l]
Natriumhydrogencarbonat	5,04
Ammoniumsulfat	2,65

Tab. 36: Konzentration des Referenzinhibitors

Substanz	Konzentration [g/l]
Allylthioharnstoff	1,16

Alle Lösungen wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt.

Vorbereitung des Belebtschlammes

Das Inokulum für den Nitrifikationshemmtest wurde einer kommunalen Kläranlage entnommen (Kläranlage in Forchheim, Abwasserzweckverband Breisgauer Bucht), da die Nitrifikationsrate des Belebtschlammes aus der Kläranlage Wyhl zu niedrig war. Das Inokulum wurde innerhalb von 24 Stunden eingesetzt.

Um zu verhindern, dass hemmende Substanzen die Versuchsergebnisse beeinträchtigen, wurde der Schlamm gewaschen. Zu diesem Zweck wurde das Inokulum 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rückstand wurde im

gleichen Volumen VE-Wasser gewaschen und mit dem zehnfachen Volumen an Nährmedium verdünnt und erneut zentrifugiert. Aus einer Teilprobe des Schlammes wurde der Trockensubstanzgehalt nach DIN 38414 S2 (1985) bestimmt und der zentrifugierte Schlamm so suspendiert, dass sich ein Trockensubstanzgehalt von 3 g/l einstellt. Der Schlamm wurde bis zur Verwendung belüftet. Die Nitrifikationsrate des Schlammes sollte zwischen 2 mg/(g·h) und 6,5 mg/(g·h) liegen. Da die Nitrifikationsrate beim Belebtschlamm aus der Kläranlage Forchheim leicht erhöht war, wurde nach den Vorgaben der Norm bei der ersten Testdurchführung die Zeitdauer um eine Stunde gekürzt. Wegen der spezifischen Antibiotikawirkung wurde dieser Test anschließend von 4 h auf 24 h verlängert.

Testansatz

Angesetzt wurden 5 Testansätze (T_1 - T_5) in unterschiedlichen Konzentrationen sowie ein Blind- und ein Referenzansatz (T_{Blind} bzw. T_{Ref}) (Tab. 37). Die Endkonzentration der Trockensubstanz des Belebtschlammes sollte 1,5 g/l betragen.

Alle Ansätze wurden 3 h bei konstanter Temperatur (zwischen 20 und 25°C) im Dunkeln bebrütet und geschüttelt, um den Schlamm in Suspension und die O_2 -Konzentration über 2 mg/l zu halten (s. Abb. 15). Es wurde auf gute Durchmischung geachtet. Der Sauerstoffgehalt wurde zu Beginn und am Ende des Tests gemessen.

Tab. 37: Testansätze im Nitrifikationshemmtest

	T_{Blind}	T_1	T_2	T_3	T_4	T_5	T_{Ref}
Nährmedium [ml]	10	10	10	10	10	10	10
Belebtschlamm [ml]	50	50	50	50	50	50	50
Referenzinhibitor [ml]	0	0	0	0	0	0	1,0
Wasser [ml]	40	*	*	*	*	*	39
Stammlösung [ml]	0	*	*	*	*	*	0
Konzentration Testgut [mg/l]	0	*	*	*	*	*	0
Gesamtvolumen [ml]	100	100	100	100	100	100	100

* Die Volumina an Wasser und Testgut, die zugegeben wurden, und die entsprechende Endkonzentration an Testgut variierten von Test zu Test, je nach erwarteter Hemmwirkung der antibiotischen Substanz, ggf. wurde eine Wiederholung des Testes mit anderen Konzentrationsbereichen notwendig.



Abb. 15: Schüttelbad mit Testansätzen des Nitrifikationshemmtests

Bestimmung von Ammonium, Nitrat und Nitrit

Nach der Bebrütung wurde aus jedem Ansatz ein geeignetes Volumen entnommen, über einen gewaschenen Filter (S&S Faltenfilter 595 $\frac{1}{2}$) filtriert und die Konzentration an Ammonium und oxidierten Stickstoffverbindungen (Nitrat und Nitrit) bestimmt. Die Bestimmung erfolgte fotometrisch mittels Spectroquant (Schnelltest von Merck) nach der Vorschrift des Herstellers. Nach der vorgegebenen Reaktionszeit wurde die Extinktion der Proben bei folgenden Wellenlängen bestimmt: Ammonium: 690 nm, Nitrat: 515 nm, Nitrit: 525 nm.

Auswertung

Die prozentuale Hemmung der Bildung von oxidierten Stickstoffverbindungen I [%] (Hemmung der Nitrifikation) wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$(27) \quad I \text{ [\%]} = \frac{C_c - C_t}{C_c - C_b} \cdot 100$$

wobei,

C_c Konzentration an oxidierten Stickstoffverbindungen, angegeben als Stickstoff in mg/l, im Blindansatz ohne Inhibitor nach der Inkubation,

C_t Konzentration an oxidierten Stickstoffverbindungen, angegeben als Stickstoff in mg/l, im Testansatz nach der Inkubation,

C_b Konzentration an oxidierten Stickstoffverbindungen, angegeben als Stickstoff in mg/l, im Referenzansatz mit Inhibitor nach der Inkubation.

Aus den Hemmwerten und den entsprechenden Konzentrationen an Testgut lässt sich die Hemmkurve erstellen und daraus der EC_{50} -Wert ermitteln. Dies erfolgt nach logarithmischer Auftragung mittels eines einfachen PC-gestützten Programms (Probit-Analyse).

Wenn die zu untersuchende Probe Nitrat enthält, ist das bei der Berechnung zu berücksichtigen. Im vorliegenden Fall (eine Antibiotikallösung hergestellt mit VE-Wasser) ist davon nicht auszugehen.

Die spezifische Nitrifikationsrate lässt sich folgendermaßen berechnen:

$$(28) \quad N \text{ [mg/(g \cdot h)]} = \frac{C_t - C_b}{m_s \cdot 4}$$

wobei,

C_t Konzentration an oxidierten Stickstoffverbindungen, angegeben als Stickstoff in mg/l, im Testansatz nach der Inkubation, bzw. im Blindansatz (für die Berechnung der Nitrifikationsrate des unbeaufschlagten Belebtschlammes),

C_b Konzentration an oxidierten Stickstoffverbindungen, angegeben als Stickstoff in mg/l, im Referenzansatz mit Inhibitor nach der Inkubation,

m_s Konzentration der Trockensubstanz in g/l, des Belebtschlammes in den Testansätzen.

Gültigkeit

Die Nitrifikationsaktivität des Schlammes wurde durch den Vergleich von Blindansatz und Referenzansatz bestimmt. Nach der vierstündigen Inkubation darf die Konzentration

ration an oxidierten Stickstoffverbindungen im Referenzansatz nicht gestiegen sein, da der Referenzinhibitor die Nitrifikation speziell hemmt.

Im Blindansatz sollte eine Nitrifikation stattgefunden haben. Allerdings sollte nach der Inkubation noch Ammonium nachzuweisen sein, damit sichergestellt ist, dass das Substrat nicht limitierend war.

Die Nitrifikationsrate sollte zwischen 2-6,5 mg/(g·h) liegen. Ist die Nitrifikationsrate kleiner als 2 mg/(g·h) sollte Schlamm anderer Herkunft verwendet werden. Liegt die Nitrifikationsrate über 6,5 mg/(g·h), ist entweder eine kürzere Inkubationszeit zu wählen oder eine größere Menge an Nährmedium einzusetzen, um sicherzustellen, dass die Ammoniumkonzentration nicht limitierend wirkt.

2.4.4.1 VERLÄNGERTER NITRIFIKATIONSHEMMTEST

Zur Überprüfung der verzögert eintretenden Wirkung von Antibiotika wurde der Test auf 24 h verlängert. Dabei muss gewährleistet sein, dass den Nitrifikanten Nährstoffe in ausreichender Menge zur Verfügung stehen.

In einem Vortest wurde die notwendige Ammoniumkonzentration zu Beginn der Inkubation mittels Schnelltest bestimmt. Nach 3 h Inkubationszeit erfolgte erneut die Bestimmung des Ammoniumgehalts. Aus den Ergebnissen wurde der stündliche Verbrauch an Ammonium ermittelt und dieser auf 24 h Inkubationszeit errechnet. Die Differenz zwischen der Ausgangskonzentration und dem Ammoniumbedarf für 24 h Inkubation wurde den Ansätzen zudosiert.

Bestimmung von Ammonium, Nitrat und Nitrit

Im Rahmen der Anpassung des Testes für die Untersuchung von Antibiotika wurde der Gehalt an Nitrit und Nitrat auch mittels Ionenchromatografie bestimmt. Die Messung erfolgte mit einer IC-Anlage (Dionex, DX 100, Sunnyvale, USA) bestehend aus einer IonPac Säule und Vorsäule (Dionex, AS4A, AG4A), einem Autosupressor (Dionex, ASRL-ULTRA-4 mm) und einem Leitfähigkeitsdetektor (Dionex, CD 25). Als Eluent wurde eine 1,8 mM Natriumcarbonat- / 1,7 mM Natriumhydrogencarbonatlösung mit einer Flussrate von 2 ml/min verwendet. Das Einspritzvolumen betrug 50 µl.

2.4.4.2 NACHWEIS VON NITRIFIZIERENDEN BAKTERIEN MIT NITRI-VIT

Mit dem VIT-Kit (vermicon identification technology; Vermicon, München) wurden Bakterien direkt in der zu untersuchenden Probe identifiziert, visualisiert und bei Be-

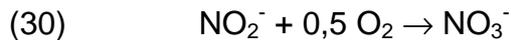
darf auch quantifiziert. Dadurch wurde die Veränderung innerhalb der Population als Folge der Einwirkung der untersuchten Substanz transparenter.

Die mikrobiologische Nitrifikation erfolgt in zwei wesentlichen Schritten:

1. Ammoniumoxidierer oxidieren in einem ersten Schritt Ammonium zu Nitrit.



2. Nitritoxidierer oxidieren anschließend das gebildete Nitrit zu Nitrat.



Durchführung

Bei der Gensondentechnik dringen spezifische Gensonden in die Bakterien ein. Die Sonden bestehen aus DNA- oder RNA-Fragmenten, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. Unter dem Fluoreszenzmikroskop werden diese zum leuchten angeregt.

Auf den Objektträger wurde eine geringe Menge der zu unfiltrierten Probe getropft und dazu einen Tropfen der Fixierungslösung hinzugegeben. Damit wurden die Bakterien abgetötet und für die Gensonden zugänglich gemacht. Anschließend wurde ein Tropfen der VIT-Lösung zugegeben und der Objektträger in den VIT-Reaktor eingesetzt. Während der folgenden Inkubationszeit dringen die Gensonden in die Probe ein und markieren aufgrund ihrer Basensequenz bekannte ammonium- und nitritoxidierende Bakterien, indem sie an komplementäre DNA bzw. RNA binden und sich auch im anschließenden Waschschrift nicht mehr entfernen lassen. Bei diesem Auswaschen werden dann lediglich die Gensonden aus den nicht-nitrifizierenden Bakterien entfernt. Nach einem letzten kurzen Inkubationsschritt und einer Lufttrocknung wurde die Probe unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Um den korrekten Ablauf der Reaktion zu überprüfen, wurden bei jeder Analyse zwei Kontrollen mitgeführt. Bei der Positivkontrolle wurde die zu untersuchende Schlammprobe mit einer Gensonde in Kontakt gebracht, die Basensequenzen enthält, die alle Bakterien erfassen. Jedes zum Zeitpunkt der Probenentnahme lebende Bakterium leuchtet hier rot. Bei der Negativkontrolle wurde die zu untersuchende Schlammprobe zwar ebenfalls behandelt, aber in diesem Fall nicht mit Gensonden in Kontakt gebracht. Die in der Probe enthaltenen Bakterien dürfen dementsprechend weder rot noch grün leuchten. Die Negativkontrolle zeigt also das Hintergrundrauschen des Verfahrens an.

Auswertung

Die Gensonden bewirken ein starkes Leuchten der nitrifizierenden Bakterien, das durch einen Finisher noch verstärkt wird. Auf diese Weise lassen sich die Zellen schnell und einfach identifizieren. Nitritoxidierer leuchten grün und die Ammoniumoxidierer leuchten rot im VIT-Feld. Bei der positiven Kontrolle leuchten alle in der Probe enthaltenen Bakterien rot. Bakterien in der negativen Kontrolle leuchten weder rot noch grün. Bei der quantitativen Auswertung werden 20 willkürliche Gesichtsfelder mit Hilfe eines VIT-Schlüssels einer Gruppe zugeordnet. Die Werte werden addiert und der numerische Mittelwert gebildet. Das erhaltene Ergebnis zeigt die Zugehörigkeit der untersuchten Probe zu einer Gruppe des VIT-Schlüssels.

VIT-Schlüssel:

1. sehr wenige Zellen
2. wenige Zellen
3. mäßig viele Zellen
4. viele Zellen
5. sehr viele Zellen

2.4.5 Anaerober Hemmtest

Die Bestimmung einer möglichen Hemmwirkung der Antibiotika auf den anaeroben Faulschlamm ist zum einen von Bedeutung, um die Auswirkung auf den Faulungsprozess in der Schlammbehandlung kommunaler Kläranlagen abzuschätzen. Zum zweiten werden diese Daten jedoch auch für die Interpretation der anaeroben Abbautests benötigt.

Methodenentwicklung

Im Vorfeld der Versuche nahm die Hydrotox GmbH an einem internationalen Ringversuch zur Bestimmung der Hemmung der Aktivität von anaeroben Bakterien gemäß dem Methodenvorschlag N263 der ISO/TC 147/SC5 vom 16. August 1999 teil. Das Testprinzip besteht darin, die Hemmung der Abbaubarkeit von Hefeextrakt als Substrat durch verdünnten Faulschlamm in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen eines Prüfgegenstands unter Luftabschluss zu bestimmen. Das produzierte Faulgas wird mittels Druckzunahme gemessen. Die prozentuale Hemmung der Gas-

produktion wird über einen Vergleich der Gasproduktion der Prüf- und Kontrollansätze berechnet. Die EC_{50} -Werte werden auf den TS-Gehalt bezogen.

Es wurden zwei Versuchsvarianten mit unverdünntem bzw. mit 1:100 verdünntem Faulschlamm einer kommunalen Kläranlage durchgeführt. Insgesamt nahmen 11 Laboratorien teil. Mit konzentriertem Schlamm konnten mit den Referenzsubstanzen 3,5-Dichlorphenol und Bromethansäure reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. In der 1:100 Verdünnung wurden jedoch wesentlich höhere spezifische EC_{50} -Werte (in mg/g TS) bestimmt. Um einen direkten Bezug zum geplanten anaeroben Abbau- test nach ISO 11734 zu erhalten, wurden weitere Versuche mit einer 1:10 Verdünnung des Faulschlammes angesetzt. Mit dieser Versuchsvariante, die in früheren Entwürfen der ISO/TC 147/SC5 zum anaeroben Hemmtest noch vorgesehen war, wurde mit 100 mg/l Benzalkoniumchlorid nach 8 Tagen eine Hemmung von 57% und mit 100 mg/l 3,5-Dichlorphenol eine Hemmung von 57% bestimmt, wobei die pH-Werte nach Versuchsende den unteren zulässigen Wert von pH 6,8 unterschritten. Der als Substrat eingesetzte Hefeextrakt (Sigma, Y-4, Y-4000) wurde als wesentliche Quelle des pH-Wert Abfalls erkannt. Daraufhin wurde dieser von einem anderen Hersteller (Difco, extract of autolysed yeast cells, Nr. 212750) bezogen, die Konzentration der Stammlösung gegenüber dem Methodenvorschlag halbiert und zudem mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Mit diesen Maßnahmen konnte der pH-Abfall weitestgehend kompensiert werden, so dass nach Versuchsende in den Kontrollen und Testansätzen pH-Werte von 6,7 bis 7,0 bestimmt wurden. Die Randbedingungen des mit dem Umweltbundesamt (Herr Meinecke) abgestimmten Versuchsdesign sind in Tabelle 38 zusammengefasst.

Tab. 38: Randbedingungen des anaeroben Hemmtests

Herkunft Inokulum	Faulschlamm aus kommunaler Kläranlage ohne Krankenhausabwasser (KA Wyhl)
Konz. Inokulum	1 g TS/l (untere Konzentration in DIN EN ISO 11734)
Substrat	2,5 g/l Hefeextrakt (½ der von ISO vorgesehenen Substratkonzentration) pH der Stammlösung mit 25 g/l wird auf ca. 8,0 eingestellt
Flaschen	310 ml mit Septum, Füllvolumen 150 ml \Rightarrow Headspace 52%
Konzentrationsbereich	max. 100 mg/l Substanz
Design	Dreifach Parallelansätze je Konzentration, zusätzliche pH Kontrollen
Messwerte	Faulgasproduktion anhand von Druckmessungen nach 1 bis 7 Tagen, letzte Messung 3 h nach Zugabe von Phosphorsäure zur Erfassung des in der wässrigen Phase gelösten CO ₂
Angabe der Ergebnisse	EC _{10, 50, 90} in mg/g TS = mg/l

Durchführung

Eine Mischung aus verdünntem Faulschlamm (entsprechend 1 g TS/l) und Hefe wurde alleine und mit verschiedenen Konzentrationen der Prüfsubstanzen unter Luftabschluss bei 35°C inkubiert. Als Reaktoren wurden 250 ml Laborflaschen mit Gummi-septen D45 verwendet, die Inkubation erfolgte in einem isolierten Wasserbad mittels Einhängethermostat. In einem 5 l-Erlenmeyerkolben wurden 4,4 l deionisiertes Wasser im Autoklav ohne Überdruck für 10 Min. aufgekocht. Der Kolben wurde mit einem dreifach durchbohrten Stopfen verschlossen, wobei durch den Kolben durch eine der Öffnungen kontinuierlich mit Stickstoff als Schutzgas belüftet wurde. An die zweite Öffnung wurde der Entlüftungsschlauch angeschlossen, über den der Innendruck geregelt werden konnte, durch die dritte Öffnung wurde der Schlauch zum Befüllen der Reaktoren geführt. Nachdem das Wasser auf etwa 45°C abgekühlt war, wurden folgende Lösungen zugegeben:

Tab. 39: Stammlösungen anaerober Hemmtest

Stammlösung		g/l	Zugabe ml/ 5 l	Stammlösung		g/l	Zugabe ml/ 5 l
S-1	Resazurin	0,5 g/l	10	S-5	Na ₂ S*9H ₂ O ¹⁾	50,0	20
S-2	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O NH ₄ Cl	67,5 280,0 132,5	20	S-6	Hefeex- trakt		12,5 g
S-3	MgCl ₂ *6H ₂ O FeCl ₂ *4H ₂ O CaCl ₂ *2H ₂ O 1 ml HCl (konz.)	10 2 7,5	50	S-4	MnCl ₂ *4H ₂ O (Spu- renele- mente)	0,05 0,005 0,005 0,003 0,001 0,1 0,01 0,005	50
					H ₃ BO ₃ ZnCl ₂ CuCl ₂ Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O CoCl ₂ *6 H ₂ O NiCl ₂ *6 H ₂ O Na ₂ SeO ₃		

Der Kolben kühlte in einem Wasserbad mit Leitungswasser (Raumtemperatur) ab, bis der Inhalt etwa die Temperatur von 45 °C erreicht hatte. Dann wurden die entsprechenden Mengen der Stammlösungen S-1-S4 sowie S-5 (Natriumsulfid als Reduktionsmittel) und Hefeextrakt zugegeben und zum Schluss mit 500 ml Faulschlamm, der mit mineralischem Medium auf 10 g TS/l eingestellt war, angeimpft. Im Gegensatz zum anaeroben Abbautest wurde der Schlamm jedoch nicht gewaschen. Das Befüllen der Flaschen geschah unter ständigem Rühren und ständiger N₂-Begasung, indem der Auslassschlauch, über den das Gas abgeleitet wird, zugeedrückt wurde. Der Vorlauf wurde verworfen. Reaktoren mit vorgelegter Probe wurden auf die 150 ml-Marke mit dem Impfschlamm befüllt und sofort mit den Stopfen verschlossen. Pro zu testendem Prüfgegenstand und Konzentration wurden zwei bis drei Parallelansätze befüllt.

Als Funktionskontrolle des Testsystems und Inokulums wurde eine Konzentrationsreihe von 3,5 Dichlorphenol mitgetestet. Die Konzentration der Stammlösung betrug 9,12 g/l. Die Kristalle wurden mit wenigen Tropfen einer 5 M NaOH-Lösung angelöst und dann mit deionisiertem Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

Je Versuchsserie wurden vier Ansätze ohne Prüfgegenstand mitbestimmt. Die Testflaschen wurden ins Wasserbad gestellt, nach etwa einer Stunde wurden alle Stopfen auf den Flaschen mit einer Kanüle durchstoßen, um entstandene, temperaturbedingte Überdrücke auszugleichen. Die Ansätze wurden 7 Tage im Dunkeln inkubiert werktäglich von Hand geschüttelt. Anschließend wurden die Septen je 0.5 ml 85 % Phosphorsäure mittels Insulinspritzen (1 ml Omnifix-F, Fa. Braun) in die Reaktoren gegeben, um das in der flüssigen Phase gelöste Gas auszutreiben, die Gefäße leicht geschüttelt und nach 30 Minuten noch einmal der Druck gemessen und notiert. Weitere Parallelproben wurden lediglich zur pH-Messung herangezogen.

Das produzierte Faulgas wird mittels Druckzunahme gemessen, indem die Reaktoren manuell über eine Injektionskanüle angepiekt und der Überdruck [mbar] über einen Drucksensor (Fa. Schlee GmbH & Co., Witten) abgelesen wurde. Danach wurde der Druck aus den Flaschen abgelassen.

Auswertung

Die prozentuale Hemmung der Gasproduktion wird über einen Vergleich der Gasproduktion der Prüf- und Kontrollansätze kalkuliert. Hierzu wurden die Drücke für jede Konzentration und Meßtag notiert und hieraus die entsprechenden Gasvolumina nach folgender Formel berechnet:

$$(31) \quad V = \frac{(VG - VT) * pT}{1013 \text{ mbar}}$$

mit

V Faulgasproduktion des entsprechenden Testgefäßes [ml],

VG Gesamtvolumen des Testgefäßes [ml],

VT Füllvolumen des Testmediums [ml],

pT gemessener Druck des entsprechenden Testgefäßes [mbar].

Im Nenner steht der Normaldruck.

Die Einzelvolumina wurden aufsummiert und die Hemmung der Gasentwicklung in Bezug zur Kontrolle in Prozent angegeben:

$$(32) \quad I[\%] = \left(1 - \frac{MT}{MC}\right) * 100$$

mit

I prozentuale Hemmung [%],

MT Mittelwert der Gasvolumina der entsprechenden Testkonzentration [ml],

MC Mittelwert der Gasvolumina der Kontrollen [ml].

Für die Bestimmung des EC₅₀ der Hemmwirkung wurden die prozentualen Hemmwirkungen nach Versuchsende verwendet und die Regressionsgerade mittels eines Hydrotox internen EC₅₀-Programms nach log-Probitttransformation berechnet. Die EC₁₀, ₅₀ und ₉₀ Werte werden auf den TS-Gehalt bezogen (mg/g TS).

2.5 MODELLIERUNG UND RISIKOBEWERTUNG

2.5.1 Statistische Methoden für die EC_x-Berechnung

Das Standardverfahren für die Bestimmung der EC_x-Werte ist die Probit-/Logitregression, bei der die oben erläuterten Anteile aus den Versuchen in Probits transformiert werden, also in Quantile der Normalverteilung. Diese werden dann auf die dazugehörigen Konzentrationen regressiert. In der Praxis sind jedoch die sehr strengen Voraussetzungen für eine Probit-Regression oft nicht erfüllt. Daher wurde das Probitmodell mit verschiedenen nichtlinearen Alternativmodellen verglichen, um zu einer Modellempfehlung zu kommen. Dazu wurden die gemessenen Hemmungen der Zellvermehrung (Trübung) aus dem Wachstumshemmtest mit *Pseudomonas putida* und *Enterococcus faecalis* für jede getestete Konzentration am Testgut als Grundlage für die Konstruktion einer Simulationsstudie verwendet.

Die Gleichungen 33-36 stellen die miteinander verglichenen statistischen Methoden dar.

Normalverteilung (Probit):

$$(33) \quad f(x) = \int_{-\infty}^x \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \cdot e^{-\frac{(x-m)^2}{\sigma}} dz$$

Logistische Funktion mit zwei Parametern:

$$(34) \quad f(x) = \frac{1}{1 + e^{-\frac{(x-m)}{\sigma}})}$$

Logistische Funktion mit drei Parametern:

$$(35) \quad f(x) = \frac{a}{1 + e^{-\frac{(x-m)}{\sigma}})}$$

Gompertz-Funktion:

$$(36) \quad f(x) = a \cdot \exp(-\exp(b - c \cdot x))$$

Nach der Bestimmung der zum Vergleich interessanten Verfahren wurde eine Simulationsstudie entworfen, die alle in den realen Versuchen erkannten Varianten von Datengrundlagen beinhaltet. Anhand dieser „künstlichen“ Daten, bei denen die korrekten EC_x -Werte bekannt waren, wurden dann die Verfahren verglichen. D. h. in den vier statistischen Verfahren wurden Beispiele experimenteller Datenverteilung, die bei der Auswertung des EC_x -Wertes vorkommen können, untersucht. In dem ersten Beispiel wurden die Datenpunkte gleichmäßig verteilt und zeigten eine vollständige sigmoide Form. Im zweiten Datensatz lagen keine Werte zwischen 0,1 und 0,9 (keine Punkte in der Mitte). In den zwei letzten Beispielen lagen die beobachteten Werte nur über 0,3 (Punkte nur oben) oder unter 0,6 (Punkte nur unten) (Gleißner et al. eingereicht).

2.5.2 Modellierung

2.5.2.1 DAS MODELL DER EMEA

In dem Diskussionspapier der EMEA (2001) zur Umweltrisikoprüfung von Humanarzneimitteln wird ein mehrstufiges Verfahren beschrieben, bei dem zunächst eine Konzentration im Oberflächengewässer (PEC_{OFW}) mit einem Ökotoxizitätswert für wasserlebende Organismen (Alge, Daphnie, Fisch; $PNEC_{aquatisch}$) verglichen wird. Bei entsprechendem Anzeichen eines Risikos können sowohl die Abschätzungen der Umweltkonzentrationen verfeinert und auf weitere Kompartimente (z. B. Boden oder Sediment) ausgedehnt werden, als auch die Wirkungstests durch andere Arten oder chronische Tests ergänzt werden.

Das verhältnismäßig einfache Verfahren der Umweltrisikobeschätzung von Humanarzneimitteln der EMEA ist in verschiedener Hinsicht kritisiert worden (siehe z. B. CSTEE 2002). An dieser Stelle ist jedoch nur die Abschätzung der Umweltkonzentrationen interessant, die folgendermaßen vorstatten geht:

$$(37) \quad \text{PEC}_{\text{OFW}} \text{ [g/l]} = \frac{A \cdot (100 - R)}{365 \cdot P \cdot V \cdot D \cdot 100} \quad \left[\frac{\text{kg} \cdot \text{d}}{365 \cdot \text{a} \cdot \text{m}^3} = \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} = \frac{\text{g}}{\text{l}} \right]$$

wobei,

- PEC_{OFW} Geschätzte Konzentration im Oberflächenwasser (Predicted environmental concentration in surface waters), die von einem Kläranlagenabfluss gespeist wird,
- A Auf dem Markt verfügbare Menge in einer Zeiteinheit [kg/a]; Abgeschätzte Verbrauchsmenge pro Jahr in einem relevanten geographischen Gebiet in einer der nächsten 5 Jahre. Die Fläche kann ein einzelnes EU-Mitgliedsland mit einem maximalen Verhältnis von Verbrauch zu Bevölkerung sein, oder ein anderes relevantes Gebiet für eine nationale/multinationale Anwendung,
- P Anzahl der Einwohner in dem zugrunde gelegten Gebiet [eq]; wenn weitergehende Überlegungen, z. B. ein $\text{PEC}_{\text{Klärschlamm}}$, angestellt werden, muss dieser Wert an die aktuelle Kapazität von Kläranlagen angepasst werden,
- R Eliminierungsrate (removal rate) [%] aufgrund von Adsorption an Schlammpartikel, Volatilisierung, Hydrolyse, Bioabbau, anderer natürlicher Prozesse oder verminderter Ausscheidung beim Menschen; worst-case $R = 0$,
- V Abwassermenge pro Kopf und Tag [$\text{m}^3/\text{eq} \cdot \text{d}$] (üblicherweise 0,15 bis 0,3 m^3/d in der EU; SimpleTreat verwendet 0,2 m^3/d),
- D Verdünnungsfaktor der Kläranlagenabwässer gegenüber dem Vorfluter [-] (durchschnittlich: 10).

Im Oberflächengewässer findet in Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanz (z. B. des $\log P_{\text{OW}}$) und des Umweltkompartiments eine Verteilung zwischen Sediment und Wasserkörper statt. Die Berechnung der Verteilung

lung orientiert sich an Vorgaben des Technical Guidance Document (European Commission, 2003).

Das Ergebnis der Abschätzung von Umweltkonzentrationen nach EMEA ist also eine Konzentration der Substanz im Oberflächenwasser unmittelbar nach der Verdünnung des Kläranlagenabflusses (Faktor 10; $PEC_{OFW, initial}$). Darüber hinaus erfolgt die Abschätzung einer Anfangskonzentration im Sediment ($PEC_{Sed., initial}$).

2.5.2.2 EUSES 1.0 UND TOXSWA 1.2

In Anbetracht der relativen Einfachheit der Modellierung bei EMEA wurde nach Wegen gesucht, das Verhalten der Substanzen in der Kläranlage und im Oberflächengewässer realitätsnäher zu simulieren. Hierfür bot sich eine Kombination von EUSES und TOXSWA an.

EUSES (Version 1.0) ist ein Instrument für die Risikoabschätzung, das auf europäischer Ebene für die Bewertung von prioritären Chemikalien, vor allem solcher mit großer Produktionsmenge (High Production Volume Chemicals), im Rahmen der Richtlinie 67/548/EWG und folgende verwendet wird. Grundlage hierfür ist das Technical Guidance Document (European Commission, 2003), das zahlreiche Tabellen für die Abschätzung von Emissionen in Abhängigkeit von der Verwendung einer Chemikalie (sog. A-Tables) sowie ein detailliertes Modell einer Kläranlage (aufbauend auf SimpleTreat) enthält.

Dennoch entsteht auch hier eine enorme Unsicherheit in der Abschätzung der Umweltkonzentrationen dadurch, dass die zu Beginn der Modellierung eingehenden Produktions- bzw. Verbrauchsdaten bereits mit großen Ungenauigkeiten behaftet sind.

Weitere Ungenauigkeiten entstehen dadurch, dass die Produktionsmenge für Europa einerseits in eine kontinentale Hintergrundkonzentration, und andererseits in eine regionale Eintragsmenge für Kläranlagen (10% der europäischen Produktionsmenge) umgerechnet wird.

Im Zusammenhang mit der Abschätzung der Emission ist der Anteil der Verbrauchsmenge, der dem Abwasser bei privater Verwendung zugeleitet wird (fraction of tonnage released to waste water), besonders kritisch. Die Emissionstabellen des TGD sehen bei Arzneimitteln (orale Aufnahme) hierfür nur 5% vor. Dieser Faktor wurde – unter der Annahme einer Ausscheidung in die Toilette – auf 90% gesetzt und bei verminderter Ausscheidung entsprechend reduziert.

Erst danach wird das komplexe, vor allem von den physikalisch-chemischen Eigenschaften abhängige, Kläranlagenmodell eingesetzt.

Das Ergebnis der Modellierung mit EUSES ist eine Konzentration der Substanz unmittelbar nach der Verdünnung (Faktor 10) des Kläranlagenabflusses ($PEC_{OFW, initial}$) sowie eine Anfangskonzentration im Sediment ($PEC_{Sed., initial}$) und zwar auf "regionaler Ebene".

Weitere Einzelheiten zu den Parametern in EUSES werden im Rahmen einer Sensitivitätsanalyse (Kapitel 3.5.2.3) diskutiert.

EUSES kann auch eine Umweltkonzentration auf "lokaler Ebene" berechnen, wobei das Modell hierfür von einer hauptsächlichlichen Punktquelle ausgeht. Diese Konstellation ist für die Abschätzung bei Arzneimitteln nicht geeignet.

Die von EUSES berechnete Anfangskonzentration im Oberflächenwasser ist sicherlich zu hoch geschätzt im Vergleich zu Konzentrationen, die sich auf weiten Strecken der Gewässer einstellen werden. Daher wurde, im Anschluss an EUSES, ein Verteilungsmodell in einem (kleinen) Fließgewässer verwendet, das die Möglichkeit eines Abbaus der Substanz und der Eliminierung (z. B. Verlagerung in das Sediment) bot. Das heißt, der Stoff bekommt die Gelegenheit, sich entsprechend seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften, in dem Fließgewässer zu verteilen, zu verdünnen und abgebaut zu werden. Dadurch werden (als zeitlich gewichtetes Mittel) realistischere Umweltkonzentrationen ermittelt. Die Entwicklung solcher Verteilungsmodelle ist im Bereich der Pflanzenschutzmittel besonders weit vorangeschritten, sodass hier auf das Modell TOXSWA (Version 1.2) zurückgegriffen wurde.

Die Bedingungen, unter denen TOXSWA die Verteilung im Gewässer berechnet, sind bei Beltman und Adriaanse (1999) geschildert.

TOXSWA Ver. 1.2 sieht, da es ursprünglich für die Modellierung von Pflanzenschutzmitteln entwickelt wurde, einen Eintrag nur über Drift in einen Bach am Rande eines Feldes vor. Durch eine geeignete Wahl der Oberfläche des Bachabschnitts (z. B. 4 m Länge) und des Querschnitts kann der Eintrag so gewählt werden (Abb. 16), dass die anfängliche Konzentration in Oberflächenwasser, wie sie von EUSES angegeben wird, in diesem ersten Segment von 4 m Länge am oberen Ende des Gewässerlaufs erreicht wird. Dies entspricht einem kontinuierlichen Eintrag aus einer Kläranlage. Anschließend fließt die Substanz mit dem Bachwasser 100 m abwärts und der Stoff verteilt sich in der Wasserphase und im Sediment des Baches.

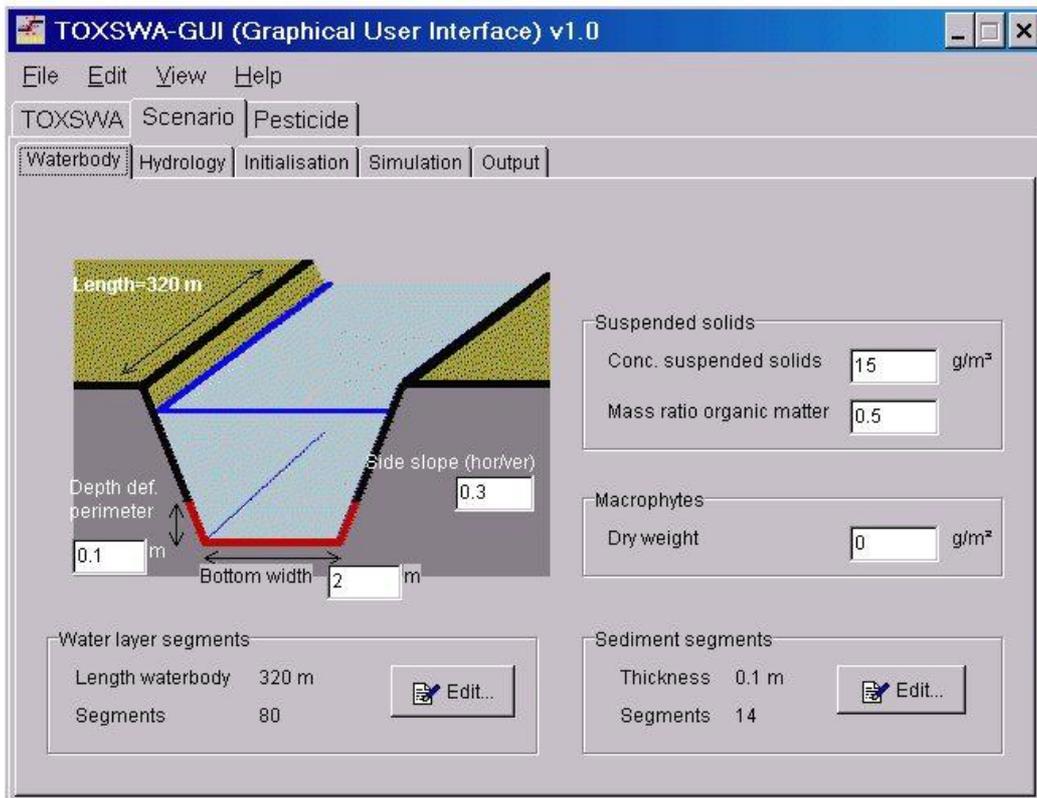


Abb. 16: Beschreibung des Wasserkörpers in TOXSWA.

Im Gegensatz zu EUSES berechnet TOXSWA die Verteilung der Substanz im Wasserkörper und Sediment abschnittsweise und über kurze Zeitintervalle hinweg. Dadurch stellt sich im Laufe der Zeit bei kontinuierlichem Eintrag ein dynamisches Gleichgewicht ein. Im Hinblick auf die teilweise sehr niedrigen K_{om} -Werte erwies sich der Zeitschritt der Simulation als kritisch – er musste bis auf 450 Sekunden (entspricht 192 Rechenschritten pro Tag) herabgesetzt werden. Die Laufzeit der Simulation betrug insgesamt 200 Tage.

Seit Mai 2003 ist eine erweiterte Version von TOXSWA im Rahmen der neuen Pflanzenschutzmittelmodellierung von der FOCUS-Arbeitsgruppe verfügbar, die insbesondere einen Eintrag über Drainage erlaubt, was dem kontinuierlichen Eintrag aus einer Kläranlage näher kommt. Allerdings ist der Zugriff auf das Modell durch die Einbindung in die FOCUS-Oberfläche erschwert und es werden standortspezifische meteorologische Daten (z. B. Regenereignisse) verwendet. Für die Zwecke hier erscheint FOCUS-TOXSWA 1.1.1 nicht geeignet.

TOXSWA erwartet, neben den schon genannten Stoffdaten, wie Wasserlöslichkeit, K_{om} (berechnet aus dem K_{oc} oder $\log P_{ow}$), Dampfdruck, Molmasse etc., weitere Stoffdaten, wie z. B. Aktivierungsenergien und Freundlich-Koeffizienten, die jedoch auf Standardwerte gesetzt werden können (Beltman und Adriaanse 1999).

Für "biologisch nicht leicht abbaubare" Substanzen, und dies trifft für die untersuchten Substanzen zu (Ergebnis der Screening-Tests), nimmt das Technical Guidance Document (European Commission, 2003) eine unendliche Halbwertszeit an. Da TOXSWA einen Zahlenwert erwartet, wird eine lange Halbwertszeit für den biologischen Abbau im Wasser und im Sediment von jeweils 300 Tagen angenommen. TOXSWA errechnet über die Strecke von 100 m die Konzentration im Wasser und in dem obersten Zentimeter des Sediments. Dabei werden Transport-, Verdünnungs- und Abbauprozesse, soweit bekannt, berücksichtigt. Als realistische Umweltkonzentration werden das über 21 Tage gewichtete Mittel der Konzentration im Wasser ($PEC_{\text{surface water, twa 21d}}$) und die aktuelle Konzentration im Sediment ($PEC_{\text{sediment, actual}}$) im letzten Segment des Gewässers (102 m nach dem Eintrag) herangezogen (s. Tabelle 41-44).

Der Feststoffanteil im obersten Zentimeter des Sediments beträgt bei TOXSWA nur 3,2 Gewichts-% (Beltman und Adriaanse 1999, Begründung dieses Wertes). Bei der Umrechnung der Sediment-Konzentration (mg/l Feuchtgewicht) auf mg/kg Trockengewicht ist die Konzentration daher 13,1mal größer als im nassen Sediment. Daraus sind die, im Vergleich zu EUSES und EMEA (Feststoffanteil im Sediment dort 20%), deutlich höheren Sediment-Konzentrationen bei TOXSWA zu erklären – die vorhandene Menge Wirkstoff wird in TOXSWA mit einer deutlich kleineren Menge Feststoff als bei EUSES und EMEA verbunden. Dies kann insbesondere bei Substanzen mit höherem $\log P_{ow}$ zutreffen. Im Hinblick auf eine Risikobetrachtung für Sedimentbewohnende Organismen ist dies als "worst-case" zu betrachten.

2.5.2.3 EINGANGSDATEN FÜR DIE UNTERSUCHTEN SUBSTANZEN

Die Umweltkonzentration, die man mit Hilfe der Modelle versucht zu ermitteln, soll einerseits eine Abbildung der realen Verhältnisse sein, andererseits ist die Wiedergabe spezieller Verhältnisse (z. B. in real existierenden Kläranlagen) ausgeschlossen. Vielmehr wird an eine kontinentale gleichmäßige Verteilung gedacht, die z. B. Unterschiede zwischen Großstädten und ländlichen Gebieten außer Acht lässt. Hier zeigt sich der Ursprung der Modellierung, nämlich die Risikoabschätzung für Industriechemikalien, die in großen Mengen und über ganz Europa hinweg produziert werden. Die Auswahl der folgenden, für die Modellierung erforderlichen Basisdaten, orientiert sich an diesem Zweck:

- Produktions- bzw. Verbrauchsmenge für Europa oder ein Land (wird hochgerechnet); Verwendung als Human und/oder Tierarzneimittel;

- Ausscheidungsrate für die Muttersubstanz (d. h. Berücksichtigung einer Metabolisierung im Körper);
- Molekulargewicht, $\log P_{OW}$, Wasserlöslichkeit, pKs;
- Dampfdruck, Schmelzpunkt, Siedepunkt;
- Biologische Abbaubarkeit (zumindest in den Kategorien "leicht, potentiell, nicht biologisch abbaubar").

Im Rahmen des Vorhabens wurden Produktions- bzw. Verbrauchsmengen für Deutschland ermittelt (s. Anhang Stoffdossiers). Diese werden, weil EUSES Mengen für ganz Europa erfordert, mit dem Faktor 4,4 hochgerechnet, was etwa dem Verhältnis der Bevölkerung in der Deutschland gegenüber der EU entspricht.

Die ermittelten Verbrauchsmengen beziehen sich nur auf die Verabreichung an den Menschen. Soweit die gleichen Wirkstoffe auch in der Veterinärmedizin verwendet werden, können sie auch in die Gewässer gelangen, jedoch meist nicht über Kläranlagen. Es ist für die meisten der hier betrachteten Wirkstoffe bekannt, dass sie in beiden Bereichen eingesetzt werden (s. Tabellen 41-43 und Stoffdossiers). Die in der Veterinärmedizin verwendeten Mengen wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens (F&E 298 63 722) nicht in der Modellierung berücksichtigt.

Die Ausscheidungsrate der Ausgangssubstanz (s. Tabellen 41-43 und Stoffdossiers), d. h. die Metabolisierung im Körper, geht bei dem EMEA-Modell in die Eliminationsrate (removal rate) und bei EUSES in die Emission in das Abwasser (fraction of tonnage released to waste water) ein.

Die physikalisch-chemischen Parameter bestimmen die Verteilung der Substanz zwischen den Phasen Wasser, Feststoff und Luft. Während die Volatilisierung für die hier betrachteten Substanzen praktisch keine Rolle spielt, ist die Adsorption an Feststoffe in der Kläranlage (Klärschlamm) oder im Gewässer (Schwebstoffe und Sediment) außerordentlich wichtig und komplex.

Viele Modelle zur Berechnung von Umweltkonzentrationen, auch EMEA und EUSES/TOXSWA, nehmen an, dass die Adsorption an organisches Material der entscheidende Verteilungsprozess ist, der durch den K_{oc} beschrieben und oft aus dem $\log P_{OW}$ abgeleitet wird. Das trifft jedoch nur für Stoffe zu, die eine gewisse Lipophilie aufweisen, und muss in der Kläranlage (hoher Feststoffanteil) anders bewertet werden als im Oberflächengewässer.

Adsorptionsmechanismen, die nicht auf die Lipophilie zurückgehen (ausgedrückt im $\log P_{ow}$ oder K_{oc}), werden von den Modellen nicht berücksichtigt. Elektrostatische und

van-der-Waals-Kräfte werden im Oberflächenwasser/Sediment-System nicht die große Rolle spielen (dort ist der K_{oc} bestimmend), während Substanzen mit niedrigem K_{oc} in Kläranlagen erstaunliche Adsorptionsraten gezeigt haben (vgl. die Untersuchungen im EU-Projekt POSEIDON, EVK1-CT-2000-00047).

Dissoziierende Stoffe können in den meisten Modellen zur Berechnung von Umweltkonzentrationen, auch EMEA und EUSES/TOXSWA, nicht gleichzeitig mit der neutralen Form verrechnet werden, weil sie sich in der Regel in wesentlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften (Adsorption, Wasserlöslichkeit) unterscheiden. Wenn entsprechende Daten für die geladene und die ungeladene Form des Moleküls vorliegen, kann eventuell das Mengenverhältnis in verschiedenen Kompartimenten mit Hilfe des pK_s abgeschätzt werden. Die Teilmengen sind dann jeweils getrennt zu berechnen. In vielen Fällen sind entsprechende Daten für die geladene Form oder das Salz nicht vorhanden, so dass eine Abschätzung auf der Basis der ungeladenen Form zu einer Fehlabschätzung führt.

Da die geladene Form eines Moleküls anderen Adsorptionsmechanismen unterliegt als die ungeladene und auch eine andere Wasserlöslichkeit besitzt, ist schwer vorzusagen, wie groß im Einzelfall der Fehler bei der Abschätzung der Umweltkonzentration auf der Grundlage der Menge an Ausgangssubstanz ist. Im Rahmen von Zulassungs- oder Notifizierungsverfahren wird, in Ermanglung besserer Daten, häufig nur die Ausgangssubstanz berechnet.

Auch die biologische Abbaubarkeit wird, in Ermanglung der Kenntnis von Abbauraten in Kläranlagen und Oberflächenwasser, im Rahmen von Zulassungs- oder Notifizierungsverfahren für Chemikalien cursorisch behandelt. Im Technical Guidance Document (EC 2003) werden allgemeine Abbauraten den Ergebnissen von Screening-Abbautests zugeordnet (s. Tab. 40). In Ausnahmefällen können andere Abbauraten verwendet werden.

Tab. 40: Zuordnung von Abbauraten zu Ergebnissen von Screening-Tests für die Elimination in Abwasserreinigungsanlagen und den Abbau in Oberflächengewässern gemäß Technical Guidance Document (EUROPEAN COMMISSION 2003).

Testergebnis	Abbaurrate k [d ⁻¹]	Halbwertszeit DT ₅₀ [d]	Abbaurrate k [d ⁻¹]	Halbwertszeit DT ₅₀ [d]
	Abwasserreinigungsanlagen		Oberflächengewässer	
Leicht biologisch abbaubar mit 10-Tage-Fenster	24	0,03	0,047	15
Leicht biologisch abbaubar ohne 10-Tage-Fenster	7,2	0,1	0,014	50
Potentiell (inhärent) abbaubar, spezifische Kriterien erfüllend: Zahn-Wellens-Test: pass level nach 7 d erreicht, lag-phase ≤ 3 d; MITI-II-Test: pass level nach 14 d erreicht, lag-phase ≤ 3 d	2,4	0,3	0,0047	150
Potentiell (inhärent) abbaubar, spezifische Kriterien nicht erfüllend	0	∞	0,0047	150
Biologisch nicht abbaubar	0	∞	0	∞

Tab. 41: Produktions- und Verbrauchsmengen und physikalisch-chemische Grunddaten von 18 Antibiotika für die Modellierung (Quellen für die Daten s. Stoffdossiers im Anhang).

Substanz	CAS Nr.	Produktionsmenge (EU) [t/a]	Verwendung	Ausscheidungsrate [%]
Amoxicillin	26787-78-0	550	Hum. / Vet.	80%
Benzylpenicillin	61-33-6	30,7	Hum. / Vet.	90%
Ceftriaxon	73384-59-5	17,3	Human	60%
Cefuroxim	55268-75-2	45,1	Human	100%
Chlortetracyclin	57-62-5	50 *	Hum. / Vet. / Aquakultur	30%
Clarithromycin	81103-11-9	2,7	Human	100%
Clindamycin	18323-44-9	19,7	Hum. / Vet.	35%
Erythromycin	114-07-8	113,6	Hum. / Vet. / Aquakultur	15%
Gentamycin	1403-66-3	1,1	Hum. / Vet.	95%
Imipenem	64221-86-9	8,8	Vet.	70%
Metronidazol	443-48-1	35,8	Human	40%
Monensin	17090-79-8	50 *	Vet.	k.A.
Nystatin	1400-61-9	17,5	Hum. / Vet.	k.A.
Ofloxacin	82419-36-1	26,9	Human	80%
Sulfamethoxazole	723-46-6	245	Hum. / Vet.	90%
Tetracyclin	60-54-8	0,053	Hum. / Vet.	70%
Trimethoprim	738-70-5	43,6	Hum. / Vet. / Aquakultur	70%
Vancomycin	1404-90-6	6,9	Human	90%

*) Keine Daten zur Produktionsmenge verfügbar, daher wurde eine willkürliche Menge von 50 t / Jahr angenommen.

Tab. 42: Produktions- und Verbrauchsmengen und physikalisch-chemische Grunddaten von 18 Antibiotika für die Modellierung (Quellen für die Daten s. Stoffdossiers im Anhang).

Substanz	Molekülmasse [g/mol]	log P _{ow} ^{a)}	Wasserlöslichkeit [g/L]	pK _s
Amoxicillin	365,4	0,87	4	2,4/7,4/9,6
Benzylpenicillin	334,4	1,83	0,21	2,8
Ceftriaxon	554,6	< -1	100	3/3,2/4,1
Cefuroxim	424,4	0,29	100	2,5
Chlortetracyclin	479	-0,62	0,6	3,3/7,4/9,3
Clarithromycin	748	3,18	< 0,0001	8,76
Clindamycin	425	2,16	0,03	7,6
Erythromycin	734	3,06	0,0005	8,9
Gentamycin	419	< -1	100	n,a,
Imipenem	299,4	< -1	10	3,2/9,9
Metronidazol	171,2	-0,02	10	2,4
Monensin	670,9	5,43	< 0,0001	6,6
Nystatin	926,1	< -1	1	k.A.
Ofloxacin	361,4	-0,39	1	k.A.
Sulfamethoxazole	253,3	0,89	0,61	5,6
Tetracyclin	444,4	< -1	0,23	8,3/10,2
Trimethoprim	290,3	0,91	0,4	6,6/7,2
Vancomycin	1449,3	-0,84	100	k.A.

^{a)} In EUSES ist der minimale log P_{ow} -1; daher wurde dieser Wert für solche Stoffe angenommen, deren log P_{ow} niedriger liegt.

k.A.: Keine Angaben.

Tab. 43: Produktions- und Verbrauchsmengen und physikalisch-chemische Grunddaten von 18 Antibiotika für die Modellierung (Quellen für die Daten s. Stoffdossiers im Anhang).

Substanz	Dampfdruck^a [Pa]	Schmelzpunkt [°C]	Siedepunkt^b [°C]	Biologische Abbaubarkeit
Amoxicillin	< 0,000001	330	> 500	nicht leicht abb.
Benzylpenicillin	< 0,000001	243	> 500	nicht leicht abb.
Ceftriaxon	< 0,000001	k.A.	k.A.	nicht leicht abb.
Cefuroxim	< 0,000001	289	> 500	nicht leicht abb.
Chlortetracyclin	< 0,000001	336	> 500	nicht leicht abb.
Clarithromycin	< 0,000001	350	> 500	nicht leicht abb.
Clindamycin	< 0,000001	255	> 500	nicht leicht abb.
Erythromycin	< 0,000001	191	> 500	nicht leicht abb.
Gentamycin	< 0,000001	105	> 500	nicht leicht abb.
Imipenem	< 0,000001	k.A.	k.A.	nicht leicht abb.
Metronidazol	< 0,000001	128	357	nicht leicht abb.
Monensin	< 0,000001	325	> 500	nicht leicht abb.
Nystatin	< 0,000001	160	k.A.	nicht leicht abb.
Ofloxacin	< 0,000001	k.A.	k.A.	nicht leicht abb.
Sulfamethoxazole	$9,20 \cdot 10^{-6}$	167	414	nicht leicht abb.
Tetracyclin	< 0,000001	327	> 500	nicht leicht abb.
Trimethoprim	< 0,000001	189	449	nicht leicht abb.
Vancomycin	< 0,000001	350	> 500	nicht leicht abb.

^{a)} In EUSES ist der minimale Dampfdruck 0,000001 Pa; daher wurde dieser Wert für solche Stoffe angenommen, deren Dampfdruck niedriger liegt.

^{b)} In EUSES ist der maximal mögliche Siedepunkt bei 500 °C; daher wurde dieser Wert für solche Stoffe angenommen, deren Siedepunkt höher liegt.

k.A.: Keine Angaben.

Für drei der oben genannten Stoffe konnten mit dem QSAR-Programm EPIWIN physikalisch-chemische Daten für die Salze berechnet werden (s. Tab. 44). Vermutlich sind diese Daten jedoch auf die undissoziierte Form bezogen.

Tab. 44: Gegenüberstellung von physikalisch-chemischen Daten für Salze und Säuren (QSAR-Berechnungen mit EPIWIN).

Substanz	CAS Nr.	log P _{ow}	Wasserlöslichkeit [g/l]	K _{oc}
Benzylpenicillin	61-33-6	1,83	0,21	421
Benzylpenicillin, Natriumsalz	69-57-8	-3,01	104	421
Chlortetracyclin	57-62-5	-0,62	0,6	95
Chlortetracyclin, Hydrochlorid	64-72-2	-3,60	85	35
Monensin	17090-79-8	5,43	< 0,0001	10
Monensin, Natriumsalz	22373-78-0	1,62	0,0016	10

Der log P_{ow} wird bei allen drei Substanzen um mehrere Stufen kleiner und die Wasserlöslichkeit steigt. Der berechnete K_{oc} wird nur beim Chlortetracyclin Hydrochlorid etwas kleiner, bei den Natriumsalzen nicht.

Die Bildung von Salzen oder Hydrochloriden führt, wie erwartet, dazu, dass die Substanzen weniger lipophil und besser wasserlöslich werden. Dadurch ändert sich auch ihr Adsorptionsverhalten in den Modellen (speziell EUSES und TOXSWA). Die Modelle werden, bei Verwendung der Ausgangssubstanz, die lipophile Adsorption überschätzen.

Sensitivitätsanalyse für EUSES

EUSES ist das komplexere Modell für die Berechnung von Umweltkonzentrationen aus den Produktionsmengen. Daher wurde für dieses Modell eine Sensitivitätsanalyse durchgeführt, die sich jedoch nur auf wenige Parameter erstreckt.

Die eingesetzte Tonnage spiegelt sich 1:1 in den errechneten Konzentrationen im Wasser und im Sediment wieder; d. h., bei der doppelten Menge findet sich auch die doppelte Konzentration.

Der auf regionaler Ebene für den Zulauf in die Kläranlage verantwortliche Parameter (fraction of tonnage released to waste water), der in Abhängigkeit von der Ausscheidungsrate variiert wird, reagiert ebenfalls linear. Allerdings machen sich bei kleinen Mengen die Hintergrundkonzentrationen, die auf kontinentaler Ebene errechnet werden, und die zu dem regionalen Kläranlagenablauf hinzuaddiert werden, zunehmend stärker bemerkbar. Daher entspricht einem Wert des Emissionsfaktors von 0,01 eine

Verringerung der letztlich errechneten Umweltkonzentration um den Faktor 0,05. Allerdings werden derartig niedrige Werte des Emissionsfaktors (nur 1% der Emissionsmenge erreicht die Kläranlage) nur bei wenigen Stoffen gefunden.

Die Wasserlöslichkeit spielt keine entscheidende Rolle in der Berechnung. Eine Verminderung der Wasserlöslichkeit um 4 Zehnerpotenzen vermindert die errechneten Konzentrationen gerade mal um den Faktor 0,7 und zwar sowohl in der Wasserphase, als auch im Sediment. Durch die geringer werdende Wasserlöslichkeit wird ein Teil der Substanz im Kläranlagenschlamm zurückgehalten.

Der $\log P_{OW}$ ist der entscheidende Parameter für lipophile Adsorptionsvorgänge in EUSES, nachdem andere Mechanismen der Adsorption nicht berücksichtigt werden. Die Abnahme der Konzentration im Wasser und die Zunahme der Konzentration im Sediment sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Darstellung ist halblogarithmisch; werden auch die Konzentrationsskalen logarithmiert, dann zeigt sich, dass die Konzentration im Sediment (rechte Achse) schwach sigmoid, nahezu linear mit dem $\log P_{OW}$ ansteigt, während die Konzentration im Wasser (linke Achse) immer noch zunehmend mit dem $\log P_{OW}$ abfällt.

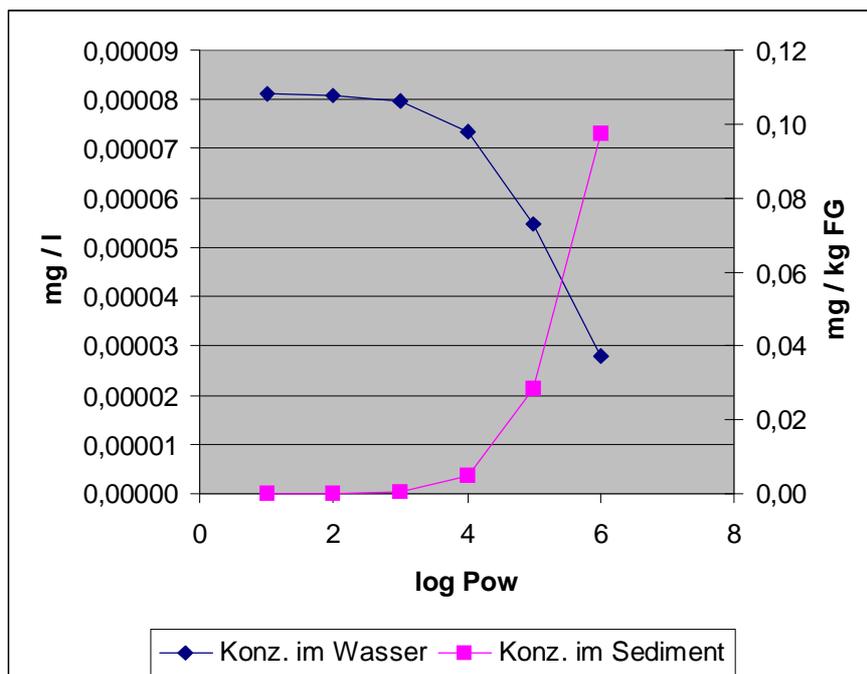


Abb. 17: Veränderung der Konzentrationen in Wasser (mg/l) und Sediment (mg/kg Feuchtwicht) in Abhängigkeit von der Veränderung des $\log P_{OW}$ (halblogarithmische Darstellung).

An diesem Bild ändert sich auch dann praktisch nichts, wenn gleichzeitig mit der Erhöhung des $\log P_{OW}$ die Wasserlöslichkeit abgesenkt wird.

Die Konsequenz daraus ist, dass sich die Konzentrationen im Oberflächenwasser auch dann nicht dramatisch verringern, wenn der $\log P_{OW}$ ansteigt. Zwischen einem $\log P_{OW}$ von 3 und einem von 6 nimmt die Konzentration um 2/3 ab, während für die Summe anderer Fehler ein Unterschied um den Faktor 10 nicht ungewöhnlich wäre. Die Bioabbaubarkeit hat einen deutlichen Einfluss auf das Ergebnis. Entsprechend dem Ergebnis im Screening-Abbautest wird der Substanz eine Abbaubarkeitsklasse zugeteilt, der wiederum eine Abbaurrate entspricht (s. Tab. 40). Demnach erreichen mit einer "leichten biologischen Abbaubarkeit" nur 1/10 der Konzentration in Wasser und Sediment, wie die gleiche Substanz, wenn sie "biologisch nicht abbaubar" ist. Entsprechend sind die Faktoren für "leichte biologische Abbaubarkeit mit Verfehlung des 10-Tage-Fensters" 0,3, für "inhärent abbaubar, mit Erfüllung spezieller Kriterien" 0,5 und für "inhärent abbaubar" 0,75 (gilt nicht in der Kläranlage).

2.5.2.4 GEMESSENE UMWELTKONZENTRATION

Der Vergleich von gemessenen Umweltkonzentrationen (measured environmental concentrations, MECs) mit modellierten Daten erlaubt eine Validierung der Modelle. Dabei ist im Rahmen einer Risikobewertung jedoch zu beachten, dass einerseits Modelldaten einen "worst-case" darstellen sollen, d. h. dass die geschätzte Umweltkonzentration tatsächliche gefundene Werte übertreffen sollte, und andererseits, dass die Umweltkonzentrationen in adäquater Weise gemessen und repräsentativ sein sollen. Die Qualität analytischer Daten ist vor allem durch die Wahl einer geeigneten Analysenmethode und ihrer korrekten Anwendung bestimmt sowie durch das Verfahren und die Planung der Probenahme in räumlicher und zeitlicher Hinsicht. Das kürzlich revidierte Technical Guidance Document (EC 2003) für die Bewertung von Chemikalien enthält einen Kriterienkatalog für die Beurteilung von Monitoringdaten auf der Basis eines OECD-Vorschlags (OECD 2000), der als Richtlinie für die Auswahl "adäquater und repräsentativer" Daten für die Expositionsabschätzung von Chemikalien dient. Im Einzelnen werden Monitoringdaten nach folgenden Kriterien beurteilt:

Beurteilung der analytischen Methode

Bei der analytischen Methode sollte deutlich gemacht werden, welche Substanz gemessen wird, was vor allem dann wichtig ist, wenn mehrere chemische Spezies einer Substanz in der Umwelt vorkommen können (z. B. in Abhängigkeit des pH). Weiterhin sollten Einzelheiten der Probenaufbereitung angegeben werden, z. B. welche

Fraktion der Probe analysiert wurde. Wichtig ist auch die Angabe einer Bestimmungsgrenze (limit of quantification; LOQ), der Wiederfindungsraten und des Vertrauensbereichs wiederholter Messungen sowie die Bestimmung von Leerproben. In einigen Fällen kann es notwendig sein, Eigenschaften des Kompartiments, in dem die Probe gezogen wurde, anzugeben, z. B. der Gehalt an organischer Materie in Kläranlagen. Die Verwendung von Standardreferenzproben ist für Arzneimittel nahezu ausgeschlossen, da sie nur in seltenen Fällen verfügbar sind.

Beurteilung der Probennahme

Die Qualität der Probennahme ist durch standardisierte oder definierte Bedingungen bestimmt, z. B. durch die Angabe einer Tiefe der Probennahme oder automatisierte Verfahren. Darüber hinaus sollte dargelegt werden, ob die Daten sich auf ein lokales oder regionales Szenario beziehen. Der Ort der Probennahme sollte beschrieben sein und für das untersuchte Kompartiment (beschrieben durch hydrologisch-chemische Parameter) repräsentativ sein; dazu gehört z. B. die Angabe, wie weit der Ort der Probennahme von dem nächsten Kläranlageneinlauf entfernt liegt. Die Vielfältigkeit der meisten Umweltproben führt zu Variabilität in den analytischen Ergebnissen, sodass die Häufigkeit und das Muster der Probennahme angemessen sein sollte, um die Heterogenität der Probenmatrix abbilden zu können. So geben z. B. 24-Stunden-Sammelproben im Kläranlagenauslauf ein realistischeres Bild der Schadstofffracht als Zufallsproben. Angaben zum Datum und zur Uhrzeit der Probennahme sind daher erforderlich.

Beurteilung der statistischen Analyse

Es sollte angegeben werden, wie die Daten statistisch behandelt wurden, d. h. ob es sich um Einzelwerte aus Stichproben, Mittelwerte oder zusammengesetzte Daten handelt. Nicht nur die Maximalwerte sind von Bedeutung, sondern auch der Median, 90-Perzentile, Minimum, Umfang der Probe, LOQ usw. Falls eine statistische Analyse durchgeführt wurde, sollte angegeben werden, ob die Nicht-Funde (Funde unterhalb der Nachweisgrenze) einbezogen wurden und welcher Wert ihnen zugewiesen wurde. Das TGD (EC 2003) empfiehlt für die Bestimmung des regionalen PEC (auch im Modell verwendet) den Mittelwert der 90-Perzentile einzelner Standorte innerhalb einer Region.

In der Regel werden Monitoringdaten kaum alle Kriterien voll erfüllen. Daher werden die Beurteilungen einzelner Teilkriterien aufsummiert um ein Gesamtbild der Validität der gemessenen Daten zu geben.

Aus dem Vorhaben stehen für einige Stoffe Messdaten aus Kläranlagenabläufen zur Verfügung, die in Tabelle 4 aufgenommen wurden. Weitergehende Messdaten aus Oberflächengewässern stehen derzeit nicht zur Verfügung.

2.5.3 Risikobewertung

Die Risikobewertung von Stoffen in einem Umweltkompartiment beruht auf dem Vergleich der zu erwartenden Umweltkonzentrationen (Predicted Environmental Concentration, PEC) mit den Konzentrationen, bei denen Wirkungen auf Organismen ausgeschlossen werden können (Predicted No Effect Concentration, PNEC).

Für die Ermittlung des PEC-Wertes (s. Gleichung 1) wurde die Bilanzierung des Antibiotikaverbrauchs zugrunde gelegt. Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen lässt sich als Resultat zumindest die relative Toxizität der untersuchten Substanz als eine Konzentration angeben (z. B. EC_{50}) und als PNEC-Wert anwenden. Um die Speziesunterschiede in der Empfindlichkeit, sowie die Unterschiede zwischen der Empfindlichkeit einer Laborspezies und derjenigen von ganzen Lebensgemeinschaften (Extrapolation auf die natürliche Situation) in der Risikoabschätzung miteinzubeziehen, werden Extrapolationsfaktoren (Sicherheitsfaktoren) verwendet. Die in der OECD und EU vorgeschlagenen Faktoren wurden in Tabelle 45 mit jenen der ECETOC verglichen.

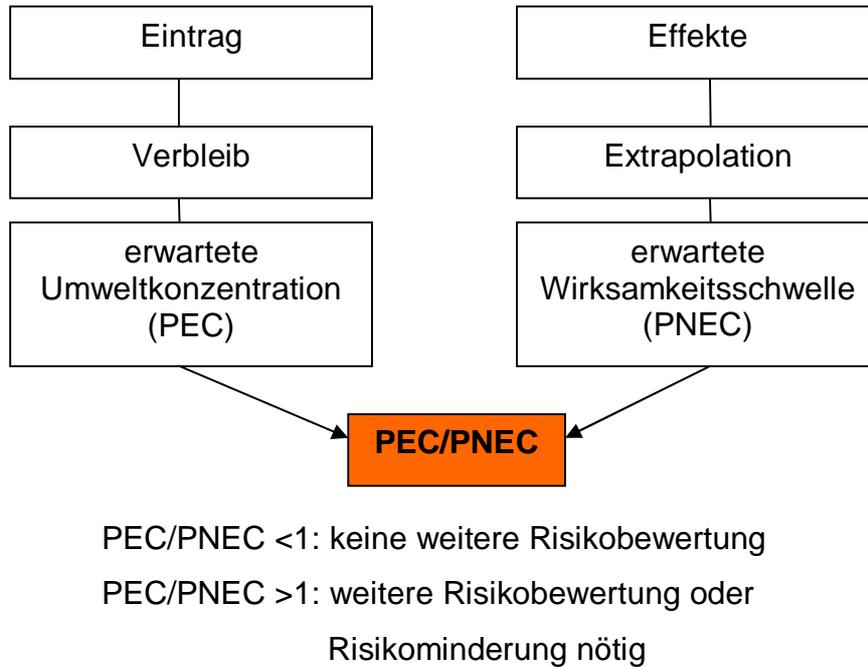


Abb. 18: Konzept der Umwelt- oder ökotoxikologischen Risikoanalyse von Chemikalien (nach ECETOC 1993)

Tab. 45: Extrapolations- oder Sicherheitsfaktoren für die ökotoxikologische Risikoanalyse (PNEC) (Fent 1998)

Voraussetzung	Extrapolationsfaktor (OECD, EU)	Extrapolationsfaktor (ECETOC)
Vorhandensein von akuten LC ₅₀ -Werten für ein oder zwei aquatische Organismen	1000	200
Vorhandensein von akuten LC ₅₀ -Werten für Fische, Krustentiere und Algen	100	200
Vorhandensein von chronischen NOEC-Werten für Fische, Krustentiere und Algen	10	5

In der Tabelle 46 sind die Extrapolationsfaktoren für die Berechnung von PNEC-Werten für Mikroorganismen präsentiert. Dabei sollten laut EU-Anleitung für die PEC-Werte die Ablaufkonzentration der Substanz aus der Kläranlage herangezogen werden. Hier wurden für die Risikobewertung die Ergebnisse aus dem Wachstumshemmtest und die bilanzierten Zulaufkonzentrationen (Kümmerer und Henninger 2003) angewendet (s. Kapitel 4.4.2.2, Tab. 83-84).

Tab. 46: Extrapolations- oder Sicherheitsfaktoren für die ökotoxikologische Risikoanalyse bei Mikroorganismen ($PNEC_{\text{micro-organism}}$) (TGD 1996)

Voraussetzung	Extrapolationsfaktor (OECD, EU)
Vorhandensein von EC_{50} -Werten aus den Tests mit „spez. Bakterienpopulationen“, wie z. B. nitrifizierende Bakterien oder <i>Ps. putida</i> (Wachstumshemmtest)	10
Vorhandensein von NOEC- oder EC_{10} -Werten aus anderen Testsystemen, wie z. B. Respirationshemmtest (OECD 209)	10
Vorhandensein von EC_{50} -Werten aus anderen Testsystemen, wie z. B. Respirationshemmtest (OECD 209)	100

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 LITERATURRECHERCHE UND STOFFAUSWAHL

3.1.1 Literaturrecherche

Eine umfangreiche Literaturrecherche wurde am Anfang des Forschungsvorhabens durchgeführt, um relevante Informationen zu finden, die Grundlage für die Stoffauswahl waren. Gesucht wurden Daten zur Produktions- und Verbrauchsmenge von Antibiotika, Verhalten antibiotischer Wirkstoffe in der Kläranlage, Vorkommen und Verhalten in der Umwelt sowie Abbaubarkeit und Persistenz, Verhalten gegenüber Wasserorganismen sowie physiko-chemische Daten wie Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, pKs-Werte etc. Die Recherche wurde in 8 Literaturdatenbanken und 10 Faktendatenbanken durchgeführt, zum Teil vom Umweltbundesamt, zum Teil vom Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene.

Um die für die experimentellen Untersuchungen geeigneten und relevanten Stoffe auswählen zu können, wurde zunächst eine Liste der auf dem Markt erhältlichen antibiotikahaltigen Produkte erstellt. Von 243 Stoffen wurden projektrelevante Daten nur für 92 Substanzen gefunden und damit ein Stoffdossier erstellt. Im Allgemeinen war die Datenlage schlecht. Nur in Ausnahmefällen war die Datenlage ausreichend, wie z. B. bei Treflan, welches in USA auch als Pestizid angewendet wird und somit aufgrund der Gesetzgebung gründlicher untersucht werden muss. Für die meisten Substanzen konnte kein Stoffdossier erstellt werden, da entsprechende Informationen nicht zur Verfügung standen.

3.1.2 Stoffauswahl der 18 Antibiotika

Aufgrund der im Methodenteil genannten Kriterien wurden folgende Stoffe ausgewählt:

Die bedeutendste Gruppe hinsichtlich des Verbrauchs im Humanbereich sind die β -Lactame. Sie sind auch im Veterinärbereich von Bedeutung. Die Gruppe der β -Lactame gliedert sich in drei Untergruppen: Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme.

Aus der Gruppe der β -Lactame wurden die Penicilline **Amoxicillin** und **Benzylpenicillin** (Penicillin G) ausgewählt. Amoxicillin besitzt unter den Penicillinen das größte PEC/PNEC-Verhältnis und wird sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eingesetzt. In der Gruppe der Penicilline sind außer Amoxicillin noch drei Stoffe, die ein PEC/PNEC-Verhältnis $>1,0$ haben. Aus Gründen der Repräsentativität wurden von jeder Gruppe maximal 2 Vertreter ausgewählt. Benzylpenicillin (Penicillin G) ist der einzige bedeutsame Vertreter der „natürlichen“ Penicilline in der Humanmedizin.

Von den Cephalosporinen, die chemisch mit den Penicillinen verwandt sind (β -Lactame), wurden aufgrund des PEC/PNEC-Verhältnisses **Ceftriaxon** und **Cefuroxim** ausgewählt.

Imipenem wurde aufgrund des hohen Verbrauchs stellvertretend für die relativ neue und an Bedeutung gewinnende Gruppe der Carbapeneme (als relativ kleine Gruppe der β -Lactame) ausgewählt.

Gentamycin gehört zu den Aminoglykosid-Antibiotika der Kanamycingruppe. Das PEC/PNEC-Verhältnis für den Humanbereich ist gleich dem des Netilmicin, aber Gentamycin wird auch im Veterinärbereich eingesetzt.

Die Gruppe der Tetracycline ist vertreten durch die Stoffe **Tetracyclin** und **Chlortetracyclin**, die beide in großen Mengen sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eingesetzt werden. Oxitetracyclin wird nur in der Veterinärmedizin benutzt und wird deshalb hauptsächlich über Gülle direkt in den Boden eingetragen.

Aus der Gruppe der Makrolid-Antibiotika besitzen **Clarithromycin** und **Erythromycin** als einzige ein PEC/PNEC-Verhältnis >1 . Ihr Verbrauch hat im Vergleich zu den Verbrauchsdaten aus vorherigen Jahren eine steigende Tendenz. Außerdem wird mit Erythromycin auch Dehydro-Erythromycin erfasst, das nach der Wasserabspaltung das Produkt des Erythromycins ist.

Den Vertreter der Glykopeptid-Gruppe stellt die Pioniersubstanz **Vancomycin** dar. Das PEC/PNEC-Verhältnis ist vergleichbar mit dem von Teicoplanin, aber Vancomycin ist strukturähnlich zu Avoparcin, das allerdings in der EU als Futterzusatzstoff (Leistungsförderer) aufgrund einer möglichen Förderung der Vancomycin-Resistenz nicht mehr erlaubt ist.

Die größten PEC/PNEC-Verhältnisse aus der Antibiotika-Gruppe der Chinolone (Gyrase-Hemmstoffe) besitzen Ciprofloxacin und **Ofloxacin**. Beide Stoffe sind genotoxisch und persistent in der Umwelt. Ciprofloxacin wurde aber nicht bei der 18er Liste

berücksichtigt, weil zu diesem Stoff schon einige Untersuchungen durchgeführt wurden (Al-Ahmad et al. 1999, Kümmerer 2001, Hartmann et al. 1999).

Sulfamethoxazol und **Trimethoprim** aus der Sulfonamid-Gruppe (Amide der Sulfanilsäure) werden als Kombinationspräparat eingesetzt und liegen in den Verbräuchen pro Jahr am höchsten. Sulfonamide sind neben den Tetracyclinen die größte Gruppe der im Tierbereich eingesetzten Wirkstoffe.

Aus den Stoffen, mit denen auch parasitäre Erkrankungen behandelt werden, ist aufgrund des Verbrauchs **Metronidazol** interessant. Außerdem kann dieser Stoff als Beispielsubstanz dienen, die gegen Anaerobier wirkt und im Verdacht steht, kancerogen zu sein.

Aus der Gruppe der Lincosamide wurde **Clindamycin** für die 18er-Liste ausgewählt. Von den derzeit zugelassenen fünf Leistungsförderern wurde das meist eingesetzte **Monensin-Na** ausgewählt, weil nach dem Verbot von sieben früher zugelassenen Leistungsförderer eine steigende Tendenz des Monensin-Verbrauchs zu erwarten ist. Von den Antimykotika wurde nur ein Vertreter ausgewählt, weil der gesamte jährliche Antimykotikaverbrauch relativ gering ist. Die größten Verbrauchsmengen besitzt das Antimykotikum Itraconazol, aber diese Substanz wird komplett metabolisiert und ist deshalb nicht in unveränderter Form nachweisbar. **Nystatin** und Terbinafin haben als einzige Antimykotika ein PEC/PNEC-Verhältnis >1 , wobei das Nystatin in der 18er Liste berücksichtigt wurde.

Eine Übersicht mit den wichtigsten Informationen über die untersuchten Antibiotika ist in der Tabelle 47 und im Anhang (Stoffdossiers) zusammengestellt.

Tab. 47: Endgültige Stoffliste

Nr.	Name	PEC/PNEC Bakterien >1,0 SF: 100****)	PEC/PNEC Bakterien >0,1<1,0 SF: 100****)	Daten zur akuten Ökotoxizität	Daten zur chroni- schen Ökotoxizität	Toxizität	Nachweis in der Umwelt	Analytik beschrie- ben	TZW: Einschätzung der analytischen Er- fassbarkeit	Bioakkumulation	Abbaubarkeit	Persistenz	Umweltrelevante Stoffe nach BLAC	Umweltrelevante Stoffe nach UBA Wien	radioaktiv markiert verfügbar
1	Amoxicillin	25,71		B*)		gering		#	neutral		#		#	#	
2	Benzylpenicillin	3,58		B*)		gering		#	neutral		#		#	#	#
3	Ceftriaxon	3,53		B*)		nephrotoxisch			gut				#		
4	Cefuroxim	1,67		B*)		nephrotoxisch			gut				#		
5	Chlortetracyclin			B, K*)		gering		#	schlecht			**)	#	#	
6	Clarithromycin	1,36		B*)			#	#	sehr gut				#	#	
7	Clindamycin								?				#	#	
8	Erythromycin ****)	1,33		B, A, K, W, F*)	K*)		#	#	sehr gut			#	#	#	#
9	Gentamycin			B, W*)					sehr schlecht						
10	Imipenem	1,79		B*)					?						
11	Metronidazol = Flagyl			B, A, K, F*)		can.,gen., mut.			?			#		#	
12	Monensin (freie Säure)								schlecht		**)				
13	Nystatin	1,87		B*)											
14	Ofloxacin	2,75		B*)		genotoxisch			neutral			#	#	#	
15	Sulfamethoxazol			B*)		cancerogen	#	#	gut			#	#	#	
16	Tetracyclin			B, A, F*)		gering	#	#	schlecht	-		#	#		

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

Nr.	Name	PEC/PNEC Bakterien >1,0 SF: 100 ^{***})	PEC/PNEC Bakterien >0,1<1,0 SF: 100 ^{***})	Daten zur akuten Ökotoxizität	Daten zur chroni- schen Ökotoxizität	Toxizität	Nachweis in der Umwelt	Analytik beschrie- ben	TZW: Einschätzung der analytischen Er- fassbarkeit	Bioakkumulation	Abbaubarkeit	Persistenz	Umweltrelevante Stoffe nach BLAC	Umweltrelevante Stoffe nach UBA Wien	radioaktiv markiert verfügbar
17	Trimethoprim		0,15	B*)	F*)	gen./mut.,fetot.	#	#	sehr gut		#	#	#	#	
18	Vancomycin			B*)		systemisch			sehr schlecht				#		

*) B = Bakterien, A = Algen, W = Würmer, K = Krebse, F = Fische (Bei keinen Angaben zur Testdauer wurde das Ergebnis als akut bewertet.)

***) siehe Literatur (Stoffdossier)

****) Begründung des Sicherheitsfaktors 100: siehe Stoffauswahl – Methoden

*****) Erythromycin - instabil, Dehydro-Erythromycin ist Produkt von Erythromycin nach der Wasserabspaltung (geschieht nur unterhalb pH 7)

3.1.3 Literaturrecherche zum Abbauverhalten von Amoxicillin

Amoxicillin ist das in der Humanmedizin am häufigsten eingesetzte Antibiotikum in Deutschland. Die jährliche Verbrauchsmenge liegt bei 125.067 kg/a (Kümmerer und Henninger 2003). Dennoch wird dieser Wirkstoff in der Regel weder in Kläranlagen- zu- und -abläufen noch in den Vorflutern wiedergefunden. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine intensive Literaturrecherche zum Abbauverhalten von Amoxicillin durchgeführt.

Ein Einzelbefund für Amoxicillin in einem Oberflächengewässer im Schwarzwald wurde von Lange et al. (2001) berichtet. Bezüglich einer Risikobewertung stellt sich die Frage, was die Ursache für die offensichtlich rasche Eliminierung von Amoxicillin in der aquatischen Umwelt ist. Bei einer Ausscheidungsrate von 60-80% (Dietrich et al. 1998) wären die resultierenden Umweltkonzentrationen verglichen mit anderen pharmazeutischen Wirkstoffen immer noch hoch genug für den spurenanalytischen Nachweis.

Amoxicillin gehört zur Klasse der β -Lactam-Antibiotika. Diese Stoffklasse enthält als gemeinsames strukturelles Merkmal den instabilen β -Lactam-4-Ring. Dieser kann auf verschiedene Weise geöffnet werden. Darauf beruht auch die Hydrolyseempfindlichkeit der β -Lactame.

Die Hydrolyse erscheint als plausibelste Art des Abbaus von Amoxicillin in der Umwelt (Douzinas 2001). Die Literaturrecherche konzentrierte sich daher auf diesen Aspekt. Schlagwortsuchen hinsichtlich der Thematik der Adsorption von Amoxicillin an Klärschlamm, lieferten keine Arbeit zu dieser Problematik zu Tage. Um dieser Frage experimentell nachzugehen, müsste ein Extraktionsverfahren für Amoxicillin aus Klärschlamm zur Verfügung stehen. Aufgrund der zwitterionischen Struktur wäre dazu eine saure oder alkalische Extraktion analog der Bestimmung der Fluorchinolone notwendig. Eine derartige Prozedur verbietet sich jedoch für Amoxicillin wegen seiner Hydrolyseempfindlichkeit und dies dürfte der Grund dafür sein, dass über die Adsorption von Amoxicillin an Klärschlamm keine Informationen verfügbar sind.

Die Stabilität von Amoxicillin in wässrigen Lösungen oder Suspensionen wurde in einer Reihe von Studien untersucht (z. B. Bundgaard 1977, Tsuji et al. 1978, Tomlinson et al. 1980, Cook et al. 1982, Concannon et al. 1986, McDonald et al. 1989, Mehta et al. 1994, Erah et al. 1997, Tokumura und Machida 2001). Diese Untersuchungen wurden jedoch nicht unter Umweltbedingungen durchgeführt, sondern zielen auf

die Stabilität verschiedener Darreichungsformen oder auf das pharmakokinetische Verhalten von Amoxicillin ab. Tsuji et al. (1978) untersuchten neben anderen physikochemischen Eigenschaften auch die Kinetik der säure-base-katalysierten Hydrolyse von Amoxicillin in gepufferten wässrigen Lösungen bei 35°C. Sie beobachteten eine starke pH-Abhängigkeit der Hydrolysereaktion. Das Minimum der Geschwindigkeitskonstante für die nach pseudo erster Ordnung verlaufenden Zerfallsreaktion lag bei etwa 10^{-3} h^{-1} bei pH 6, bei dem überwiegend die zwitterionische Form des Amoxicillins vorliegt. Im Bereich zwischen etwa pH 4 und pH 8 bleibt die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante nahezu unverändert. Sowohl eine pH-Erniedrigung unter pH 4 als auch eine pH-Erhöhung über pH 8 beschleunigt den Zerfall sehr stark. Eine Absenkung bis etwa pH 1 bzw. eine Anhebung bis etwa pH 10 erhöht die Geschwindigkeitskonstante jeweils um etwa drei Größenordnungen. Auch Erah et al. (1997) bestätigen die größte Stabilität von Amoxicillin im pH-Bereich zwischen 4 und 7. In Magensaftproben bei pH 2 betrug die Halbwertszeit $15,2 \pm 0,3 \text{ h}$, so dass nach 1 h nur 4,5% des ursprünglich eingesetzten Amoxicillins abgebaut wurden. Da im Abwassersystem und in kommunalen Kläranlagen extrem saure oder basische Bedingungen normalerweise nicht auftreten, erscheint die säure- oder basekatalysierte Hydrolyse nicht die einzige Nebenreaktion für Säure- oder Basekatalyse gibt es auch andere Möglichkeiten den β -Lactam-Ring zu öffnen. Anstelle der basekatalysierten Ringöffnung durch das Hydroxylion können auch andere Nukleophile durch Angriff am Carbonylkohlenstoff des β -Lactamrings zu dessen Öffnung beitragen. Beispielsweise kann Amoxicillin in wässriger Lösung bei höherer Konzentration (ca. 0,1-0,3 mol/l) mit seiner primären Aminogruppe den Carbonylkohlenstoff eines zweiten Amoxicillin-Moleküls angreifen und den β -Lactamring öffnen, was zur Dimerisierung führt (Bundgaard 1977). Auch Con-cannon et al. (1986) beobachteten bei vergleichsweise hoher Konzentration von Amoxicillin Natrium von 10 mg/ml in sterilem Wasser eine Abnahme auf 90% innerhalb von etwa 1 h bei 0°C, wobei sich diese Zeit auf 13 Tage verlängerte, wenn die Lösung bei -30°C eingefroren wurde. Über eine Abnahme der Stabilität von Amoxicillin in Infusionslösungen mit steigender Konzentration von 1 bis 5% w/v berichten ebenfalls Cook et al. (1982). Die beschleunigte Konzentrationsabnahme mit ansteigenden Wirkstoffgehalten ist wahrscheinlich auf die Dimerisierungsreaktion bei hohen Amoxicillinkonzentrationen zurückzuführen. Mehrfach wird eine starke Abnahme

der Amoxicillinstabilität bei Zusatz OH-funktioneller Substanzen wie Glukose oder Dextrose beschrieben (Cook et al. 1982, McDonald et al. 1989).

Ähnliche Reaktionen, d. h. Ringöffnungsreaktionen durch nukleophilen Angriff sind auch in der Umwelt zu erwarten, da hier eine Vielzahl von Stoffen vorhanden sind, die verglichen mit den erwarteten Amoxicillinspuren im $\mu\text{g/l}$ -Bereich in hohem Überschuss vorhanden sind und als Nukleophile zur Öffnung des β -Lactam-Rings in Frage kommen (z. B. NH- und OH-funktionelle Verbindungen). Welche Nukleophile hierfür im Einzelnen hauptsächlich verantwortlich sind, lässt sich nicht sagen, da es sich z. B. bei einem Rohabwasser um ein unüberschaubares Stoffgemisch handelt. Entsprechende Laboruntersuchungen zu dieser Fragestellung wurden in der Literatur nicht gefunden und wären auch nicht zielführend, da die in der Natur vorkommende Komplexität nicht nachgebildet werden kann.

Neben der reinen chemischen Ringöffnung der β -Lactam-Antibiotika scheint die enzymatische Hydrolyse durch β -Lactamasen ein zweiter wichtiger Mechanismus bei der Eliminierung von Amoxicillin aus Umweltproben zu sein. Die Bildung von β -Lactamasen ist der häufigste Resistenzmechanismus gegenüber β -Lactam-Antibiotika. Nach Theuretzbacher (1998) werden β -Lactamasen bei nahezu allen Bakterien und Pilzen gefunden. Derzeit sind allein über 190 verschiedene klinisch relevante β -Lactamasen beschrieben. Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich, dass ein Großteil des Amoxicillins durch β -Lactamasen bereits auf dem Weg zur Kläranlage abgebaut wird. Die Effektivität der β -Lactamasen wird deutlich, wenn man sich vergegenwärtigt, dass ein einziges β -Lactamase-Molekül etwa 10^3 Penicillinmoleküle pro Sekunde hydrolysiert (Walsh 2000).

Obwohl die in der Literatur verfügbaren Informationen nicht endgültig die Ursache der raschen Elimination von Amoxicillin in der aquatischen Umwelt belegen können, so ist der geschilderte Primärabbau des Amoxicillins durch Ringöffnung, katalysiert durch Säuren, Basen, weitere Nukleophile im Abwasser und insbesondere katalysiert durch β -Lactamasen, der derzeit plausibelste Weg.

3.2 EINTRAG UND NACHWEIS VON ANTIBIOTIKA IN DER AQUATISCHEN UMWELT

3.2.1 Bilanzierung Kenzingen

3.2.1.1 ANTIBIOTIKAVERBRAUCH IN KENZINGEN

Im Rahmen der Bilanzierung wurden 42 antibiotische und 15 antimykotische Wirkstoffe betrachtet, die von den Apotheken und Ärzten vor Ort an Patienten abgegeben wurden. Für die untersuchten Wirkstoffgruppen ergaben sich folgende Werte (s. Tab. 48). Die Gesamtmenge ($Menge_{\text{Gesamt}}$) stellt den Gesamtverbrauch in kg/a dar, während $Menge_{\text{Abwasser}}$ die Menge ist, die nach Berücksichtigung der Ausscheidungsrate jährlich ins Abwasser eingetragen wird.

Tab. 48: Antibiotika- und Antimykotikaverbräuche in Kenzingen

Wirkstoffgruppe	$Menge_{\text{Gesamt}}$ [kg/a]	$Menge_{\text{Abwasser}}$ [kg/a]
Penicilline	12,252	8,597
Cephalosporine	1,523	1,257
Carbapeneme	0,0	0,0
Aminoglykoside	0,006	0,005
Tetracycline	0,537	0,212
Makrolide	2,138	0,203
Glykopeptide	0,0	0,0
Chinolone	0,486	0,228
Antimykobakteriell	0,0	0,0
Lokalantibiotika	0,003	0,001
Sonstige	1,105	0,410
Sulfonamide	3,054	2,595
Antibiotika gesamt	21,105	13,509
Antimykotika gesamt	0,395	0,379

Die detaillierten Ergebnisse der Bilanzierung der Einzelwirkstoffe sind in der Anlagendatei IUK 1.1 zusammen gestellt. Für die prozentuale Verteilung der Wirkstoffe im Abwasser ergeben sich die in Abbildung 19 dargestellten Werte. Die nicht dargestellten Gruppen haben einen Anteil <0,04% und wurden der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt.

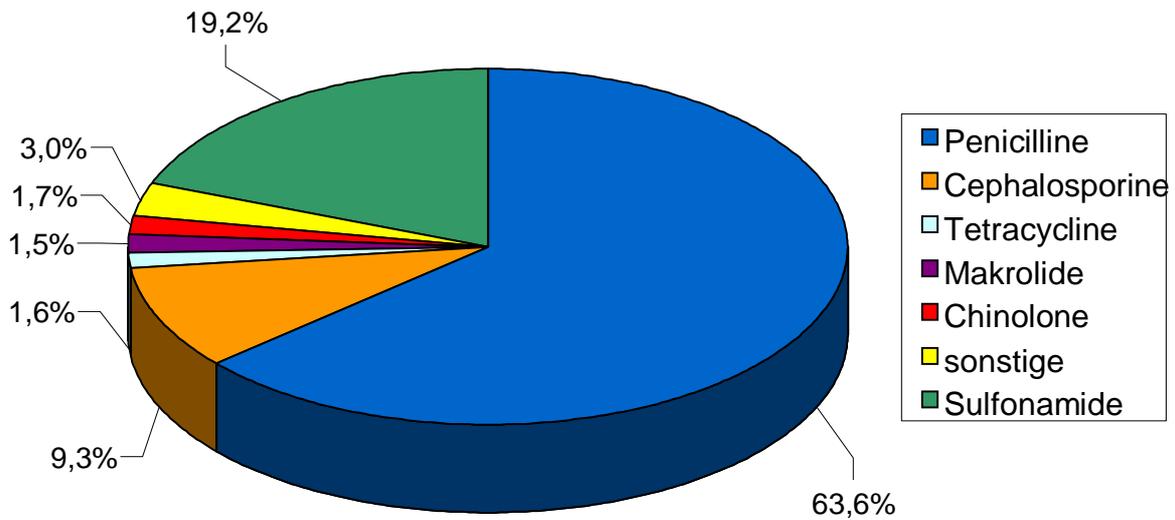


Abb. 19: Prozentuale Verteilung der ins Abwasser eingetragenen Wirkstoffe in Kenzingen für 2001

3.2.1.2 UMWELTKONZENTRATIONEN

Der Kläranlagenzulauf und –ablauf, Belebtschlamm sowie Überschussschlamm der KA Kenzingen wurde auf 44 Antibiotika, 4 Röntgenkontrastmittel und 16 Betablocker hin untersucht. In der ersten Probenahmewoche (22.08.-28.08.2001) konnten von den Antibiotika 6 im Zulauf, 7 im Ablauf und 4 im Belebtschlamm sowie im Überschussschlamm nachgewiesen werden, in der zweiten Probenahmewoche (27.11.-03.12.01) 8 im Zulauf, 7 im Ablauf, 5 im Belebtschlamm und 8 im Überschussschlamm und in der letzten Probenahmewoche im Winter (29.01.-04.02.2002) fanden sich 7 z. T. unterschiedliche Antibiotika im Zu-, Ablauf, Belebtschlamm sowie im Überschussschlamm (vgl. Abb. 1).

Wegen der Zielsetzung der Arbeit wurden in den Tabellen 49 und 50 nur die nachgewiesenen Konzentrationen der Antibiotika dargestellt, obwohl auch 4 Röntgenkontrastmittel (Iopamidol, Iopromid, Iomeprol, Amidotrizoesäure), 5 Betablocker (Atenolol, Sotalol, Propanolol, Metoprolol, Bisoprolol) und 2 Schmerzmittel (Phenazon, Propyphenazon) in mindestens einem von den untersuchten Kompartimenten nachgewiesen wurden. Zum besseren Vergleich der gemessenen Konzentrationen mit den bilanzierten Daten wurden diese auf die im Jahr 2001 behandelte Abwassermenge umgerechnet (1.283.914 m³), da zur Berechnung der Zulaufkonzentrationen nur der

abgeschätzte Trinkwasserverbrauch (390.039 m³) angenommen wurde. In der Bilanzierung wurden die eingetragenen Mengen bewusst auf den Trinkwasserverbrauch und nicht auf die gesamt behandelte Abwassermenge bezogen, um sogenannte „worst-case“ Konzentrationen zu erhalten. Die Risikoabschätzung für einen Wirkstoff beinhaltet nur dann alle Risikofelder, wenn auch der Extremfall berücksichtigt wird. Im Falle der Bilanzierung wurden deshalb für die Ausscheidungsrate maximale und für die Wassermenge minimale Werte angenommen.

Der Vergleich ist in folgender Tabelle dargestellt. Als Vergleichswert wurden die mittleren jährlichen Zulaufkonzentrationen herangezogen. Ein Vergleich der Messwerte mit bilanzierten Zulaufkonzentrationen aus den Wochen vor der Probennahme (z. B. Vergleich der Werte der ersten Probenahme mit dem bilanzierten Gesamtverbrauch im August 2001) erbrachte keine verwertbaren Informationen.

Tab. 49: Ergebnisse der Antibiotika-Bestimmungen in den Zu- und Abläufen (Wochenmischproben) der Kläranlage Kenzingen; alle Angaben in ng/l; Mittelwerte sind nur für die Wirkstoffe angegeben, die in allen Zu- und Abläufen einer Kläranlage nachweisbar waren.

KA Kenzingen	22.08.01-28.08.01		27.11.01-03.12.02		29.01.02-04.02.02		Mittelwert Zulauf	Mittelwert Ablauf	Bilanz. Werte Zulauf
	Zulauf	Ablauf	Zulauf	Ablauf	Zulauf	Ablauf			
Chloramphenicol	n.n.	n.n.	5	n.n.	190	68			0
Clarithromycin	84	30	37	15	28	38	50	28	30
Clindamycin	54	110	3	20	n.n.	n.n.			168
Dehydrato-Erythromycin A	120	71	230	110	340	400	230	194	90*)
Metronidazol	n.n.	n.n.	53	n.n.	n.n.	n.n.			151
Ofloxacin	n.n.	41	n.n.	82	220	75			55
Roxithromycin	99	53	56	35	26	68	60	52	35
Sulfamethoxazol	660	370	150	73	220	180	343	208	1.783
Trimethoprim	130	3	140	10	110	38	127	17	239

Erläuterungen: Werte in Fettdruck: Konzentration über der analytischen Bestimmungsgrenze (abhängig von der Verdünnung)

Werte in Normaldruck: Konzentration unter der analytischen Bestimmungsgrenze (abhängig von der Verdünnung)

n.n.: nicht nachweisbar

*) Bilanzierung für Erythromycin

Tab. 50: Ergebnisse der Antibiotika-Bestimmungen in den Beleb- und Überschusschlammproben (Wochenmischproben) der Kläranlage Kenzingen; alle Angaben in $\mu\text{g}/\text{kg}$; die Proben wurden mit dem in Methodenteil beschriebenen operationell definierten Verfahren (Verfahrensvariante a), Kapitel 2.4.4) analysiert.

KA Kenzingen	Verfahrensvariante	22.08.01-28.08.01		27.11.01-03.12.02		29.01.02-04.02.02	
		Belebtschlamm	Überschusschlamm	Belebtschlamm	Überschusschlamm	Belebtschlamm	Überschusschlamm
Ciprofloxacin	a)	+ (23)	+ (22)	+ (16)	+ (140)	+ (84)	+ (24)
Clarithromycin	a)	+ (13)	+ (19)	+ (5)	+ (11)	+ (11)	+ (15)
Dehydrato-Erythromycin A	a)	n.n.	n.n.	+ (7)	+ (14)	+ (18)	+ (36)
Enoxacin	a)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	+ (57)
Norfloxacin	a)	+ (9)	n.n.	n.n.	+ (160)	+ (26)	+ (9)
Ofloxacin	a)	+ (33)	+ (25)	+ (28)	+ (260)	+ (100)	+ (18)
Roxithromycin	a)	n.n.	n.n.	+ (12)	+ (18)	+ (11)	+ (17)
Trimethoprim	a)	n.n.	+ (1)	n.n.	+ (1)	+ (1)	+ (19)

Erläuterungen: „+“: nachgewiesen
n.n.: nicht nachweisbar
Werte in Klammern: halbquantitative Werte

3.2.1.3 AUSSAGEKRAFT DER BILANZIERUNG

Die Ergebnisse der Bilanzierung zeigen (Tab. 48, Abb. 19), dass die Penicilline die größte Gruppe der verkauften Antibiotika ausmachen, gefolgt von Sulfonamiden und Cephalosporinen. Der pro Kopf Verbrauch in Kenzingen (Einwohnerzahl 8220) an Antibiotika (pro Person ca. 2,6 g/a) liegt unter dem Bundesdurchschnitt, der sich aus einer 1998 durchgeführten Bilanzierung (Kümmerer und Henninger 2003) ergibt (ca. 5,1 g/a und Person). Dies liegt zum einen daran, dass es in Kenzingen keine Krankenhäuser gibt. Genau genommen müsste man den Teil, der in den umliegenden Krankenhäusern ausgegebenen Antibiotikamengen, entsprechend der Einwohnerzahl von Kenzingen addieren. Geht man davon aus, dass in Krankenhäusern ca. 25% der Gesamtmenge verbraucht werden, so ist der Antibiotikaverbrauch in Kenzingen immer noch geringer als der Bundesdurchschnitt. In dieser Bilanzierung sollte aber nicht der pro Kopf-Verbrauch ermittelt werden, sondern vielmehr ein räumlich eingegrenzter Verbrauch, der den Eintrag ins kommunale Abwasser einer Kleinstadt widerspiegelt. Zum anderen ist die Menge kleiner als der Bundesdurchschnitt, weil es nicht allen Ärzten bzw. Arztpraxen möglich war, eine genaue Auflistung über die Antibiotikaausgaben bereitzustellen. Die Verbräuche wurden in einigen Fällen von 3 Monaten auf ein Jahr hochgerechnet, in einem Fall konnten gar keine Daten zur Verfügung gestellt werden. Aufgrund der teilweise sehr hohen Anteile der Arztpraxen am Gesamtverbrauch (zwischen 7 und 100%) kann der bilanzierte Verbrauch deshalb

durchaus geringer sein als der tatsächliche. Außerdem nach der Kassenärztlichen Vereinigung wird in Südbaden im Vergleich zum bundesweiten Verbrauch um ca. 20% Arzneimittel weniger angesetzt (Kern 2002). Dennoch spiegelt der Antibiotikaverbrauch in Kenzingen durchaus die allgemeinen „Gewohnheiten“ der Antibiotikatherapie wieder. Die Verhältnisse der einzelnen Gruppen zueinander sind in Kenzingen nahezu identisch mit denen aus der bundesdeutschen Bilanzierung. Dies betrifft vor allem die prozentuale Verteilung der Wirkstoffe, die ins Abwasser eingetragen werden. Wenn man die Verbräuche aus den Krankenhäusern vernachlässigt, ergeben sich aus den Daten von 1998 (Kümmerer und Henninger 2003, vgl. auch Tab. 48) als größte Gruppe die Penicilline mit 58,1% gefolgt von den Sulfonamiden mit 23,1%. Die restlichen Gruppen sind die Cephalosporine (10,5%), Chinolone (2,8%), Makrolide (2,3%), sonstige (1,9%) und die Tetracycline (1,3%). Die in Abbildung 19 dargestellte Wirkstoffverteilung in Kenzingen ist dieser sehr ähnlich. Die größte Gruppe stellen in beiden Fällen die β -Lactam-Antibiotika (Penicilline und Cephalosporine) dar.

Sie gehören laut Schwabe und Paffrath (1999) aufgrund ihrer starken bakteriziden Wirkung, ihrer geringen Toxizität und ihrer großen therapeutischen Breite zu den am häufigsten verordneten Antibiotika. Simon und Stille (1993) geben als orale Standard-Antibiotika Penicillin V (Phenoxymethylpenicillin), Amoxicillin, Doxycyclin und Co-Trimoxazol (Kombination von Trimethoprim und Sulfamethoxazol) an. Dies bestätigt die Ergebnisse in der Bilanzierung, in der diese Wirkstoffe die meistverwendeten Stoffe in ihrer Gruppe sind. Dass im bilanzierten Zeitraum keine Aminoglykoside verwendet wurden, liegt wahrscheinlich an der Tatsache, dass diese Wirkstoffe oft bei schweren Infektionen, wie sie meist nur in Krankenhäusern behandelt werden, eingesetzt werden (Simon und Stille 1993).

Wurden die Eintragsmengen auf die gesamt behandelte Menge bezogen (s. Tab. 49), so liegt die bilanzierte Zulaufkonzentration bei einigen Wirkstoffen unter der ermittelten. Dies könnte auf saisonal- bzw. tageszeitlichbedingte Schwankungen zurückzuführen sein. Andererseits gibt es auch den Fall, dass sich im Ablauf teilweise mehr von einem Wirkstoff findet als im Zulauf (Erythromycin, Clindamycin und Ofloxacin). In den Tagen vor den Messungen könnten größere Mengen dieser Wirkstoffe in die Kläranlage gelangt sein, so dass zwar dann im Zulauf nichts mehr gemessen wurde, aber die sich schon in der Kläranlage befindlichen Mengen während der Probenahme im Ablauf registriert wurden. Bei einer hydraulischen Verweilzeit von rund

4 d (Hassler 2002) ist dies durchaus denkbar. Andererseits ist es eher unwahrscheinlich, dass dies bei fast allen Probenahmen der Fall war. Weitere Möglichkeit wäre eine Rücklösung von sich im Belebtschlamm befindlichen Wirkstoffen (s. Kapitel 4.3.7).

Ein ungeklärter Punkt ist die Tatsache, dass die Zulaufkonzentrationen einiger Wirkstoffe geringer als erwartet sind. Besonders auffällig ist das bei Amoxicillin, welches das meistverwendete Antibiotikum in Kenzingen und bundesweit ist, im Zulauf von Kläranlagen jedoch nicht nachgewiesen werden konnte (Hirsch et al. 1999, Ternes et al. 1999, Scharf et al. 2002). Bislang konnte nur Färber (2002) Penicilline in einem Bereich zwischen 0,02-0,2 µg/l nachweisen. Mögliche Erklärungen sind in Kapitel 4.1.3 aufgelistet. Hirsch et al. (1999) und Ternes et al. (1999) wiesen z. B. auch keine Tetracycline und β -Lactam-Antibiotika in Kläranlagenabläufen nach, obwohl aufgrund der bundesweiten Verbräuche auch dort mit entsprechenden Zulaufkonzentrationen zu rechnen ist. Im Falle von Tetracyclin gehen sie von einer Komplexbildung mit Ca^{2+} und ähnlichen Ionen aus, im anderen Fall führen sie das auf die Instabilität des β -Lactam Ringes zurück (Forth et al. 1992). Trotz aller Ungereimtheiten dieser Ergebnisse werden die meisten Wirkstoffe, die in den Kläranlagenzu- und -abläufen von Kenzingen gefunden wurden, auch von Hirsch et al. (1999) und Ternes et al. (1999) in Kläranlagenabläufen nachgewiesen (Clarithromycin, dehydr. Erythromycin, Roxithromycin, Chloramphenicol, Sulfamethoxazol und Trimethoprim), was die durchgeführten Untersuchungen bestätigt. Auch Scharf et al. (2002) wiesen Antibiotika in Kläranlagenzu- und -abläufen nach. Von den untersuchten Substanzen (Penicillin V, Benzylpenicillin, Sulfamethoxazol, Erythromycin und Trimethoprim) konnten die letzten drei nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auch auf eine Elimination der β -Lactam-Antibiotika hin.

Erstaunlich ist die Tatsache, dass Chloramphenicol im Zu- und Ablauf der Kläranlage gefunden wurde. Dieses Antibiotikum ist wegen seiner möglicherweise cancerogenen Wirkung seit August 1994 im Veterinärbereich verboten. Dennoch scheint diese Substanz weiterhin zum Einsatz zu kommen. Laut Bettin (1996) wies ein hoher Anteil der in den Tierbeständen und Schlachthöfen gezogenen Proben im Jahre 1995 Rückstände von Chloramphenicol auf, was auf den illegalen Einsatz dieser Substanz hindeutet. Im Falle der Kläranlage Kenzingen wäre generell eine Anwendung im Veterinärbereich denkbar, jedoch finden sich aus dem Veterinärbereich stammende Antibiotika größtenteils nicht in der Kläranlage, sondern eher in Böden durch die

Ausbringung antibiotikahaltigen Mists oder Gülle. In dem bilanzierten Jahr wurde nur 0,05 g Chloramphenicol verschrieben (Humanbereich), was eine vernachlässigbare Menge ist und passierte nicht mal in den analytisch untersuchten Wochen. Woher der Eintrag von Chloramphenicol stammt, bleibt ungeklärt.

Bei den Chinolonen fällt auf, dass sie vor allem im Belebt- und Überschussschlamm, nicht aber im Zu- und Ablauf nachzuweisen sind. Für Ciprofloxacin ist bekannt, dass es an Sedimente (Hektoen et al. 1995) und Schlamm (Hertle 1999) adsorbiert. Somit ist auch für die anderen Chinolone eine Adsorption an Schlammteilchen anzunehmen, weshalb sie vermehrt im Schlamm nachzuweisen wären. Dies wurde durch Adsorptionsversuche mit Ofloxacin bestätigt.

Da Hirsch et al. (1999) die Stoffe, die sie in Kläranlagenabläufen gefunden haben, auch in Oberflächenwasser nachgewiesen haben, ist anzunehmen, dass diese auch im Kenzinger Oberflächenwasser zu finden sind. Wenn schon in einer durchaus repräsentativen Gemeinde wie Kenzingen, die zudem kein Krankenhaus besitzt, ein Eintrag von Antibiotika stattfindet, kann man durchaus sagen, dass wohl in der gesamten Bundesrepublik mit solch einem Eintrag in Oberflächengewässer zu rechnen ist. Ein Einfluss auf die Umwelt ist nicht auszuschließen, gerade weil Antibiotika mit dem Ziel entwickelt werden, eine biologische Wirkung zu haben. Halling-Sørensen et al. (1998) beschreiben das Auftreten und die Wirkungen von einigen pharmazeutischen Substanzen, geben aber zu Bedenken, dass weitere Untersuchungen nötig sind, um die Umweltrisiken, die von einem Medikamenteneintrag ausgehen, zu untersuchen. Es ist bislang nicht bekannt, ob und welchen Effekt solche Substanzen haben können, selbst wenn sie nur in sehr geringen Konzentrationen in der Natur zu finden sind. Die Komplexität der Ökosysteme erschwert Untersuchungen auf diesem Gebiet. Es ist fast unmöglich alle Einflussfaktoren in Laborversuchen nachzustellen. Derzeit sind alle noch nicht ausreichend bekannt.

3.2.2 Kläranlagen Forchheim und Wyhl

Im Rahmen des Projekts wurden jeweils drei Wochenmischproben aus dem Zulauf, Ablauf und Belebtschlamm der kommunalen Kläranlagen Forchheim und Wyhl auf Antibiotika-Wirkstoffe analysiert.

Die über jeweils eine Woche verteilten Teilproben wurden vor der Analyse im TZW-Labor zu einer Mischprobe vereinigt. Neben den im Rahmen des Projekts ausgewählten Zielverbindungen wurden noch weitere Wirkstoffe analysiert, die sich in die

entsprechenden Analysenmethoden integrieren lassen. Während die Mischproben aus der Kläranlage Kenzingen zur Minimierung möglicher Matrixeffekte noch anhand verschiedener Verdünnungen mit Trinkwasser ermittelt wurden, wurden die Proben aus den Kläranlagen Forchheim und Wyhl mit der Standardadditionsmethode analysiert. Im Falle der Zulaufproben der Kläranlage Wyhl war allerdings selbst die Standardadditionsmethode nicht mehr für eine zuverlässige Quantifizierung geeignet. Diese Proben waren einerseits gekennzeichnet durch Interferenzen der Signale der Zielverbindungen mit Signalen des Untergrunds. Andererseits zeigten die Standardadditionen hier nahezu keine Abhängigkeit mehr von der zudotierten Konzentration, sodass nur noch eine qualitative Aussage über den Nachweis der Antibiotikawirkstoffe möglich war.

In den Tabellen 51 und 52 sind die Ergebnisse der Zu- und Ablaufproben zusammengefasst.

Insgesamt wurden 10 verschiedene Wirkstoffe in den Zu- oder Abläufen der Kläranlagen Forchheim und Wyhl nachgewiesen. In allen Proben waren mindestens drei Vertreter aus der Stoffklasse der Makrolide (Azithromycin, Clarithromycin, Erythromycin und Roxithromycin) nachweisbar. Des Weiteren traten zwei Wirkstoffe aus der Klasse der Sulfonamide (Sulfadiazin, Sulfamethoxazol), je ein Wirkstoff aus der Klasse der Fluorchinolone (Ofloxacin), der Nitroimidazole (Metronidazol), der Lincosamide (Clindamycin) sowie der weitere Wirkstoff Trimethoprim auf. Von diesen 10 Verbindungen sind folgende 7 Wirkstoffe aus der 18er-Liste dieses Projekts enthalten: Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin (quantifiziert als Dehydrato-Erythromycin A), Metronidazol, Ofloxacin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim. Es waren keine Wirkstoffe aus den Stoffklassen der β -Lactam-Antibiotika und der Tetracycline nachweisbar, was in Einklang mit den bisherigen Ergebnissen verschiedener Oberflächengewässeruntersuchungen steht.

Tab. 51: Ergebnisse der Antibiotika-Bestimmungen im Zu- und Ablauf (Wochenmischproben) der **Kläranlage Forchheim**; alle Angaben in ng/l; Mittelwerte sind nur für die Wirkstoffe angegeben, die in allen Zu- und Abläufen einer Kläranlage nachweisbar waren.

KA Forchheim	12.01.03-19.01.03		20.01.03-26.01.03		27.01.03-02.02.03		Mittelwert	Mittelwert
	Zulauf	Ablauf	Zulauf	Ablauf	Zulauf	Ablauf	Zulauf	Ablauf
Azithromycin	210	200	180	110	220	120	203	143
Clarithromycin	420	150	430	200	430	180	427	177
Clindamycin	33	60	40	49	38	49	37	53
Dehydrato-Erythromycin A	340	260	380	140	340	140	353	180
Metronidazol	n.n.	86	n.n.	39	130	86		
Ofloxacin	47	50	36	36	58	35	47	40
Roxithromycin	360	110	250	120	250	100	287	110
Sulfadiazin	89	35	130	35	110	56	110	42
Sulfamethoxazol	560	660	840	580	720	850	707	697
Trimethoprim	290	310	260	380	410	330	320	340

Tab. 52: Ergebnisse der Antibiotika-Bestimmungen im Zu- und Ablauf (Wochenmischproben) der **Kläranlage Wyhl**; alle Angaben in ng/l; Mittelwerte sind nur für die Wirkstoffe angegeben, die in allen Zu- und Abläufen einer Kläranlage nachweisbar waren.

KA Wyhl	10.03.03-16.03.03		17.03.03-23.03.03		24.03.03-30.03.03		Mittelwert	Mittelwert
	Zulauf	Ablauf	Zulauf	Ablauf	Zulauf	Ablauf	Zulauf	Ablauf
Azithromycin	+	300	+	290	+	370	-	320
Clarithromycin	+	21	+	66	+	58	-	48
Clindamycin	n.n.	64	n.n.	18	n.n.	22	-	35
Dehydrato-Erythromycin A	+	600	+	540	+	180	-	440
Ofloxacin	+	73	+	98	+	110	-	94
Roxithromycin	+	550	+	560	+	330	-	480
Sulfamethoxazol	+	1100	+	1200	+	1000	-	1100
Trimethoprim	+	300	+	220	+	210	-	243

Erläuterungen: Werte in Fettdruck: Konzentration über der analytischen Bestimmungsgrenze (abhängig von der Verdünnung)

Werte in Normaldruck: Konzentration unter der analytischen Bestimmungsgrenze (abhängig von der Verdünnung)

+: positiver qualitativer Nachweis, quantitative Auswertung aufgrund von Matrixeffekten nicht möglich

n.n.: nicht nachweisbar

Für die meisten Wirkstoffe ergaben sich über die verschiedenen Probennahmezeiträume keine besonders auffälligen Konzentrationsschwankungen, sodass hinsichtlich der Bewertung der Befunde von einer permanenten Grundbelastung der kommunalen Abwässer mit einer bestimmten Anzahl häufig eingesetzter Wirkstoffe auszugehen ist. Die drei Wirkstoffe Clindamycin, Metronidazol und Ofloxacin wurden mehrfach in Konzentrationen im Bereich der analytischen Bestimmungsgrenze nachgewiesen. Hier kommt es teilweise zu Situationen, wo die in den Ablaufproben ge-

gemessenen Werte höher als die entsprechenden Zulaufkonzentrationen sind. Hierfür können verschiedene Ursachen verantwortlich sein. Eine Möglichkeit ist eine nicht korrespondierende Probennahme, das heißt die Zu- und Ablaufproben wurden gleichzeitig und nicht um die mittlere Verweildauer in der Kläranlage versetzt entnommen. Eine weitere Einflussgröße ist die fotochemische Instabilität mancher Verbindungen. Beispielsweise ist bekannt, dass Metronidazol und verschiedene Fluorchinolone fotochemisch instabil sind. Dies kann je nach Dauer und Intensität der Lichteinwirkung auf die einzelnen Proben zu scheinbar unplausiblen Werten führen. Eine Rücklösung adsorbierter Anteile aus dem Klärschlamm ist eine weitere denkbare Möglichkeit für höhere Ablaufkonzentrationen.

Die gemessenen Konzentrationen liegen im Bereich von einigen ng/l bis zu über 1000 ng/l. Die höchste Wirkstoffkonzentration wurde für Sulfamethoxazol in den Ablaufproben der Kläranlage Wyhl ermittelt. Der Mittelwert über alle drei Wochen lag hier bei 1100 ng/l. Sulfamethoxazol wird häufig in Kombinationspräparaten als Sulfonyl-Wirkstoff zusammen mit Trimethoprim im Verhältnis 5:1 eingesetzt, was das gleichzeitige Auftreten beider Wirkstoffe in allen untersuchten Abwasserproben erklärt. Dabei ist Sulfamethoxazol wie erwartet stets die Überschussskomponente. Das Verhältnis von ca. 5:1, d. h. ein Anteil von Trimethoprim von ca. 20%, wird in den Ablaufproben der Kläranlage Wyhl sowohl in den einzelnen Wochenmischproben als auch im Mittel recht gut wiedergefunden. In der Kläranlage Forchheim beträgt der Trimethoprim-Anteil zwischen 30 und 65%, im Mittel 45% im Zulauf und 48% im Ablauf, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen Zu- und Ablaufproben zu erkennen ist. In der Kläranlage Kenzingen variiert dieses Verhältnis von Probe zu Probe stärker als in den beiden anderen Kläranlagen. Auffällig ist hier, dass die Elimination von Trimethoprim weitergehender als in der Kläranlage Forchheim ist. Mögliche Erklärungen sind eine bessere biologische Reinigungsleistung der Kläranlage Kenzingen oder eine bessere Elimination durch bevorzugte Adsorption von Trimethoprim an diesen Klärschlamm. Auch die Ergebnisse von Grundwasseruntersuchungen in Baden-Württemberg (Sacher et al. 2002) deuten darauf hin, dass das unterschiedliche Sorptionsverhalten von Sulfamethoxazol und Trimethoprim dazu führt, dass Trimethoprim in keiner Probe, die Sulfamethoxazol enthielt, mehr nachzuweisen war, während in Oberflächengewässern Verhältnisse von Sulfamethoxazol zu Trimethoprim zwischen 3,5:1 und 6,8:1 ermittelt wurden.

Tab. 53: Ergebnisse der Antibiotika-Bestimmungen in den Belebt- und Faulschlammproben (Wochenmischproben) der **Kläranlage Forchheim**; alle Angaben in µg/kg; die Proben wurden nach verschiedenen Varianten des im Methodenteil beschriebenen operationell definierten Verfahrens analysiert: a) unverändertes Verfahren, b) reduzierte Probenmenge von 100 mg, c) reduzierte Probenmenge von 200 mg, d) reduzierte Probenmenge von 100 mg und Ersatz des Extraktionsmittels durch 2 M HCl.

KA Forchheim		12.01.03-19.01.03		20.01.03-26.01.03		27.01.03-02.02.03	
	Verfahrensvariante	Belebt-schlamm	Faul-schlamm	Belebt-schlamm	Faul-schlamm	Belebt-schlamm	Faul-schlamm
Ciprofloxacin	b)	+ (320)	+ (290)	+ (41)	+ (330)	+ (430)	+ (200)
Ciprofloxacin	c)	+ (190)	+ (20)	+ (78)	+ (24)	+ (33)	+ (34)
Ciprofloxacin	d)	1400	1400	1700	1500	1700	1500
Clarithromycin	b)	+ (19)	n.n.	+ (22)	n.n.	n.n.	n.n.
Clarithromycin	c)	n.n.	+ (13)	+ (10)	n.n.	+ (21)	+ (23)
Clarithromycin	d)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Doxycyclin	b)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Doxycyclin	c)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Doxycyclin	d)	830	950	800	820	830	1100
Norfloxacin	b)	+ (64)	+ (120)	n.n.	+ (72)	+ (38)	+ (72)
Norfloxacin	c)	+ (31)	n.n.	+ (24)	n.n.	+ (8)	+ (11)
Norfloxacin	d)	380	460	490	400	490	470
Ofloxacin	b)	+ (130)	+ (130)	+ (20)	+ (110)	+ (180)	+ (79)
Ofloxacin	c)	+ (64)	+ (16)	+ (32)	+ (16)	+ (10)	+ (17)
Ofloxacin	d)	430	510	540	430	500	480
Roxithromycin	b)	+ (15)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Roxithromycin	c)	n.n.	+ (13)	n.n.	n.n.	n.n.	+ (23)
Roxithromycin	d)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Trimethoprim	b)	+ (26)	n.n.	+ (19)	n.n.	+ (25)	n.n.
Trimethoprim	c)	+ (11)	n.n.	+ (15)	n.n.	+ (13)	n.n.
Trimethoprim	d)	+ (27)	n.n.	+ (20)	n.n.	+ (22)	n.n.

Tab. 54: Ergebnisse der Antibiotika-Bestimmungen in den Belebt- und Faulschlammproben (Wochenmischproben) der **Kläranlage Wyhl**; alle Angaben in µg/kg; die Proben wurden nach verschiedenen Varianten des im Methodenteil beschriebenen operationell definierten Verfahrens analysiert: a) unverändertes Verfahren, b) reduzierte Probenmenge von 100 mg, c) reduzierte Probenmenge von 200 mg, d) reduzierte Probenmenge von 100 mg und Ersatz des Extraktionsmittels durch 2 M HCl.

KA Wyhl	Verfahrensvariante	10.03.03-16.03.03		17.03.03-23.03.03		24.03.03-30.03.03	
		Belebt-schlamm	Faul-schlamm	Belebt-schlamm	Faul-schlamm	Belebt-schlamm	Faul-schlamm
Azithromycin	b)	+ (110)	+ (160)	+ (340)	+ (260)	+ (330)	+ (240)
Azithromycin	c)	+ (120)	+ (280)	+ (310)	+ (210)	+ (310)	+ (230)
Ciprofloxacin	d)	1100	380	1200	470	1200	570
Clarithromycin	b)	+ (5)	+ (3)	+ (9)	+ (6)	+ (8)	n.n.
Clarithromycin	c)	+ (2)	+ (4)	+ (10)	+ (12)	+ (16)	+ (3)
Doxycyclin	d)	720	800	740	890	670	970
Norfloxacin	d)	300	100	270	130	260	210
Ofloxacin	d)	880	390	1100	440	1100	560
Roxithromycin	b)	+ (6)	+ (15)	+ (26)	+ (26)	+ (56)	+ (17)
Roxithromycin	c)	+ (12)	+ (19)	+ (88)	+ (38)	+ (45)	+ (26)
Sulfamethoxazol	b)	n.n.	n.n.	+ (35)	n.n.	+ (22)	n.n.
Sulfamethoxazol	c)	+ (9)	n.n.	+ (14)	n.n.	+ (17)	n.n.
Trimethoprim	b)	+ (26)	n.n.	+ (7)	n.n.	+ (9)	n.n.
Trimethoprim	c)	+ (20)	n.n.	+ (9)	n.n.	+ (6)	n.n.

Erläuterungen: „+“: nachgewiesen
n.n.: nicht nachweisbar
quantitative Werte in Fettdruck
halbquantitative Werte in Normaldruck

Die in den Tabellen 50, 53 und 54 zusammengestellten Ergebnisse der Schlammanalysen zeigen, dass einige der untersuchten Antibiotika eine teilweise starke Tendenz zur Adsorption an Klärschlamm zeigen. Dies trifft insbesondere für die Wirkstoffe aus der Klasse der Fluorchinolone (Ciprofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin) und für Doxycyclin aus der Klasse der Tetracycline zu. Die in den einzelnen Schlammproben ermittelten Gehalte betragen teilweise bis über 1 mg/kg. Erkennbar werden diese vergleichsweise hohen Werte allerdings erst, wenn die Extraktionsbedingungen verschärft werden. Dies wurde in diesen Untersuchungen dadurch erreicht, dass sowohl das Extraktionsmittel-Feststoff-Verhältnis gegenüber dem operationell definierten

Verfahren vergrößert und gleichzeitig die Säurestärke durch Einsatz von 2 M Salzsäure erhöht wurde (s. Verfahren d) Tab. 53 und 54). Unter diesen drastischeren Bedingungen lassen sich allerdings nur noch sehr stabile Verbindungen wie die synthetischen Fluorchinolone und das hydrolysestabile Doxycyclin extrahieren. Hinweise auf adsorbierte Anteile an Klärschlamm wurden auch für Vertreter aus der Stoffklasse der Makrolide sowie für die Wirkstoffe Trimethoprim und Sulfamethoxazol gefunden. Wie der Wechsel des Extraktionsmittels bei den Fluorchinolonen gezeigt hat, können die tatsächlichen Gehalte im Schlamm wesentlich höher liegen als mit dem operationell definierten Extraktionsverfahren ermittelt. Hier sind den Möglichkeiten der analytischen Bestimmung enge Grenzen gesetzt, da die für eine vollständige Extraktion notwendigen drastischen Bedingungen nicht mit der geringen Stabilität vieler Antibiotika, insbesondere von Naturstoffen oder Naturstoffderivaten in Einklang zu bringen sind.

Die Ergebnisse der in diesem Projekt durchgeführten Schlammmuntersuchungen stehen im Einklang mit den Arbeiten von Golet et al. (2002), die durch Accelerated Solvent Extraction (ASE) bei 100°C mit 0,05 M Phosphorsäure vergleichbare Gehalte an Ciprofloxacin und Norfloxacin im Bereich von 1,4-2,4 mg/kg bzw. 1,5-2,4 mg/kg in verschiedenen Klärschlämmen gefunden haben. Auch die in einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel von Thiele-Bruhn (2003) für einzelne Vertreter aus verschiedenen Wirkstoffklassen angegebenen Verteilungskoeffizienten K_d und K_{OC} deuten darauf hin, dass für Tetracycline und Fluorchinolone eine starke Adsorptionsneigung an Feststoffen zu erwarten ist. Für das in diesem Projekt nachgewiesene Doxycyclin sind zwar keine Verteilungskoeffizienten angegeben, jedoch kann als Vergleichswert ein K_d -Wert für die Adsorption von Oxytetracyclin an Klärschlamm von 3020 l/kg bzw. ein K_{OC} -Wert von 8160 l/kg herangezogen werden. Für Ciprofloxacin sind ein K_d -Wert von 417 l/kg, ebenfalls für Klärschlamm, und ein K_{OC} -Wert von 1127 l/kg angegeben. Im Gegensatz dazu liegen die an verschiedenen Feststoffen ermittelten K_d -Werte einer Reihe von Sulfonamiden etwa zwei bis drei Größenordnungen unter den Werten für die Vertreter der Fluorchinolone und Tetracycline, was für den in diesem Projekt untersuchten Wirkstoff Sulfamethoxazol nur eine vergleichsweise geringe Adsorptionsneigung an Klärschlamm erwarten lässt. Sulfamethoxazol wurde daher auch nur im Belebtschlamm der Kläranlage Wyhl, in der auch in der Wasserphase die höchsten Sulfamethoxazol-Konzentrationen aller drei untersuchten Kläranlagen

gemessen wurden, in geringer Konzentration in der Größenordnung der analytischen Bestimmungsgrenze von 10 µg/kg bestimmt.

3.3 VERHALTEN, ABBAU UND ELIMINIERUNG VON ANTIBIOTIKA

3.3.1 Closed Bottle Test (OECD 301 : 1992)

3.3.1.1 BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT IM CBT

Neben dem chemischen und fotochemischen Abbau sowie der Adsorption ist die biologische Abbaubarkeit von in die Umwelt eingetragenen Substanzen von großer Bedeutung für die Elimination dieser Stoffe in der Umwelt und damit letztlich auch für die Expositions- und Risikoabschätzung (Wagner et al. 1988, Taeger et al. 1994). Da die übliche biologische Abwasserreinigung auf dem mikrobiologischen Abbau von in Gewässern unerwünschten oder gar schädlichen Stoffen beruht, ist daher für eine Beurteilung der aus Krankenhäusern, anderen medizinischen Einrichtungen, Haushalten und der Tierhaltung in die Umwelt eingetragenen Stoffe die Prüfung ihrer biologischen Abbaubarkeit ein wesentliches Element neben der Erfassung toxischer Effekte auf Wasserorganismen und Bakterien der Abwasserreinigung.

Der Closed Bottle Test dient zum Prüfen einer leichten biologischen Abbaubarkeit ("ready biodegradability") von organischen Stoffen bzw. Stoffgemischen.

Alle Tests erwiesen sich als valide, da die leicht abbaubare Substanz Natriumacetat in jedem Test innerhalb von maximal 14 Tagen zu mindestens 60% abgebaut wurde. Die kleinen Unterschiede im Abbaugrad von Natriumacetat in der Referenzkontrolle könnten auf die unterschiedlichen Entnahmezeitpunkte und Eigenschaften des Inokulums aus dem Ablauf der Kläranlage Wyhl (Abwasserzweckverband Nördlicher Kaiserstuhl) zurückzuführen sein. Schwankungen in der Zelldichte sind im Ablauf einer Kläranlage zu erwarten. In der Literatur wurde ebenfalls darauf hingewiesen, dass die Menge und Herkunft des Inokulums eine wichtige Rolle für die Streubreite von Abbauergebnissen im CBT spielen (Richterich und Gerike 1986, Nyholm 1991).

Alle untersuchten Antibiotika wurden während 28 Tagen nicht abgebaut und somit sind alle als biologisch nicht leicht abbaubar („not readily biodegradable“) einzustufen (s. Tab. 55). Nur Benzylpenicillin wurde im geringen Umfang von 26% in 28 Tagen biologisch abgebaut (s. Abb. 20, exemplarische Darstellung des Sauerstoffverbrauchs im CBT).

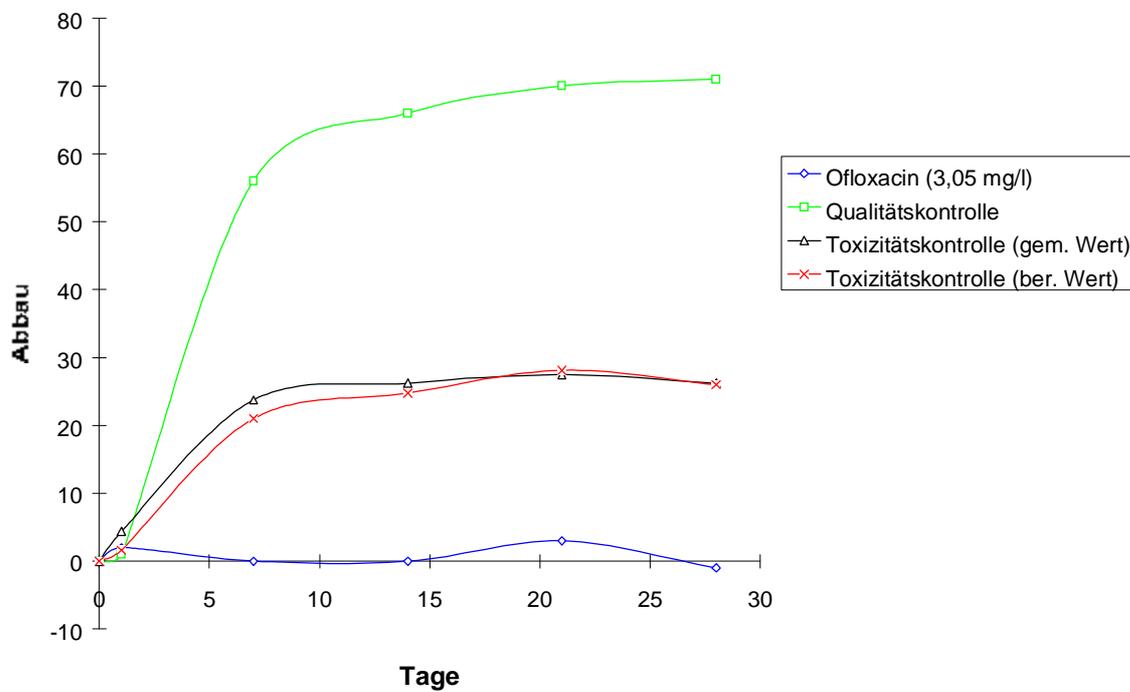
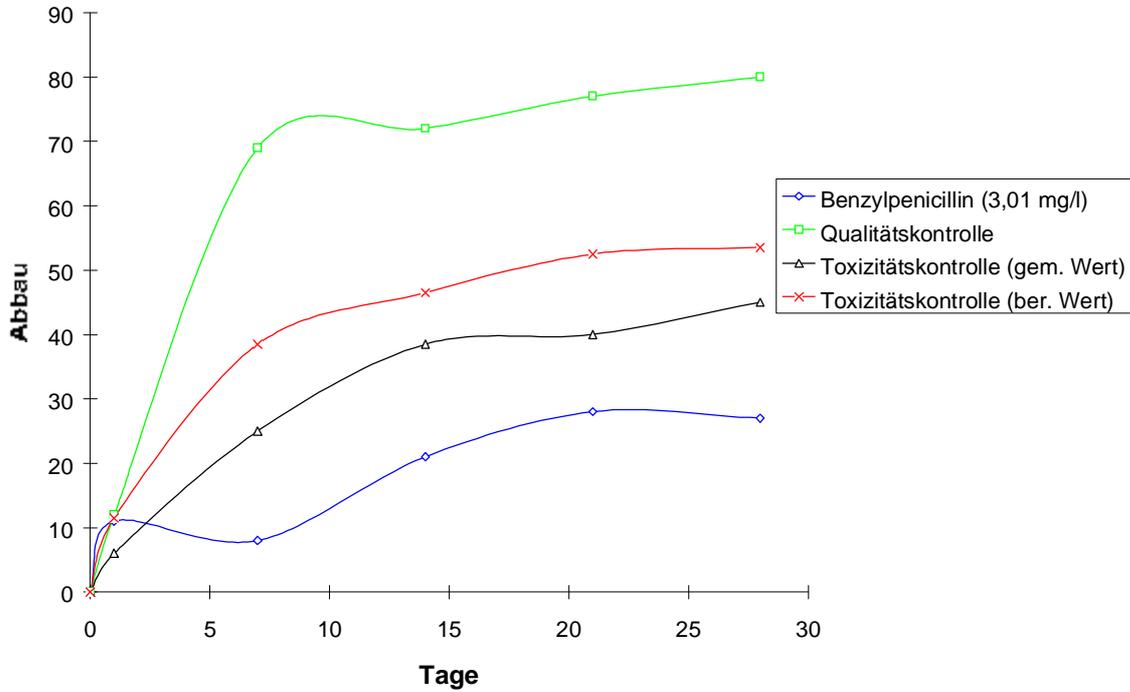


Abb. 20: Exemplarische Darstellung des Sauerstoffsverbrauchs von zwei Antibiotika in der hohen Konzentration

Der Testansatz und die Toxizitätskontrolle wurden jeweils im Konzentrationsbereich von 2-130 µg/l und 2-6 mg/l durchgeführt, um Kenntnisse über die Abhängigkeit von der eingesetzten Antibiotikakonzentration und den Wirkungen auf die Bakterienpopulation zu erhalten. Die mg/l-Konzentration wurde anhand des theoretischen Sauerstoffbedarfs von 5 mg/l berechnet, während die µg/l-Konzentration die Belastungs-

spitze im kommunalen Abwasser simulieren sollte (Kläranlagenzulauf um Faktor 3-10 erhöht). Im Konzentrationsbereich von µg/l konnte der Totalabbau anhand der Sauerstoffzehrung nicht gemessen werden, da die Messempfindlichkeit der Sauerstoffelektrode dazu nicht ausreichend ist. Der gemessene Sauerstoffverbrauch gestattet Aussagen nur über den Teil des Abbaus einer Substanz, der zu CO₂ und Wasser führt. Wenn man den Abbau als biologische Eliminierung definiert, d. h. Umwandlung sowohl in CO₂ und Wasser als auch in unschädliche Zellmasse, so muss aus der Vergleichsbetrachtung gefolgert werden, dass die O₂-Zehrung nur als Anhaltspunkt für die biologische Abbaubarkeit gewertet werden kann. Eine exakte Bestimmung der Eliminierungsrate kann nur mit Hilfe von CSB- oder TOC-Differenzmessungen durchgeführt werden (Zahn und Wellens 1974).

Tab. 55: Prozentuelle biologische Abbaurate nach 14 und 28 Tagen in den Testansätzen

Nr.	Substanz	[mg/l]	Abbau [%] *)	
			14 Tage	28 Tage
1.	Amoxicillin	3,27	3	5
2.	Benzylpenicillin	3,01	21	27
3.	Ceftriaxon	5,32	1	3
4.	Cefuroxim	4,80	-3	-1
5.	Chlortetracyclin	3,65	-1	1
6.	Clarithromycin	2,43	-3	0
7.	Clindamycin	3,07	-2	3
8.	Erythromycin	2,46	-3	-3
9.	Gentamycin	3,05	-3	-3
10.	Imipenem	3,47	-2	1
11.	Metronidazol	5,95	0	1
12.	Monensin	2,35	4	1
13.	Nystatin	2,56	-1	4
14.	Ofloxacin	3,05	0	-1
15.	Sulfamethoxazol	3,76	2	4
16.	Tetracyclin	3,09	-4	2
17.	Trimethoprim	3,25	2	4
18.	Vancomycin	3,55	2	-4

*) Ein Abbau von ± 5% ist in mikrobiologischen Testsystemen natürliche Schwankung.

Anhand der Referenzkontrolle lässt sich die Aktivität des Inokulums ablesen. Die Referenzkontrolle dient zusammen mit dem Testansatz als Vergleichsparameter zur Toxizitätskontrolle, mit der toxische Einflüsse (Inhibition des Abbaus von Natriumacetat) der Testsubstanz festgestellt werden.

Der Abbau von Cefuroxim, Clarithromycin, Clindamycin, Chlortetracyclin, Erythromycin, Gentamycin, Imipenem, Nystatin, Ofloxacin, Tetracyclin und Vancomycin lag bisweilen im Bereich $0 \pm 5\%$, was sich durch die hohe Sauerstoffzehrung im Blindwert erklären lässt.

Eine Toxizität lag nach der Testvorschrift nicht vor, da die Substanz in der Toxizitätskontrolle zu mehr als 18,8% (eingesetzt 5 mg O₂/l Substanz und 3 mg O₂/l Natriumacetat) bzw. 25% (eingesetzt 5 mg O₂/l Substanz und 5 mg O₂/l Natriumacetat) abgebaut wurde. Nach Al-Ahmad und Kümmerer (1998) kann dies allerdings nur als Validitätskriterium betrachtet werden und nicht als Nachweis einer generellen Toxizität, da die Toxizität der Testsubstanz gegenüber dem gesamten Inokulum nicht erfasst werden kann. Bei allen anderen Stoffen außer Benzylpenicillin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim bewegte sich der biologische Abbau im Toxizitätsansatz um 1-10% höher als der von der Norm vorgeschriebene Mindestabbau im 14-Tage Fenster. Dabei sollte ein Abbau von $\pm 5\%$ in mikrobiologischen Testsystemen als natürliche Schwankung heute gewertet werden. Die höhere Abbauraten von Benzylpenicillin und Sulfamethoxazol von 13% und Trimethoprim von 27% im Toxizitätsansatz mit leicht abbaubarem Natriumacetat deutet auf eine verbesserte Abbaubarkeit der Substanz hin, wenn die Bakterien auch eine leicht zu verarbeitende Kohlenstoffquelle (Co-Substrat) zur Verfügung haben (Co-Metabolismus). Wahrscheinlich wurde das Natriumacetat von den Bakterien schneller umgesetzt, d. h. das Wachstum und die Vermehrung der Bakterien könnten eventuell dadurch beschleunigt worden sein.

Die biologische Abbaubarkeit ist nicht nur eine Stoffeigenschaft oder -merkmal, sondern auch ein Systembegriff. In vielen Fällen bestimmt das System mit seinen Bedingungen, ob ein Stoff darin abgebaut wird oder nicht und mit welcher Geschwindigkeit. Deswegen ist die Aussage, dass ein Stoff biologisch abbaubar ist, ohne Angabe der Systembedingungen oft wertlos (Schönberger 1991).

Eine Studie von Doi und Stoskopf (2000) belegt dies am Beispiel von Oxitetracyclin. Die Halbwertszeit von Oxitetracyclinstandards hängt entscheidend von der Temperatur, dem pH-Wert, der Lichtintensität und der Matrixzusammensetzung ab. So wird beispielsweise bei einer Temperatur von 43°C die Substanz um ein Vielfaches

schneller eliminiert, wie dies bei einer Temperatur von 25°C der Fall ist (Faktor 54). Ein hoher pH-Wert, die Einwirkung von Licht und / oder die Zugabe von organischer Materie beschleunigen ebenfalls die Elimination von Oxitetracyclin.

Auch eine eventuelle Adaption der natürlichen mikrobiellen Population an die Testsubstanz spielt beim Abbauverhalten von Stoffen eine wichtige Rolle. Spain und van Veld (1983) zeigten den Einfluss einer Präadaption der Mikroorganismen auf die Elimination am Beispiel einiger Xenobiotika. Allerdings lies sich beim Trifluralin, dem einzigen Antibiotikum, das untersucht wurde, keine Adaption der mikrobiellen Population feststellen.

Richardson und Bowron (1985) untersuchten in nicht standardisierten Tests Ampicillin, Erythromycin, Metronidazol, Sulfamethoxazol, Sulfasalazin und Tetracyclin auf deren Abbaubarkeit während der Abwasserbehandlung und stufen alle untersuchten Antibiotika mit Ausnahme von Ampicillin als nicht abbaubar ein.

In Studien von Al-Ahmad et al. (1999) und Kümmerer et al. (2000) zeigten Ciprofloxacin, Ofloxacin und Sulfamethoxazol im Closed Bottle Test keinerlei Abbau. Für Cefotiam, Meropenem, Metronidazol und Penicillin G wurden Abbauraten zwischen 5 - 36% ermittelt.

Die Abbaubarkeit von Ampicillin im Closed Bottle Test wurde von Cerovec (2000) untersucht. Es zeigte sich, dass die Substanz nicht abgebaut wurde. Ciprofloxacin erwies sich im Closed Bottle Test als ebenso stabil, während Ceftazidim zu 50% eliminiert wurde wie Wiethan (1999) dokumentierte. Diese Elimination war hauptsächlich abiotisch bedingt, vermutlich durch Hydrolyse des β -Lactam-Ringes.

Damit wurden alle in der Literatur zitierten Antibiotika als nicht biologisch leicht abbaubar eingestuft.

Da die Antibiotika in dem 28-tägigen Test biologisch nicht abgebaut wurden, ist zu vermuten, dass diese Stoffe auch nicht in Oberflächengewässern und Kläranlagen abgebaut werden und eine Resistenzverbreitung durch den Eintrag von Antibiotika in Oberflächengewässern nicht ausgeschlossen werden kann. Zumal die bundesweit errechneten Jahresdurchschnittskonzentrationen in Oberflächengewässern nur um den Faktor 10 kleiner sind, als die in der Literatur publizierten MHK für diese Antibiotika (Al-Ahmad und Kümmerer 1998, Erbe et al. 1997).

3.3.1.2 ABIOTISCHE ELIMINATION IM CBT

Bei 10 Antibiotika (Amoxicillin, Benzylpenicillin, Ceftriaxon, Cefuroxim, Chlortetracyclin, Ofloxacin, Sulfamethoxazol, Tetracyclin, Trimethoprim und Vancomycin) für die

eine analytische Methode vorlag, wurde mittels HPLC die Elimination im Konzentrationsbereich von 2-6 mg/l während des Versuchszeitraumes von 28 Tagen verfolgt. Zusätzlich wurde bei 9 Substanzen (Benzylpenicillin, Chlortetracyclin, Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin, Metronidazol, Monensin, Nystatin, Trimethoprim) in der niedrigen Konzentration vom DVGW-Technologiezentrum eine analytische Bestimmung durchgeführt.

Im Konzentrationsbereich von 2-130 µg/l traten sehr große Schwankungen auf, da einige Substanzen schlecht löslich sind und außerdem die Handhabung des Testes nicht für so geringe Konzentrationen gedacht ist (s. OECD 301 : 1992). Trotzdem konnte eine vollständige Primärelimination von Benzylpenicillin und Nystatin nach 28 Tagen festgestellt werden.

Im Bereich von 2-6 mg/l wurden Benzylpenicillin und Chlortetracyclin nach 28 Tagen vollständig eliminiert, was auch mit den Ergebnissen im niedrigen Konzentrationsbereich vergleichbar ist. Amoxicillin wurde zu 92% eliminiert, weiter gefolgt von Cefuroxim (77%), Tetracyclin (73%), Vancomycin (50%), Ceftriaxon (30%) und Ofloxacin (7,5%). Die Substanzen Sulfamethoxazol und Trimethoprim erwiesen sich in den 28 Tagen als völlig stabil (s. Abb. 21 und Tab. 56).

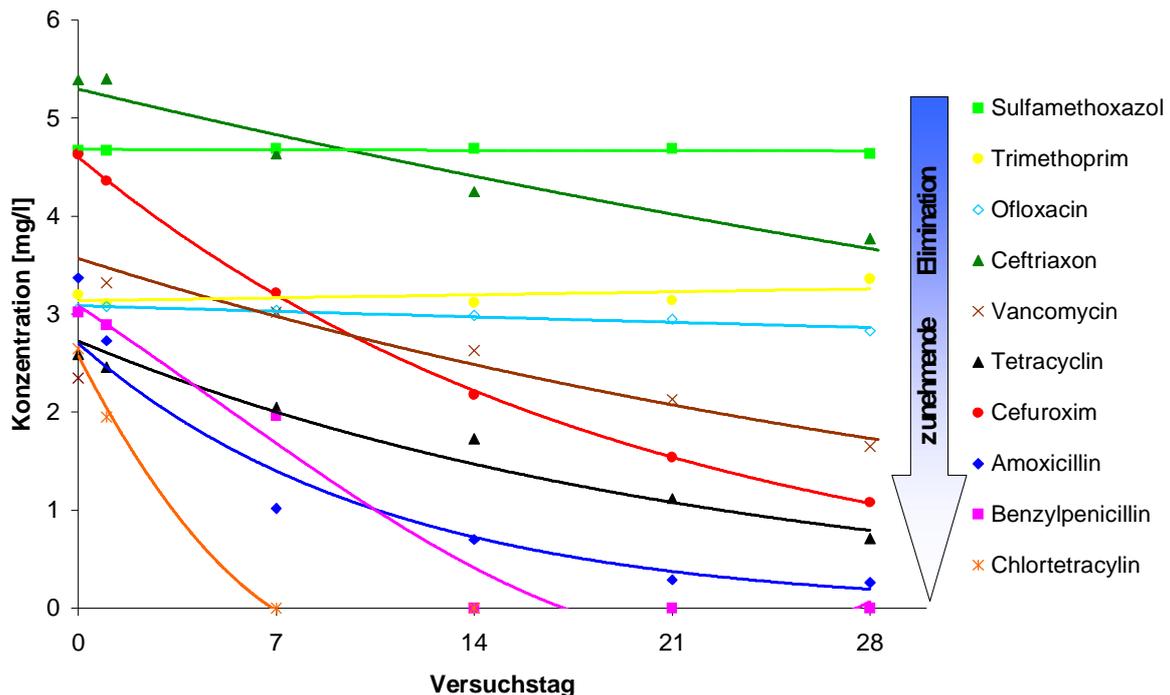


Abb. 21: Primärelimination von Antibiotika im CBT (Konzentrationsbereich 2-6 mg/l)

Die β -Lactame Amoxicillin, Benzylpenicillin, Cefuroxim und Ceftriaxon können enzymatisch oder abiotisch gespalten werden, wobei der β -Lactam Ring geöffnet wird.

Wenn der Ring geöffnet ist, kann die Substanz u.U. von den Mikroorganismen leichter mineralisiert werden. Dieser Prozess hat jedoch keinen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch. Somit lässt sich aus dem Testergebnis schließen, dass Produkte einer Hydrolyse biologisch nicht abgebaut wurden. Des Weiteren konnte außer Färber (2002) keine Arbeitsgruppe Penicilline und Cephalosporine in der Umwelt bzw. Zulauf zu der Kläranlage bislang nachweisen, was wieder die Ergebnisse unterstützt. Deswegen kann daraus geschlossen werden, dass Penicilline und Cephalosporine in der Umwelt wahrscheinlich nicht persistent sind und es nicht zu einer Akkumulation kommt.

Tab. 56: Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten der Elimination von Antibiotika im CBT mit niedriger Bakteriendichte, 20°C und Dunkelheit (Konzentrationsbereich 2-6 mg/l)

Substanz	Geschwindigkeitskonstante k [1/d]	Halbwertszeit t_{1/2} [d]
Amoxicillin	0,0946	7
Benzylpenicillin	bereits nach 14 Tagen nicht mehr nachweisbar	
Ceftriaxon	0,0131	53
Cefuroxim	0,0521	13
Chlortetracyclin	bereits nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar	
Ofloxacin	0,0027	257
Sulfamethoxazol	stabil, s ± 5,9%	
Tetracyclin	0,0441	16
Trimethoprim	stabil: s ± 4,2%	
Vancomycin	0,0258	27

Chlortetracyclin und Tetracyclin wurden vollständig bzw. zu 75% eliminiert. Fjelde et al. (1993) dokumentierten einen fotochemischen Abbau von Oxitetracyclin in Meerwasser, indem die Substanzen in Quarzgläsern 20 Tage lang dem Tageslicht ausgesetzt wurden. Zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Bedeutung der Lichtintensität kam Samuelsen (1989). Er untersuchte den Einfluss von Temperatur (5 und 15°C) und Lichtintensität (Bestrahlung mit 40 W und Dunkelheit) auf die Persistenz von Oxitetracyclin im Meerwasser sowie in Sedimenten. Dabei zeigte sich zum einen, dass die Persistenz von Oxitetracyclin von der Matrix abhängt. Oxitetracyclin war in Sedimenten (t_{1/2}=32-64 Tage) wesentlich stabiler als in Meerwasser (t_{1/2}=128-390 Stun-

den). Die Persistenz im Meerwasser hing zudem von der Temperatur und der Lichtintensität ab. Höhere Lichtintensität sowie höhere Temperaturen begünstigen den Abbau des Antibiotikums in Meerwasser.

Auch nach Lieferantenangaben (Sigma-Aldrich, Steinheim) sind Chlortetracyclin, Tetracyclin und Nystatin lichtempfindlich, so dass die beobachtete Elimination für einen abiotischen Abbau spricht.

Eine Primärelimination wurde auch bei Vancomycin festgestellt. Es ist anzunehmen, dass die Elimination von 50% im Testansatz entweder durch Adsorption an Gefäß- und Bakterienzellwände zustande kam oder durch abiotische Prozesse, welche ohne messbaren Sauerstoffverbrauch abgelaufen sind, da die Substanz als foto- bzw. thermostabil eingestuft wird (s. Kapitel 4.3.6).

Bei der Messung der Primärelimination im CBT mittels HPLC wurde bei Ofloxacin ein geringer Wert von 7,5% über 28 Tage gemessen. Allerdings war auch bei den Werten der Kalibriergeraden, die vor und nach der eigentlichen Messung gemessen wurden, ein abnehmender Trend erkennbar, die Werte lagen bei der zweiten Messung durchschnittlich 3% niedriger als bei der ersten Messung. Eine leichte Abnahme von Ofloxacin innerhalb von 28 Tagen kann daher angenommen werden, die genaue Berechnung der Halbwertszeit ist jedoch kritisch zu betrachten. Da sich im Testansatz kein biologischer Abbau unter Sauerstoffverbrauch zeigte, ist diese Primärelimination wahrscheinlich auf physikalisch-chemische Prozesse wie Adsorption an Gefäßwände, Hydrolyse oder Fotolyse zurückzuführen. Fluorchinolone werden fotolytisch gut abgebaut (Fasani et al. 1998), allerdings wurden die Flaschen größtenteils im Dunkeln aufbewahrt.

Die Substanzen Sulfamethoxazol und Trimethoprim erwiesen sich in den 28 Tagen als stabil. Auch von Römbke et al. (1996) wurden Trimethoprim und Ormethoprim als fotochemisch stabil eingestuft.

Die analytische Untersuchung hat gezeigt, dass einige Antibiotika teilweise oder vollständig einer Primärelimination unterliegen (HPLC-Messung). Der Closed Bottle Test erfasst jedoch nicht alle Arten der abiotischen Elimination einer Substanz, da er im Dunkeln und mit niedriger Bakteriendichte durchgeführt wird.

3.3.2 Kombinationstest (Inhärente Abbaubarkeit)

3.3.2.1 KOMBINATIONSTEST BEI HOHEN ANTIBIOTIKAKONZENTRATIONEN

Es wurden ein Screeningtest mit je einem Testansatz von 16 verschiedenen Antibiotika sowie zwei Haupttests mit je 4 Antibiotika (je zwei Testansätze und 1 Hemmkontrolle) durchgeführt. Im ersten Haupttest wurden Benzylpenicillin, Ceftriaxon, Nystatin und Metronidazol, im zweiten Haupttest Amoxicillin, Erythromycin, Gentamycin, Tetracyclin und Vancomycin untersucht. Bestimmt wurden jeweils die Endabbaubarkeit und die DOC-Elimination. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 57 dokumentiert.

Alleine Benzylpenicillin erwies sich unter den Versuchsbedingungen als endabbaubar (vgl. Abb. 22). Der Abbau zu CO₂ wird durch die DOC-Elimination bestätigt.

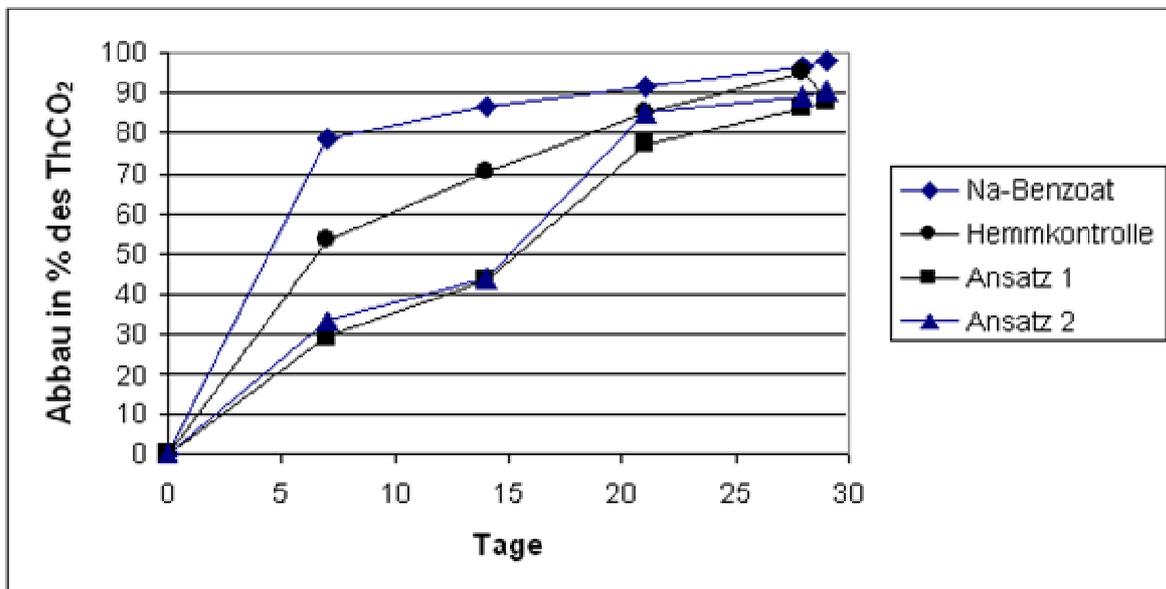


Abb. 22: Abbaubarkeit von Benzylpenicillin im Kombinationstest mit 200 mg TS/l

Von den übrigen Antibiotika können nur Amoxicillin sowie (mit Einschränkung) Imipenem als inhärent abbaubar bezeichnet werden (vgl. Abb. 24 und 27).

Amoxicillin erreichte in einem der Testansätze nach 28 Tagen sogar eine Endabbaubarkeit von über 60%, im zweiten Ansatz wurden jedoch lediglich 13% Abbau zu CO₂ gemessen, ein Wert, der auch durch den ersten Screeningversuch bestätigt wird (10,6% des ThCO₂ nach 28 Tagen, 35% des ThCO₂ nach 36 Tagen, vgl. Anlagenda-
tei Hydrotox 4.1.2). Die lange lag-Phase erklärt die große Schwankungsbreite der Endabbaubarkeit in den verschiedenen Ansätzen/Versuchen.

Imipenem erreichte eine Endabbaubarkeit von knapp über 20%, ein Wert, der sich gut mit der DOC-Elimination deckt (vgl. Abb. 27). Alle weiteren Antibiotika waren nicht inhärent abbaubar, wenn als Kriterium hierfür ein Endabbau von 20% ThCO₂ angenommen wird. Ein typisches Beispiel hierfür ist Gentamycin (vgl. Abb. 23). Zwar wird in der Hemmkontrolle mit Gentamycin und Natriumbenzoat ein Abbau von rd. 40% erzielt, der zumindest keine deutliche Hemmung erwarten lässt. Allerdings wird in den Testansätzen rechnerisch ein negativer Abbau bestimmt, was darauf hinweist, dass das Inokulum weniger aktiv als in den Blindwertansätzen war. Dies kann als Hinweis auf eine leichte Hemmwirkung auf das Inokulum gewertet werden. Überraschend war jedoch, dass trotz der hohen Prüfkonzentration von 100 mg TOC/l keines der untersuchten Antibiotika den Abbau in den Hemmkontrollen vollständig unterband. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde davon ausgegangen, dass ein Abbau von weniger als 40 % in den Hemmkontrollen bezogen auf den ThCO₂ als Hinweis auf eine mögliche Hemmwirkung interpretiert werden kann. Demzufolge wäre bei Gentamycin, Imipenem, Tetracyclin und Vancomycin eine Beeinflussung der biologischen Abbaubarkeit durch eine Hemmung des Inokulums nicht auszuschließen.

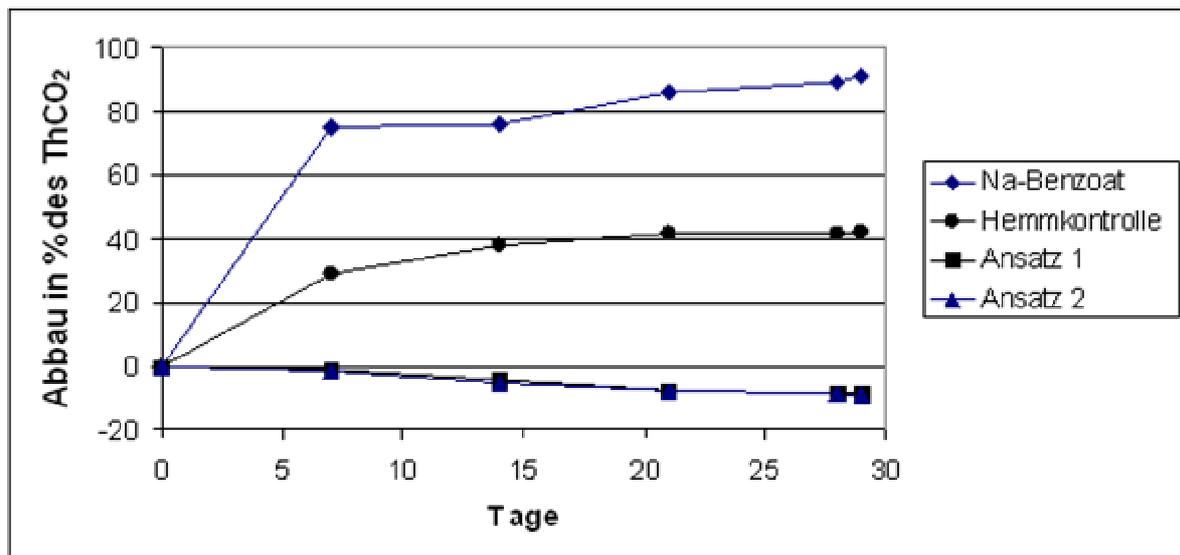


Abb. 23: Abbaubarkeit von Gentamycin im Kombinationstest (200 mg TS/l)

Tab. 57: Inhärente Abbaubarkeit im Kombinationstest ¹⁾

Substanz	Endab- baubarkeit 28 d [%]	Hemm- Kontrolle 14 d [%]	DOC- Elimination 3 h [%]	DOC- Elimination 28 d [%]	Bemerkungen ²⁾
Amoxicillin	63,4 13,1	42,9	19,8 24,3	90,0 39,2	Längere lag-Phase, 10 d Fenster nicht eingehalten, Abweichung in Parallelansätzen, Bestätigung im Screeningtest
Benzylpenicillin	87,7 90,8	70,4	13,4 11,9	100,5 102,7	Bestätigung im Screeningtest
Ceftriaxon	5,3 3,3	50,8	-10,0 9,1	11,8 4,8	Keine Hemmung, Bestätigung im Screeningtest
Cefuroxim	10,3		11	24	Screeningtest nur 1 Ansatz
Chlortetracyclin	-31,3		49	52	Screeningtest nur 1 Ansatz
Clindamycin	-4,4		7	12	Screeningtest nur 1 Ansatz
Erythromycin	-5,3 -6,1	36,4	18,5 28,7	32,9 28,2	Hemmwirkung nicht ausgeschlossen, Bestätigung im Screeningtest
Gentamycin	-8,9 -9,2	37,7	51,1 51,7	51,9 54,0	Hemmwirkung nicht ausgeschlossen, Bestätigung im Screeningtest
Imipenem	25,1 22,1	50,6	-5,2 3,5	27,3 31,0	Bestätigung im Screeningtest
Metronidazol	6,6 3,6	48,5	8,3 10,7	1,4 3,0	Bestätigung im Screeningtest
Monensin	-12,9		77	87	Screeningtest nur 1 Ansatz
Nystatin	5,3 20,3	43,9	101,9 100,4	27,1 67,9	Hydrolytische Spaltung verringert Adsorptionsanteil, Bestätigung im Screeningtest
Ofloxacin	-18,9		37	41	Screeningtest nur 1 Ansatz
Sulfamethoxazol	-10,4		7	13	Screeningtest nur 1 Ansatz
Tetracyclin	-5,1 -9,5	33,9	15,3 11,4	83,9 83,7	Hemmwirkung nicht ausgeschlossen, DOC-Elimination täuscht Abbau vor der über CO ₂ -Messungen nicht bestätigt wird, Bestätigung im Screeningtest
Trimethoprim	-11,1		23	16	Screeningtest nur 1 Ansatz
Vancomycin	-4,0 8,9	37,3	9,8 7,0	13,7 21,5	Hemmwirkung nicht ausgeschlossen

¹⁾ Datenpaare beziehen sich auf die Parallelansätze in den Haupttests

²⁾ Hemmwirkung definiert als Abbau ThCO₂ in Hemmkontrollen nach 14 d < 40%

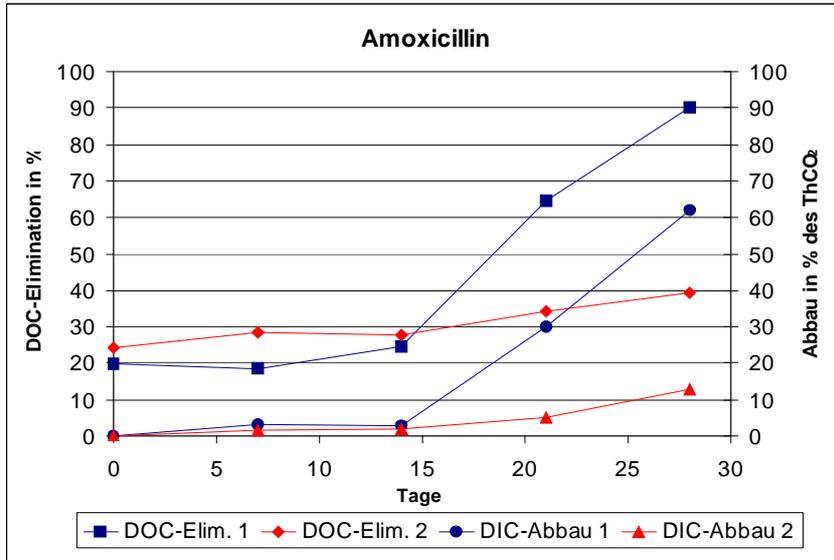


Abb. 24: DOC-Elimination und Endabbaubarkeit im Kombinationstest (200 mg TS/l)

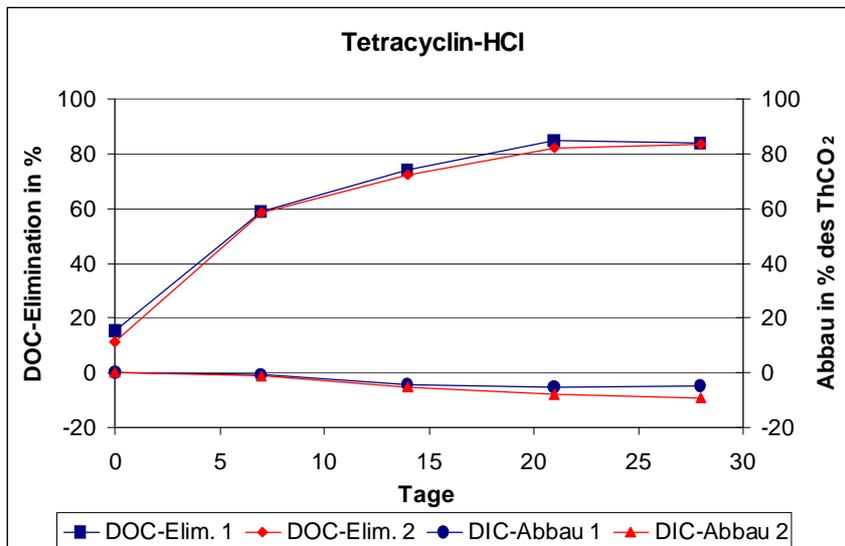


Abb. 25: DOC-Elimination und Endabbaubarkeit im Kombinationstest (200 mg TS/l)

Die hohe DOC-Elimination von Nystatin zu Versuchsbeginn kann durch die schlechte Wasserlöslichkeit und demzufolge starke Adsorption an den Belebtschlamm erklärt werden (s. Tab. 57 und Abb. 26). Die auch im Screeningversuch beobachtete Abnahme der DOC-Elimination weist auf eine hydrolytische Spaltung und dadurch bedingte bessere Wasserlöslichkeit hin. Der Wiederanstieg der DOC-Elimination im Ansatz 2 mit Nystatin geht mit einer beginnenden Endabbaubarkeit zu CO₂ einher.

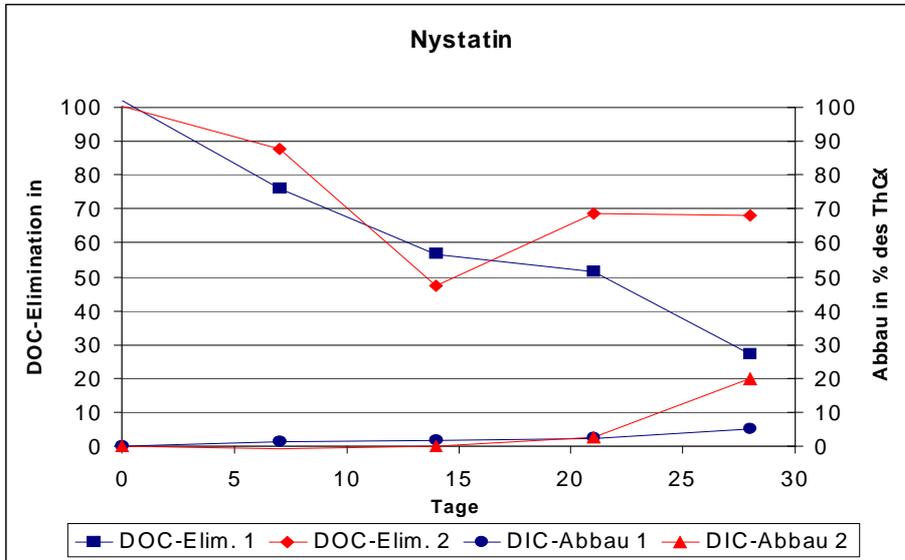


Abb. 26: DOC-Elimination und Endabbaubarkeit im Kombinationstest (200 mg TS/l)

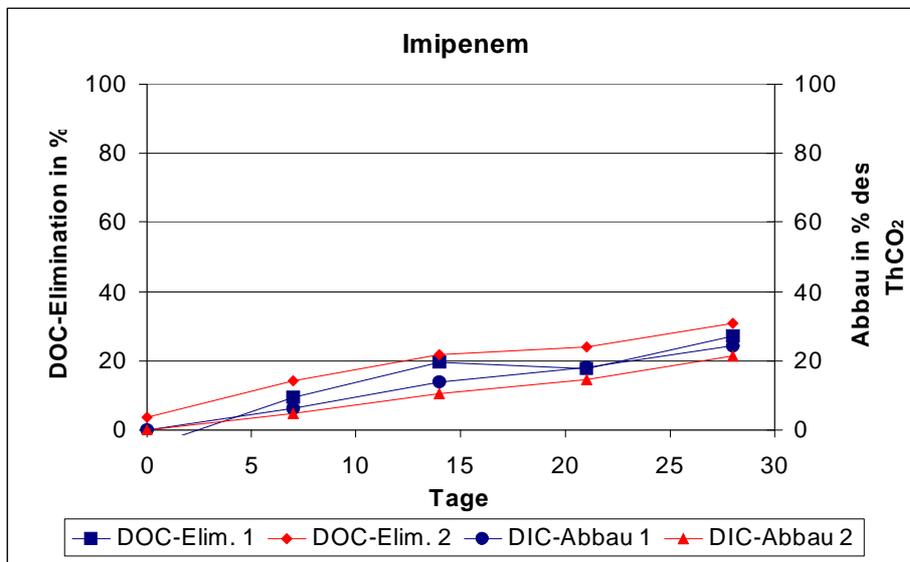


Abb. 27: DOC-Elimination und Endabbaubarkeit im Kombinationstest (200 mg TS/l)

Tetracyclin-HCl zeigte im Kombinationstest eine für Abbauprozesse typische DOC-Eliminationskurve, die jedoch nicht durch die CO₂-Entwicklung erklärt werden konnte (s. Tab. 57 und Abb. 25). Diese Substanz würde bei alleiniger Betrachtung der DOC-Elimination fälschlicherweise als biologisch abbaubar eingestuft werden. Die DOC-Elimination muss hier durch eine langsame Adsorption an den Belebtschlamm interpretiert werden, die durch den "Dreistundenwert" des Zahn-Wellens-Tests unzureichend beschrieben wird.

Bei der sowohl im Screeningversuch als auch in den Haupttests untersuchten Antibiotika ergab sich eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. In allen Versuchen wurde die Referenzsubstanz Natriumbenzoat zu mindestens 90% des TOC

bzw. des ThCO₂ abgebaut. Die CO₂-Entwicklung in den Kontrollansätzen erreichte 91 mg/l bis 194 mg/l nach 28 Tagen, das heißt, die Blindwerte lagen bei 25 bis 53% des ThCO₂ der eingesetzten Antibiotika. Es sei darauf hingewiesen, dass in der Standardversion des Zahn-Wellens-Tests bei einer Inokulumkonzentration von 200 mg/l eine Substratkonzentration von 50 mg TOC/l angestrebt wird. Diese Testversion wird u. a. von der EMPA (CH-St. Gallen) durchgeführt, allerdings bedingt die niedrigere Substratkonzentration, dass von den CO₂-Messwerten etwa 2/3 auf die Blindwerte zurückzuführen und abzuziehen sind.

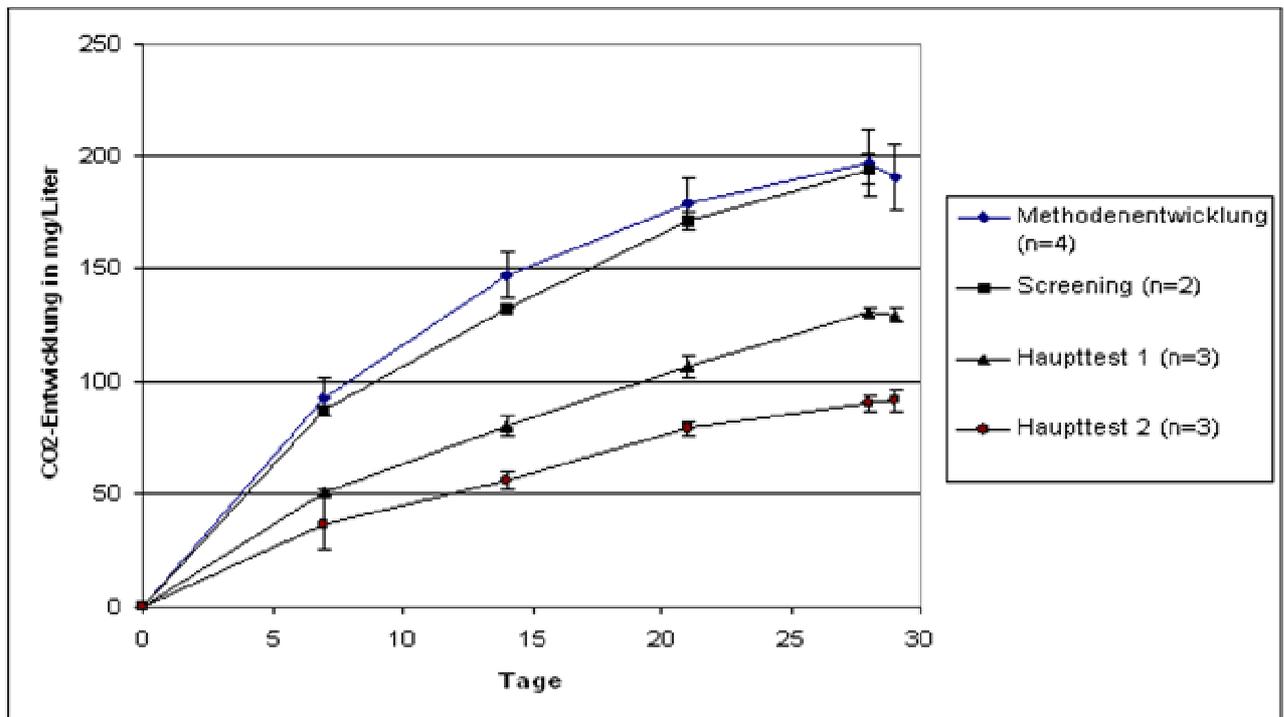


Abb. 28: CO₂-Freisetzung Blindwertansätze (Kombinationstest mit 200 mg TS/l)

Die Fehler bei der Differenzbildung werden so insgesamt größer. Die Auswertung der Blindwerte in den vier durchgeführten Versuchen zeigt jedoch auch, dass die Streuung der CO₂-Entwicklung in den Blindwerten sehr gering ist und zudem Werte unter 100 mg CO₂/l erreichbar sind (vgl. Abb. 28). Von daher könnte in künftigen Versuchen doch eine geringere Substratkonzentration bzw. ein größerer prozentualer Anteil der Blindwerte an den Messwerten in den Testansätzen akzeptabel sein.

Im Closed Bottle Test wurden einige Antibiotika unter vergleichbaren Versuchsbedingungen (jedoch ohne CO₂-Erfassung) im umweltnahen Konzentrationsbereich untersucht und die Abnahme der Konzentration chemisch-analytisch bestimmt.

3.3.2.2 KOMBINATIONSTEST BEI NIEDRIGEN ANTIBIOTIKAKONZENTRATIONENErgebnisse für die DOC-Bestimmung

Die DOC-Analytik wurde nur für die Referenzansätze sowie für die Hemmkontrollen durchgeführt, da aufgrund der niedrigen Konzentration der Testsubstanz die Messempfindlichkeit der DOC-Bestimmung nicht ausreicht, um den Abbau der einzelnen Wirkstoffe auf diese Weise zu verfolgen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 58-59 dargestellt.

Tab. 58: Inhärenter Abbau im Niedrigkonzentrationsbereich (Versuch 1)

DOC-Messwerte in den Hemmkontrollen in mg/l ^{*)}		
	3 h	7 d
Clindamycin	96,4	6,2
Erythromycin	93,4	4,7
Sulfamethoxazol	95,1	4,5
Trimetroprim	94,4	3,2
Referenzansatz 1	94,3	5,0
Referenzansatz 2	92,8	4,1
Blindwert 1	3,9	3,1
Blindwert 2	1,0	2,9

^{*)} Eingestellte Ausgangskonz. 100 mg TOC/l

DOC-Elimination in %		
	3 h	7 d
Clindamycin	6,1	96,8
Erythromycin	9,1	98,3
Sulfamethoxazol	7,4	98,5
Trimetroprim	8,1	99,8
Referenzansatz 1	8,2	98,0
Referenzansatz 2	9,7	98,9

Die DOC-Elimination in den Referenzansätzen und Hemmkontrollen mit je 100 mg/l C aus Natriumbenzoat lag nach 7 Tagen jeweils über 75% und belegt, dass der Belebtschlamm aktiv war. Es ist demnach erwartungsgemäß von keiner Hemmwirkung der Antibiotika im Niedrigkonzentrationsbereich auszugehen.

Ergebnisse der substanzspezifischen Analytik in der Wasserphase

Die Ergebnisse für die Wasserphase sind in Tabelle 60 und in Abbildung 29 wiedergegeben. Wie auch beim anaeroben Abbautest zeigen alle untersuchten Wirkstoffe im niedrigen Konzentrationsbereich mindestens eine partielle Eliminierung.

Tab. 59: Inhärenter Abbau im Niedrigkonzentrationsbereich (Versuch 2)

DOC-Messwerte in den Hemmkontrollen in mg/l ^{*)}

	3 h	7 d
Amoxicillin	115,4	63,8
Cefuroxim	99,8	57,0
Chlortetracyclin	109,7	63,3
Ofloxacin	102,2	63,8
Tetracyclin	111,2	37,0
Referenzansatz 1	109,4	49,3
Referenzansatz 2	100,8	30,6
Blindwert 1	14,6	29,8
Blindwert 2	11,4	49,5

^{*)} Eingestellte Ausgangskonz. 100 mg TOC/l

DOC-Elimination in %

	3 h	7 d
Amoxicillin	-2,4	75,8
Cefuroxim	13,3	82,6
Chlortetracyclin	3,3	76,3
Ofloxacin	10,8	75,9
Tetracyclin	1,8	>100
Referenzansatz 1	3,6	90,3
Referenzansatz 2	12,2	>100

Die β -Lactam-Antibiotika Amoxicillin und Cefuroxim sowie die zur Stoffklasse der Tetracycline gehörenden Wirkstoffe Tetracyclin und Chlortetracyclin werden auch in den abiotischen Ansätzen vollständig eliminiert. Auch die übrigen getesteten Wirkstoffe wurden in den abiotischen Kontrollen teilweise oder vollständig eliminiert. Dies bedeutet, dass der beobachtete Abbau aller Testsubstanzen zu einem großen Anteil auf abiotischem Weg erfolgt.

Bei dieser Testserie lag die experimentell ermittelte Ausgangskonzentration in allen Versuchsansätzen unter der theoretischen Ausgangskonzentration von 3,5 $\mu\text{g/l}$. Da die Ausgangskonzentrationen bei den Tests zum anaeroben Abbau analog eingestellt wurden (frische Standards, Vorlage im Testgefäß, Abdampfen des Lösungsmittels und Aufnahme im Testwasser) und dort die Sollwerte analytisch wiedergefunden wurden, ist dieser Befund nicht ohne weiteres erklärbar. Wie sich gezeigt hatte, war bei der Herstellung der Ansätze für den anaeroben Abbauteil wahrscheinlich das Lösungsmittel Methanol nicht vollständig abgedampft worden, womit sich auch die negativen Werte für die Hemmkontrollen erklären ließen. Dieser geringe Rückstand

an Methanol hat im anaeroben Abbaustest möglicherweise auch einer weitergehenden Adsorption der Testsubstanzen entgegengewirkt. Zur Ermittlung der Abbauraten im modifizierten Sturm-Test (Tabelle 60) wurden die gemessenen Konzentrationen daher auf die jeweilige experimentell ermittelte Ausgangskonzentration bezogen.

Tab. 60: Ergebnisse der Analyse der wässrigen Phase in den Testansätzen am Versuchende der modifizierten Sturmtests mit 9 ausgewählten Antibiotika-Wirkstoffen im niedrigen Konzentrationsbereich (Ausgangskonzentration: 3,5 µg/l)

Wirkstoff	Elimination in der Wasserphase in %*		Bemerkungen
	Abbaustest (n = 2)	Abiotische Kontrolle (n = 1)	
Amoxicillin	100	100	Nur noch in einer Parallele des Ansatztages eine Spur von 0,18 µg/l nachgewiesen Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Cefuroxim	100	100	In der abiotischen Kontrolle nach 28 Tagen noch Spur unter 0,1% nachweisbar Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Chlortetracyclin	100	100	Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Clindamycin	81	27	weitgehende Eliminierung nach 28 Tagen teilweise Eliminierung durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Erythromycin A (quant. als Dehydrato-Erythromycin A)	90	89	nahezu vollständige Eliminierung nach 28 Tagen Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Ofloxacin	31	11	unvollständige Eliminierung nach 28 Tagen Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Sulfamethoxazol	56	58	unvollständige Eliminierung nach 28 Tagen Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Tetracyclin	100	100	bereits nach 3 h nicht mehr nachweisbar Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Trimethoprim	100	100	vollständige Eliminierung nach 28 Tagen

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

			Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
--	--	--	---

* bezogen auf die experimentell ermittelte Ausgangskonzentration, ermittelt aus der Regressionsrechnung zum exponentiellen Abbau

Abb. 29: Konzentrationsverlauf von Cefuroxim, Clindamycin, Erythromycin (quantifiziert als Dehydrato-Erythromycin A), Ofloxacin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim in der wässrigen Phase der Testreihen nach dem modifizierten Sturm-Test

Ergebnisse der substanzspezifischen Analytik für den Belebtschlamm

Mit dem gleichen Extraktionsverfahren wie beim anaeroben Abbautest wurden auch von den Testansätzen des modifizierten Sturm-Tests ausgewählte Belebtschlammproben auf den Gehalt der adsorbierten Antibiotika analysiert. Aus den Ansätzen der Wirkstoffe, die über die Versuchsdauer eine Abbaukurve zeigten, wurden mit Ausnahme des Cefuroxim-Ansatzes alle Schlammproben untersucht. Für Ansätze, bei denen der Wirkstoff zu keinem Zeitpunkt mehr in der Wasserphase nachweisbar war, z. B. für die Tetracycline, wurde der Schlamm einer relativ früh entnommenen Probe untersucht. Bei diesen früh entnommenen Proben sollten einerseits Adsorptions- und Rücklösevorgänge bereits vorangeschritten und andererseits Abbauvorgänge noch nicht vollständig sein.

Bei der eingesetzten Belebtschlammkonzentration von 200 mg/l TS lag die theoretische Absolutmenge an isolierbarer Trockensubstanz aus einem zur Analyse verwendeten 50 ml-Aliquot einer Einzelprobe bei lediglich 10 mg. Die tatsächlich isolierten Trockensubstanzmengen in den Einzelansätzen schwankten zwischen ca. 5 und 15 mg, was von der Schwierigkeit der homogenen Teilprobenentnahme aus dem Versuchsansatz herrühren dürfte.

Aufgrund dieser sehr kleinen Feststoffprobenmenge lagen die gemessenen Antibiotikaspuren unter der analytischen Bestimmungsgrenze (z. B. BG = 10 µg/kg bei 500 mg Schlamm, d. h. BG = 1000 µg/kg bei 5 mg Schlamm). Geringe Rückstände wurden in den Ansätzen von Trimethoprim, Erythromycin, Sulfamethoxazol und Clindamycin gefunden, die sich jedoch auch durch anhaftendes Versuchswasser erklären lassen, welches nach der Zentrifugation der Proben mit dem Rückstand in die Gefriertrocknung überführt wurde. Diese Werte werden daher nicht wiedergegeben.

Nur von Ofloxacin wurden Rückstände im mg/kg-Bereich in allen Ansätzen ermittelt. Anhand der Ausgangssollkonzentration von 3,5 µg/l und dem Inokulumgehalt von 200 mg/l TS errechnet sich eine maximale Konzentration von Ofloxacin von 17,5 mg/kg bei vollständiger Adsorption am Belebtschlamm. Der Mittelwert aus allen Testproben einschließlich der abiotischen Kontrollen lag bei 3,6 mg/kg, der höchste Wert bei 11 mg/kg in der abiotischen Kontrolle nach 28 Tagen. Allerdings schwankten die Einzelwerte sehr stark, was darauf zurückzuführen ist, dass das Extraktionsverfahren bei diesen kleinen Feststoffmengen nicht mehr reproduzierbar anwendbar ist. Dennoch zeigt die Größenordnung der ermittelten Werte, dass die Adsorption an

Belebtschlamm einen wichtigen Eliminationsmechanismus für Ofloxacin aus Abwasser darstellt.

3.3.3 Anaerobe Abbaubarkeit

3.3.3.1 ANAEROBE ABBAUBARKEIT BEI HOHEN ANTIBIOTIKAKONZENTRATIONEN

Insgesamt wurden drei Versuche zur Bestimmung der anaeroben Abbaubarkeit von Antibiotika nach EN ISO 11734 mit insgesamt 9 Antibiotika angesetzt, die zusammenfassenden Ergebnisse sind in Tabelle 61 und den Abbildungen 30-32 wiedergegeben.

Innerhalb des Versuchszeitraumes von rd. 60 Tagen wurde keines der untersuchten Antibiotika anaerob nennenswert abgebaut. Lediglich Benzylpenicillin zeigte nach einer lag-Phase von 40 Tagen eine gewisse Abbaubarkeit, die jedoch in ein Plateau von rd. 20% Abbau mündete (Abb. 30).

Mit Ausnahme von Sulfamethoxazol und Nystatin (Abb. 30 und 32) zeigen alle Antibiotika eine deutliche Hemmwirkung auf das Inokulum, so dass in den Hemmkontrollen von Chlortetracyclin und Monensin negative Abbauraten bestimmt wurden. Auch in den Hemmkontrollen von Amoxicillin und Benzylpenicillin (Abb. 30) fand der Abbau erst nach einer deutlichen lag-Phase von rd. 40 Tagen statt, so dass eine Hemmwirkung für die Anfangsphase nicht ausgeschlossen werden kann. Die Referenzsubstanz Natriumbenzoat wurde in allen Versuchen zu über 80%, bezogen auf das Faulgasvolumen und zu über 90% bezogen auf die DOC-Elimination abgebaut.

Für die zusätzlichen, mit Kupfersulfat vergifteten Adsorptionskontrollen wurde erwartungsgemäß mit Ausnahme von Benzylpenicillin kein signifikanter Endabbau anhand der Faulgasproduktion beobachtet und plausible DOC-Eliminationen von 0% (Vancomycin) bis 58% (Gentamycin) bestimmt. Die Adsorptionskontrolle von Benzylpenicillin erreichte rechnerisch einen Endabbau von deutlich über 100% des eingesetzten Kohlenstoffs. Dies wird als Ausreißer gewertet.

Die DOC-Werte bestätigen im Wesentlichen die Faulgasmessungen: Die Testansätze und Adsorptionskontrollen von Nystatin, Gentamycin und Monensin zeigen, bedingt durch Adsorptionseffekte, eine DOC-Elimination über 50%. Demgegenüber werden Ofloxacin bzw. Chlortetracyclin zu lediglich 10-40% eliminiert, während für Vancomycin praktisch keine Elimination beobachtet wurde. Insgesamt ergeben sich durch die zusätzlichen, in der Norm nicht vorgesehenen DOC-Bestimmungen plausible Werte, mit denen die Ergebnisse gestützt werden.

Tab. 61: Anaerobe Abbaubarkeit von Antibiotika in Anlehnung an EN ISO 11734

Substanz	Endabbau Faulgas [%]	Endabbau inkl. IC [%]	DOC-Elimi- nation [%]	Bemerkungen
Amoxicillin	6	- 2	21	In Hemmkontrolle deutlich längere lag-Phase (40 d)
Benzylpenicillin (Penicillin G)	19	19	50	In Hemmkontrolle deutlich längere lag-Phase (40 d)
Chlortetracyclin	-23	-34	27	Hemmung in Hemmkontrolle
Gentamycin	-6	-8	61	Hemmung in Hemmkontrolle
Monensin	-42	-54	60	Hemmung in Hemmkontrolle
Nystatin	5	6	54	Keine Hemmung
Ofloxacin	-5	-8	16	Hemmung in Hemmkontrolle
Sulfamethoxazol	2	-2	-2	Hemmkontrolle nicht auffallend
Vancomycin	-10	-13	-3	Hemmung in Hemmkontrolle

Es zeigte sich, dass bei einigen Antibiotika deutliche Effekte in den Hemmkontrollen zu beobachten waren, die teilweise (Amoxicillin, Benzylpenicillin) nicht in den anaeroben Hemmtests vorhergesagt wurden. Für Chlortetracyclin, Gentamycin, Monensin und Ofloxacin lagen die EC_{50} Werte im anaeroben Hemmtest zwischen 39% und 88%, so dass eine Hemmwirkung erwartet werden konnte. Es war jedoch vermutet worden, dass sich diese eher in einer Verzögerung, nicht jedoch in einer vollständigen Unterdrückung des anaeroben Abbaus bemerkbar macht.

Somit kann die anaerobe Abbaubarkeit lediglich für Nystatin und Sulfamethoxazol, die keine Hemmwirkung - allerdings auch keinen anaeroben Abbau - zeigten, vorausgesagt werden. Eine Möglichkeit bestünde darin, die Prüfkonzentration deutlich herabzusetzen. Allerdings sind dem durch die Blindwerte enge Grenzen gesetzt. Die kumulierten Druckmessungen der Blindwertansätze lagen für die drei Versuche zwischen 29% und 35% der in den Referenzansätzen bestimmten Werte, für die IC-Messungen betrug die Blindwerte sogar 44% bis 62% derjenigen der Referenzansätze.

Im Closed Bottle Test wurden einige Antibiotika daher unter identischen Versuchsbedingungen im umweltnahen Konzentrationsbereich untersucht und die Abnahme der Konzentration chemisch-analytisch bestimmt.

Die Frage, warum die Hemmkontrollen im anaeroben Abbautest eine größere Empfindlichkeit zeigten als die Ergebnisse im anaeroben Hemmtest erwarten ließen, kann nicht abschließend beantwortet werden. Der wichtigste Unterschied besteht darin, dass im anaeroben Hemmtest ein Kohlenstoffgemisch in wesentlich höherer Konzentration (2,5 g/l Hefeextrakt) als Substrat eingesetzt wurde, das ohne Verzögerung sofort zu einer Faulgasproduktion führte, während die Referenzsubstanz Natriumbenzoat im anaeroben Abbautest in niedriger Konzentration (100 mg C/l) eingesetzt und erst nach einer lag-Phase von 8 bis 15 Tagen abgebaut wurde. Hinzu kommt, dass der Faulschlamm im anaeroben Hemmtest nicht gewaschen wurde und dadurch möglicherweise potenter war als im anaeroben Abbautest, bei dem zur IC-Reduzierung ein Waschen des Schlammes erforderlich ist (Gartiser 1998). Ein weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Inkubationszeit im anaeroben Abbautest (rd. 60 Tage) weit länger als im anaeroben Hemmtest. Da in letzterem teilweise eine deutliche Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Inkubationsdauer beobachtet wurde könnte diese beim anaeroben Hemmtest, mit der beobachteten lag-Phase des anaeroben Abbaus von Natriumbenzoat, noch deutlicher zum Vorschein kommen.

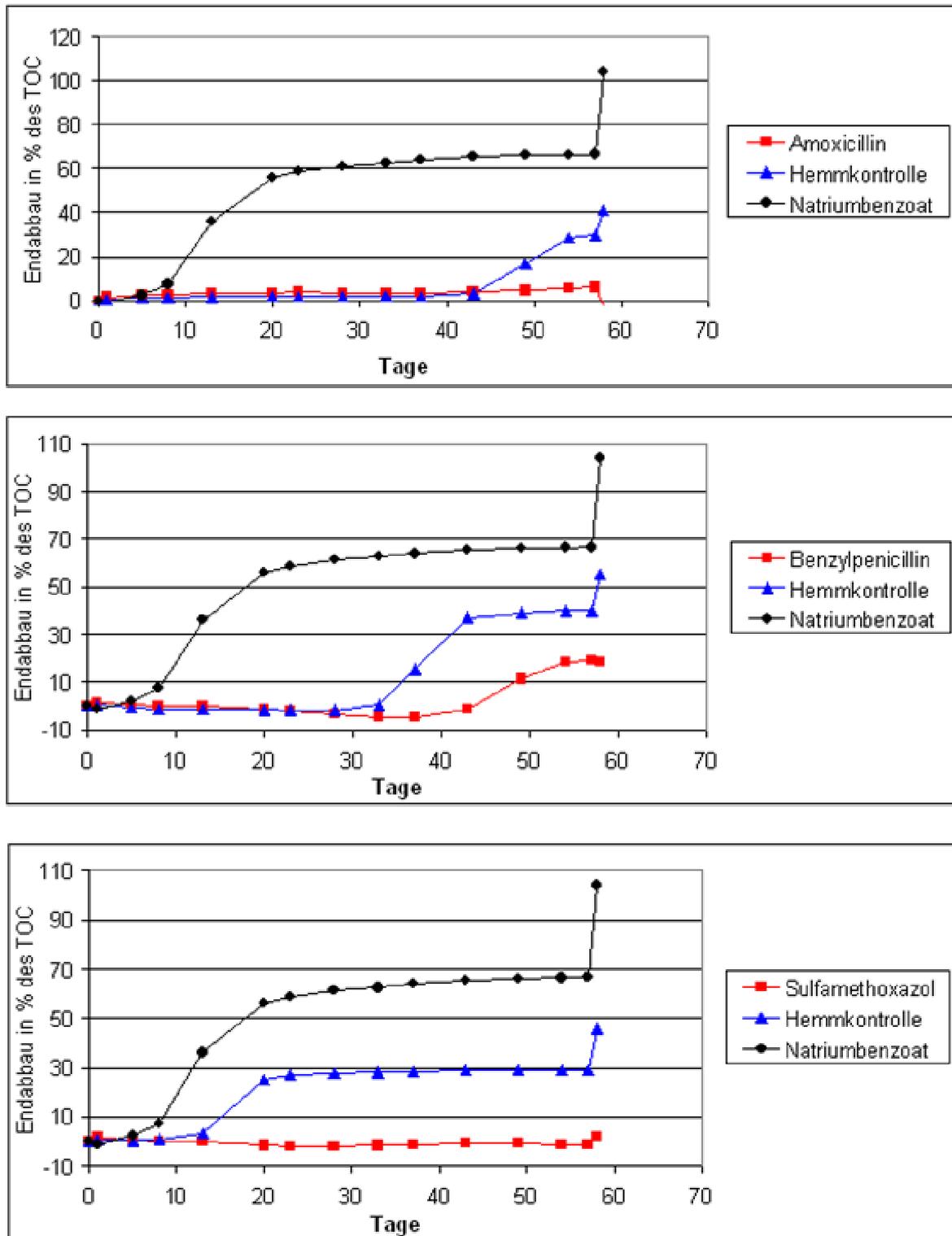


Abb. 30: Anaerober Abbau von Amoxicillin, Benzylpenicillin und Sulfamethoxazol

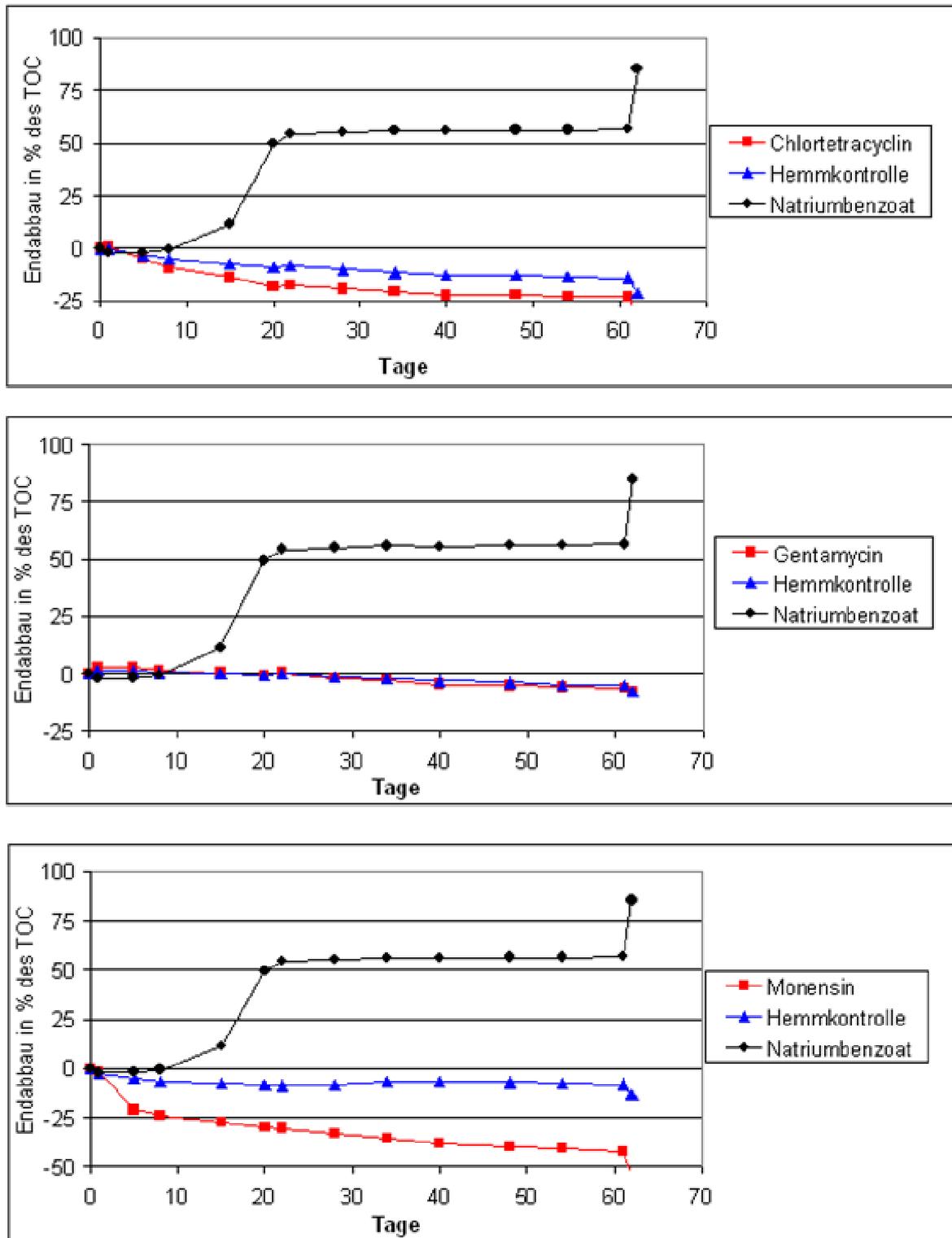


Abb. 31: Anaerober Abbau von Chlortetracyclin, Gentamycin und Monensin

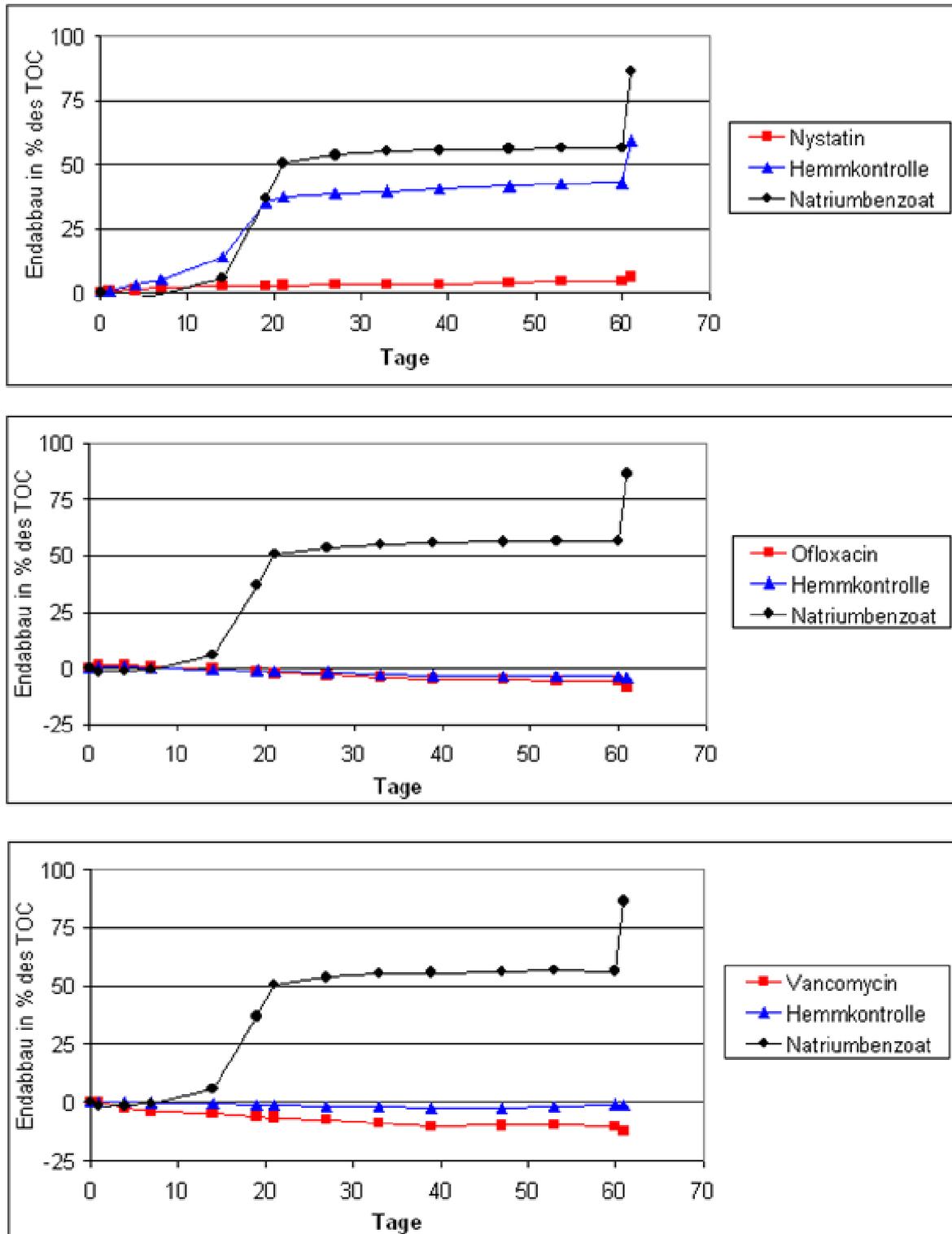


Abb. 32: Anaerober Abbau von Nystatin, Ofloxacin und Vancomycin

3.3.3.2 ANAEROBE ABBAUBARKEIT BEI NIEDRIGEN ANTIBIOTIKAKONZENTRATIONEN

Ergebnisse der Faulgasmessungen

Die Ergebnisse der Faulgasmessungen sind in den Tabellen 62 und 63 protokolliert. Es zeigte sich, dass in den Hemmkontrollen (Referenzsubstanz + 3,5 µg/l Antibiotika)

der Antibiotika mit Ausnahme von Benzylpenicillin Abbauraten über 100% bestimmt wurden, die darauf hinweisen, dass das Lösungsmittel Methanol im vorgesehenen Zeitraum nicht vollständig abdampfte. Für Benzylpenicillin mit dem Lösungsmittel Aceton erreichten die Hemmkontrollen hingegen vergleichbare Werte wie die Referenzansätze mit Natriumbenzoat (im Mittel 48% bzw. 53%).

Auf DIC-Messungen zur Bestimmung des in der wässrigen Phase gelösten anorganischen Kohlenstoffs nach Versuchsende wurde verzichtet, da es hier eher um einen Kurvenvergleich in den ersten Versuchswochen ging. Der mit der Faulgasentwicklung zu erklärende Abbau der Referenzsubstanz von etwa 50% liegt im üblichen Rahmen (vgl. Tabelle 62 und 63).

Demnach wurde im Konzentrationsbereich von 3,5 µg/l erwartungsgemäß keine Hemmwirkung der Antibiotika auf die Anaerobier beobachtet.

Die vermuteten Reste nicht abgedampften Methanols (in der Größenordnung von 5-15 mg/l C) wurden problemlos abgebaut und haben keinen Einfluss auf das Gesamtergebnis mit der substanzspezifischen Analytik.

Tab. 62: Anaerober Abbau [%] von Natriumbenzoat in den Hemmkontrollen (Versuch vom 23.01.02)

Flasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Clindamycin		Clarithromycin		Erythrocin		Trimethoprim		Metronidazol		Referenz		
	Hemm	Hemm	Hemm	Hemm	Hemm	Hemm	Hemm	Hemm	Hemm	Hemm			
Einwaage Prüfgegenstand [µg/l]	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5			
Einwaage Referenzsubstanz [TOC g/l]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TOC [mg/80ml]	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Tage													
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	-3	-10	-8	-3	-13	-9	-11	-8	-7	-10	-8	-4	-12
5	5	0	5	6	-6	0	-3	1	3	1	-3	1	-9
8	45	54	41	55	39	59	66	57	41	106	2	5	-3
9	120	67	50	75	52	73	82	75	50	114	5	7	0
12	137	82	60	87	64	88	99	92	62	127	17	12	14
14	142	185	76	94	77	97	108	100	73	141	39	19	32
16	146	192	96	102	90	104	113	106	88	158	42	29	34
20	161	221	107	136	97	137	134	125	106	164	44	52	36
22	180	225	107	141	98	142	148	140	108	165	45	53	36
27	197	229	111	146	101	145	154	148	112	168	46	54	37
30	199	230	111	147	101	146	154	149	112	169	46	55	37
48	203	233	116	150	103	148	157	152	115	171	48	57	39

Tab. 63: Anaerober Abbau [%] von Natriumbenzoat in den Hemmkontrollen (Versuch vom 31.01.02)

Flasche	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
	Penicillin G				Cefuroxim				Chlortetracyclin				Tetracyclin				Referenz					
	Hemm		Hemm		Hemm		Hemm		Hemm		Hemm		Hemm		Hemm		Hemm		Hemm		Hemm	
Einwaage Prüfgegenstand [$\mu\text{g/l}$]	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Einwaage Referenzsubstanz [TOC g/l]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TOC [mg/80ml]	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Tage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	-1	-6	-6	-5	-11	-12	-10	-9	-10	-2	-9	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4
4	5	-1	16	17	-8	-9	-6	-4	-4	2	11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
6	10	5	64	51	38	35	42	43	2	11	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
8	19	15	88	71	145	139	95	89	12	18	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
12	55	50	131	115	169	162	115	108	40	54	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
14	63	54	143	123	181	172	132	123	41	62	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
19	66	56	149	126	216	206	155	149	47	65	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44
40	67	59	150	127	221	211	158	151	48	65	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45	45

Ergebnisse der substanzspezifischen Analytik für die Wasserphase

Die Ergebnisse der anaeroben Abbaute tests im niedrigen Konzentrationsbereich sind zusammenfassend in Tabelle 64 wiedergegeben. Nur die Wirkstoffe Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin und Trimethoprim waren bis zum Versuchsende nach 49 Tagen noch nicht vollständig abgebaut. Die Abbaukurven von Clarithromycin, Clindamycin und Trimethoprim sind in Abbildung 33 dargestellt.

Die Clarithromycin-Konzentration sank im Verlauf des Versuchs auf 47% des Ausgangswertes ab, die Clindamycin-Konzentration auf 28% und die Trimethoprimkonzentration auf 7%.

Die Versuchsansätze mit Erythromycin A als Ausgangsverbindung zeigen kein einheitliches Abbaumuster. Über das rasch gebildete als Dehydrato-Erythromycin A quantifizierte Erythromycin A konnte in den Versuchsansätzen nach 0 und 3 h im Rahmen der Fehlerbreite der Bestimmung der Ausgangswert von $3,5 \mu\text{g/l}$ bestätigt werden. Die im Einzelnen hier nicht wiedergegebenen Werte der Probenahmen zu unterschiedlichen späteren Zeitpunkten streuten stark, was mit Sicherheit damit zusammenhängt, dass in den individuellen Versuchsansätzen die Umsetzung des Erythromycins A unter Wasserabspaltung unterschiedlich weit vorangeschritten ist. Quantifiziert man - wie hier geschehen - mithilfe einer Kalibrierfunktion, die mit Kalibrierproben eines bekannten Gehaltes an unzersetztem Erythromycin A erstellt wurde, so ist eine korrekte Auswertung nur möglich, wenn in den Kalibrierproben und den individuellen Versuchsansätzen die Wasserabspaltung jeweils bis zum gleichen Umsatz vorangeschritten ist bzw. wenn diese

Wasserabspaltung bei der Probenvorbereitung quantitativ verläuft. Beides ist offensichtlich nicht der Fall, sodass aus dem aneoroben Abbaueversuch mit Erythromycin A nur gefolgert werden kann, dass diese Substanz auch nach 49 Tagen noch nachweisbar ist.

Tab. 64: Ergebnisse der Analyse der wässrigen Phase am Versuchsende der anaeroben Abbaueversuche von 9 ausgewählten Antibiotika-Wirkstoffen im niedrigen Konzentrationsbereich (Ausgangskonzentration: 3,5 µg/l)

Wirkstoff	Elimination in der Wasserphase in %*			Bemerkungen
	Abbaueversuch (n = 2)	Abiotische Kontrolle (n = 1)	Hemmkontrolle (n = 2)	
Benzylpenicillin	100	100	100	bis zum 7. Tag noch Spur unterhalb der Bestimmungsgrenze (0,25 µg/l) nachweisbar; Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Cefuroxim	100	100	100	Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Chlortetracyclin	100	100	100	Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Clarithromycin	53	21	30	unvollständiger Abbau nach 49 Tagen; Anteil an abiotischem Abbau oder Adsorption
Clindamycin	72	50	56	unvollständiger Abbau nach 49 Tagen; Anteil an abiotischem Abbau oder Adsorption
Erythromycin A (quant. als Dehydrato-Erythromycin A)	-	-	-	keine quantitative Aussage möglich, da Konzentrationsverhältnis Erythromycin A/ Dehydrato-Erythromycin A von Ansatz zu Ansatz stark schwankt; unvollständiger Abbau nach 49 Tagen
Metronidazol	100	100	100	nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar; Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Tetracyclin	100	100	100	Eliminierung allein durch abiotischen Abbau oder Adsorption
Trimethoprim	93	70	100	nahezu vollständiger Abbau nach 49 Tagen; überwiegender Anteil an abiotischem Abbau oder Adsorption

* bezogen auf den Sollwert der Ausgangskonzentration von 3,5 µg/l, ermittelt aus der Regressionsrechnung zum exponentiellen Abbau (sofern eine Abbaukurve beobachtet werden konnte)

Metronidazol war bereits nach sieben Versuchstagen nicht mehr nachweisbar. Selbst in den Versuchsansätzen, die direkt nach dem Ansetzen stabilisiert wurden, traten Metronidazol-Verluste bis zu etwa zwei Dritteln des Ausgangswerts auf.

Benzylpenicillin war bis zum siebten Versuchstag noch in Spuren unter der Bestimmungsgrenze in der Wasserphase nachzuweisen. Der höchste Wert von 0,18 µg/l bzw. 5% des Ausgangswertes von 3,5 µg/l wurde in einer Probe nach einer Versuchsdauer von 3 h gemessen. In den Proben nach dem siebten Versuchstag wurde kein Benzylpenicillin mehr wieder gefunden. Cefuroxim, Tetracyclin und Chlortetracyclin waren schon in den Ansatzproben nicht mehr analytisch nachweisbar.

Die Tatsache, dass für alle quantitativ bestimmten Testsubstanzen auch in der abiotischen Kontrolle eine teilweise oder vollständige Eliminierung beobachtet wurde, spricht für einen abiotischen Abbau oder eine Eliminierung durch Adsorption am zugegebenen Faulschlamm. Für die hydrolyseempfindlichen β -Lactam-Antibiotika ist der abiotische Abbau ebenso wahrscheinlich wie für die lichtempfindlichen Tetracycline und das fotolabile Metronidazol. Ob im einen oder anderen Fall eine Adsorption am Faulschlamm stattgefunden hat, wurde anhand von Schlammanalysen überprüft.

Abb. 33: Konzentrationsverlauf von Clarithromycin, Clindamycin und Trimethoprim in der wässrigen Phase des anaeroben Abbautes

Ergebnisse der substanzspezifischen Analytik für den Faulschlamm

Um zu ermitteln, ob die Adsorption der getesteten Antibiotika-Wirkstoffe am Faulschlamm eine Rolle hinsichtlich der Eliminierung der Testsubstanzen im anaeroben Abbautes spielt, wurden die Faulschlammrückstände aus den Versuchsansätzen durch Zentrifugation entfernt, anschließend gefriergetrocknet und mittels der in

3.2.4.1 beschriebenen Extraktionsmethode extrahiert. Die Einzelwerte der aus den Faulschlammproben extrahierten Antibiotikagehalte sind in der Anlagendatei TZW 5.1 zusammengestellt.

Die getrockneten Rückstände aus den Versuchsansätzen wurden jeweils vollständig für eine Schlammextraktion verbraucht. Die isolierte Trockenmasse je Ansatz variierte zwischen 27 und 123 mg. Bei dem angewandten Verfahren zur Schlammextraktion werden standardmäßig 500 mg Trockensubstanz eingesetzt. Das bedeutet, dass sich bei der Extraktion der Faulschlammrückstände aus den anaeroben Abbautests eine etwa 4-19fach höhere Bestimmungsgrenze ergibt. Die für Schlämme abgeschätzten Bestimmungsgrenzen der Antibiotika liegen bei 10 µg/kg, sodass nun aufgrund der geringeren Probenmenge Bestimmungsgrenzen zwischen 40 und 190 µg/kg resultieren.

In den Testansätzen von Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin A und Trimethoprim, die am Versuche des anaeroben Abbautests in der Wasserphase noch nachweisbar waren, wurden auch in den Faulschlämmen noch Spuren im Bereich zwischen 10 und 820 µg/kg und damit teilweise unter der statistisch abgesicherten Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 gefunden. Da die Signal-Rausch-Verhältnisse des HPLC-ESI-MS-MS-Bestimmungsschritts oberhalb von 3:1 lagen, sind die Ergebnisse für Forschungszwecke dennoch verwertbar.

Die Wirkstoffe Chlortetracyclin, Cefuroxim, Metronidazol, Benzylpenicillin und Tetracyclin waren in keiner der untersuchten Schlammproben nachweisbar. Dies bedeutet, dass diese Substanzen abiotisch abgebaut und nicht an Faulschlamm adsorbiert wurden, sofern sie mit dem angewandten Extraktionsverfahren unzersetzt aus dem Schlamm herausgelöst werden können. Für die β -Lactam-Antibiotika ist dies wegen ihrer Hydrolyseempfindlichkeit nicht zu erwarten. Bei den Tetracyclinen besteht auch die Möglichkeit, dass sie in Form von schwer löslichen Calciumkomplexen in der festen Phase fixiert sind.

Bei einer Ausgangskonzentration des jeweiligen Antibiotikums von 3,5 µg/l und einem Probenvolumen von 80 ml wäre ohne Abbau eine Gesamtmenge von 280 ng zu erwarten gewesen, die bei vollständiger Adsorption an ca. 0,03 bis 0,12 g Faulschlamm (TS) zu einem maximalen Feststoffgehalt im Bereich von ca. 2000-9000 µg/kg hätte führen müssen. Die für die positiv im Schlamm nachgewiesene Wirkstoffe Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin A (quantifiziert als Dehydrato-Erythromycin A) und Trimethoprim ermittelten Werte liegen jedoch selbst zu Ver-

suchsbeginn ein bis drei Größenordnungen darunter. Da die Ausgangssollkonzentration in der wässrigen Phase von 3,5 µg/l im Rahmen der Doppelbestimmung bestätigt werden konnte, zeigt dies, dass der adsorbierte Anteil dieser Wirkstoffe an dem eingesetzten Faulschlamm nahezu vernachlässigbar ist. Lediglich bei Trimethoprim ergibt die Bilanz einen adsorbierten Anteil in der Größenordnung von 10%.

3.3.4 Kläranlagensimulationstest

Durch die Aufnahme von geeigneten Verfahrenskenndaten sowie der Untersuchung der Populationsdynamik mittels Chemotaxonomie wurde ein möglicher Einfluss der untersuchten Antibiotika auf Modellkläranlagen untersucht. Durch den parallelen Betrieb von mind. einer Kontrollanlagen unter gleichen Bedingungen können etwaige Abweichungen der verschiedenen Parameter auf den Einfluss der Antibiotika zurückgeführt werden.

3.3.4.1 BELEBTSCHLAMM- UND VERFAHRENSPARAMETER

Sauerstoff, pH-Wert und Temperatur

Der biologische Abbau der Substanzen im synthetischen Abwasser geht mit einem Sauerstoffverbrauch einher, da für den Energiestoffwechsel Sauerstoff benötigt wird. Der spezifische Sauerstoffverbrauch in einer Kläranlage setzt sich aus der so genannten Grundatmung (endogener Sauerstoffverbrauch) und der Substratatmung zusammen. Die Größe der Grundatmung ist abhängig von der Menge der biologisch aktiven Organismen. Als Bemessungswert wird in der Technik eine Grundatmung von 0,1 kg O₂/(TS*d) angenommen (Mudrack und Kunst 1994).

Hinzu kommt die Substratatmung, die von der Menge des zugegebenen, abbaubaren Substrates abhängt. Ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung nicht gewährleistet, so beeinträchtigt dies letztendlich die Reinigungsleistung der Anlage. Sauerstoff kann also limitierend auf den Abbau organischer Stoffe wirken. Mikroorganismen nutzen nur den gelösten Sauerstoff, weshalb bei einer aeroben Abwasserreinigung permanent Sauerstoff durch Belüftung nachgelöst werden muss (Fritsche 1998).

Tab. 65: Mittlere Sauerstoffkonzentration im Belebungsbecken

Bezeichnung			Sauerstoff [mg/l]	pH-Wert	Temperatur [°C]
Ver-such	Anla-ge	Substanz			
I	1	-	4,3 ± 1,4	7,1 ± 0,4	21,9 ± 2,7
I	2	Ofloxacin	3,4 ± 1,6	7,2 ± 0,3	21,2 ± 2,2
I	3	Vancomycin	4,1 ± 1,1	7,0 ± 0,4	21,3 ± 2,0
I	4	-	3,6 ± 1,7	7,1 ± 0,4	21,5 ± 2,2
II	1	-	4,3 ± 1,0	7,1 ± 0,1	23,0 ± 0,3
II	2	-	5,6 ± 1,0	7,2 ± 0,1	22,3 ± 0,4
II	3	Tetracyclin	5,1 ± 1,1	7,2 ± 0,1	22,4 ± 0,4
II	4	Amoxicillin	5,4 ± 1,4	7,2 ± 0,1	22,1 ± 0,4
III	1	Metronidazol	5,3 ± 1,6	7,1 ± 0,1	22,7 ± 0,9
III	2	Gentamycin	5,0 ± 1,2	7,1 ± 0,1	22,1 ± 0,5
III	3	Erythromycin	5,0 ± 1,5	7,1 ± 0,2	22,0 ± 0,5
III	4	-	5,6 ± 1,4	7,1 ± 0,1	22,0 ± 0,7
IV	1	Clindamycin	5,0 ± 0,4	7,6 ± 0,1	24,1 ± 0,4
IV	2	Chlortetracyclin	3,5 ± 0,7	7,6 ± 0,1	23,8 ± 0,6
IV	4	-	4,5 ± 0,6	7,6 ± 0,2	23,6 ± 0,5
V	1	-	3,3 ± 0,7	7,4 ± 0,1	23,1 ± 0,2
V	2	Cefuroxim	4,9 ± 0,8	7,5 ± 0,1	22,9 ± 0,6
V	3	Sulfamethoxazol	2,8 ± 0,6	7,4 ± 0,1	22,8 ± 0,9
V	4	Vancomycin	3,9 ± 0,6	7,5 ± 0,1	22,9 ± 0,3

- = Kontrollkläranlage

Ab einer O₂-Konzentration von über 0,1-0,2 mg O₂/l wirkt Sauerstoff bei frei suspendierten Bakterien nicht mehr limitierend. Im Belebtschlamm allerdings muss der Sauerstoff bis ins Innere einer Schlammflocke diffundieren. Die Konzentration in der Flocke ist abhängig von deren Form und Größe. Bei einer 500 µm großen, kugeligen Flocke müssen 2,1 mg O₂/l im Wasser gelöst sein, so dass die Bakterien im Inneren

der Flocke noch 0,1 mg O₂/l zur Verfügung haben. Im Mittel geht man davon aus, dass eine Sauerstoffkonzentration von 1-2 mg O₂/l im Belebungsbecken für den Substratabbau ausreicht (Mudrack und Kunst 1994). Fritsche (1998) gibt einen Minimalwert von 2 mg O₂/l an, bei dem noch ein steter aerober Abbau gewährleistet ist. In den Modellkläranlagen wurden diese Werte bis auf wenige Ausnahmen eingehalten (s. Anlagendatei IUK 1.3). Schwankungen beim Sauerstoffgehalt wurden in allen Anlagen beobachtet. Teils ist ungeklärt, wie es zu diesen Schwankungen kam, zum Teil sind die Schwankungen damit zu erklären, dass Sauerstoffpumpen ausfielen und der Sauerstoffgehalt damit absank oder neue Pumpen eingesetzt wurden, was zu einem Anstieg der Sauerstoffkonzentration führte. Zudem zeigte das Absinken der Sauerstoffwerte keine Auswirkungen auf den DOC-Abbau, der über die gesamten Versuche hinweg konstant war.

Der pH-Wert war anfangs im ersten Kläranlagenversuch in allen vier Anlagen stärkeren Schwankungen unterworfen und fiel teilweise unter den von der Norm geforderten Bereich. Zunächst wurde versucht, den pH-Wert durch die Zugabe anorganischer Base (Natronlauge) zu erhöhen. Da sich mit dieser Maßnahme der pH-Wert allerdings nur kurzfristig erhöhen ließ, wurde ab dem 27. Tag dem Nährmedium zusätzlich Natriumhydrogencarbonat zugegeben. In der Draft Version der OECD Vorschrift wird diese Maßnahme empfohlen, wenn der pH-Wert nicht im Sollbereich liegt. Nach Zudosierung des modifizierten Nährmediums konnte der pH-Wert in allen Versuchen im geforderten Sollbereich gehalten werden.

Um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten wurde in allen Anlagen ein Aquariums-Heizer eingesetzt, um die Temperatur konstant zu halten. Ausschließlich der erste Kläranlagenversuch wurde in den ersten 13 Tagen ohne Heizer betrieben, wodurch die Werte teilweise unter den Grenzwert von 18°C sanken. Nach Einsatz der Aquariums-Heizer verlief die Temperatur in allen Anlagen konstant und schwankte nur gering. Einzig im fünften Kläranlagenversuch wurde der obere Sollwert zweimal überschritten, was mit einem Absinken des Sauerstoffgehaltes im Belebungsbecken einherging.

Die Temperatur der Heizer war auf 23°C eingestellt, eine für mesophile Bakterien optimale Temperatur. Damit wurde gewährleistet, dass die Temperatur in allen Versuchen zu jeder Jahreszeit konstant gehalten werden konnte, da selbst im Sommer die Temperaturen durch die äußeren Bedingungen nicht über diesen Bereich hinaus ansteigen.

Biologischer Abbaugrad des synthetischen Abwassers

Tab. 66: Mittlerer DOC-Abbau in den Modellkläranlagen

Bezeichnung			Biologischer Abbaugrad [%]
Ver-such	Anlage	Substanz	
I	1	-	94,9 ± 1,7
I	2	Ofloxacin	93,9 ± 1,9
I	3	Vancomycin	95,1 ± 1,4
I	4	-	94,2 ± 2,4
II	1	-	93,2 ± 0,9
II	2	-	93,5 ± 0,8
II	3	Tetracyclin	93,8 ± 0,7
II	4	Amoxicillin	93,8 ± 0,8
III	1	Metronidazol	92,3 ± 1,1
III	2	Gentamycin	92,8 ± 0,8
III	3	Erythromycin	91,5 ± 1,5
III	4	-	91,8 ± 2,2
IV	1	Clindamycin	84,4 ± 4,8
IV	2	Chlortetracyclin	84,0 ± 5,8
IV	4	-	85,0 ± 2,9
V	1	-	97,6 ± 1,2
V	2	Cefuroxim	97,7 ± 1,2
V	3	Sulfamethoxazol	97,5 ± 1,2
V	4	Vancomycin	97,7 ± 1,0

- = Kontrollkläranlage

Der DOC-Abbau lag bei allen Anlagen über 80% und erfüllte somit die Forderungen der OECD (1981), dass nach 2 Wochen die Abbauleistung in den Kontrollanlagen über 80% liegen muss. Die Zugabe der Antibiotika hatte keine Auswirkungen auf die Reinigungsleistung der Modellkläranlagen. Da das synthetische Abwasser nur aus leicht abbaubaren Stoffen besteht, würde eine Populationsverschiebung im Be-

lechtschlamm vermutlich keine Auswirkungen auf den DOC-Abbau haben, da fast alle im Belebtschlamm vorkommenden Mikroorganismen diese Stoffe abbauen können. Durch die Zugabe der Antibiotika könnte eine Bakterienart bzw. –gruppe gehemmt oder abgetötet werden, deren Abbauleistung würde aber von einer positiv selektierten Gruppe übernommen.

Belebtschlammparameter und mikroskopische Schlammuntersuchung

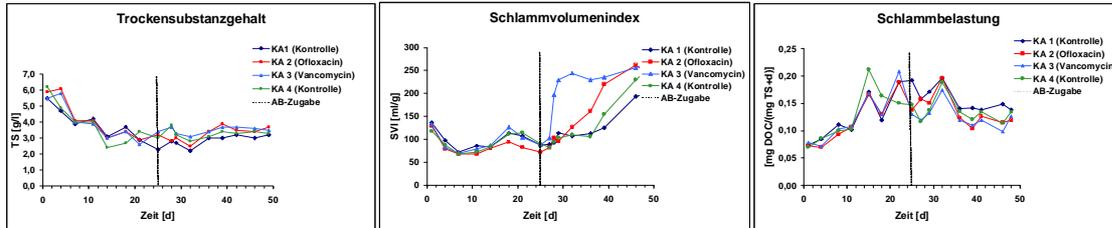


Abb. 34: Belebtschlammparameter, 1. Kläranlagenversuch

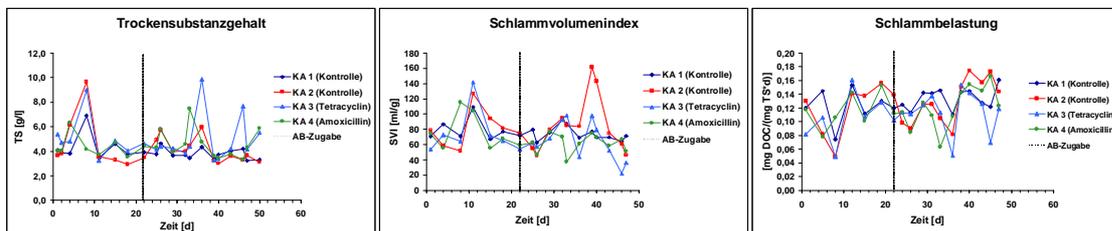


Abb. 35: Belebtschlammparameter, 2. Kläranlagenversuch

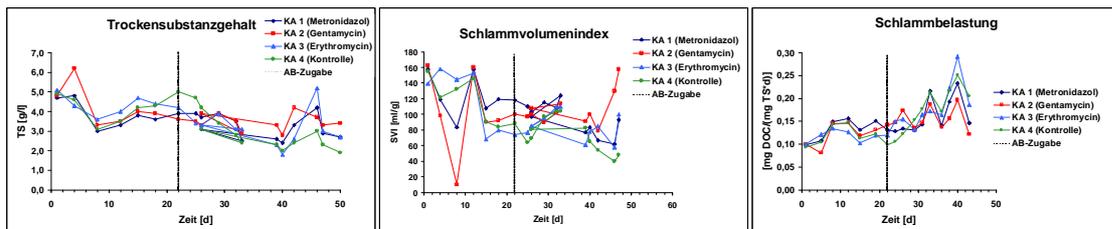


Abb. 36: Belebtschlammparameter, 3. Kläranlagenversuch

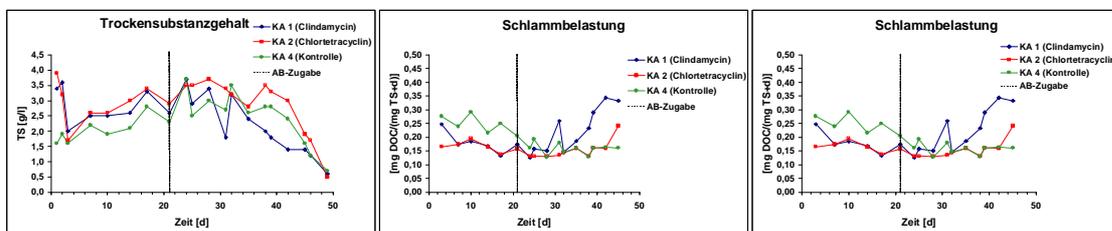


Abb. 37: Belebtschlammparameter, 4. Kläranlagenversuch

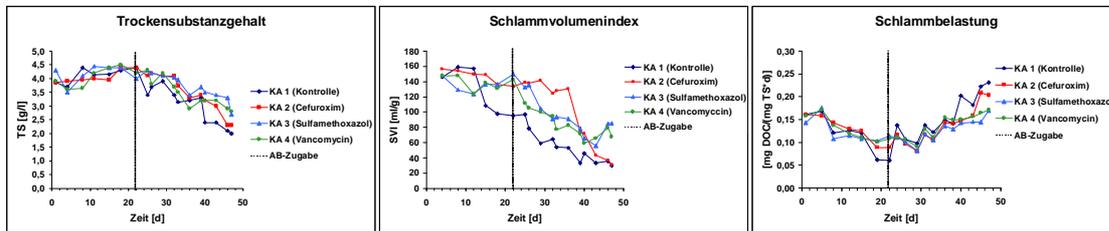


Abb. 38: Belebtschlammparameter, 5. Kläranlagenversuch

Die mikroskopische Schlammuntersuchung soll neben den Belebtschlammparametern Informationen über eine Anzahl visuell beobachteter Charakteristika der Flocken und über die Schlammpopulation liefern, um wiederum auf den Zustand und die Qualität der Biomasse in der Kläranlage schließen zu können. Neben Farbe, Größe, Form, Dichte und Leitorganismen wurden die Proben auf das Auftreten von Fädenorganismen untersucht. Der Belebtschlamm wird nach einer visuellen Beurteilung in 5 Kategorien zur Quantifizierung des fadenförmigen Wachstums eingeteilt (Eikelboom und Buijsen 1992). In Abbildung 39 ist ein mikroskopisches Bild von Belebtschlamm im Kläranlagensimulationstest dargestellt.

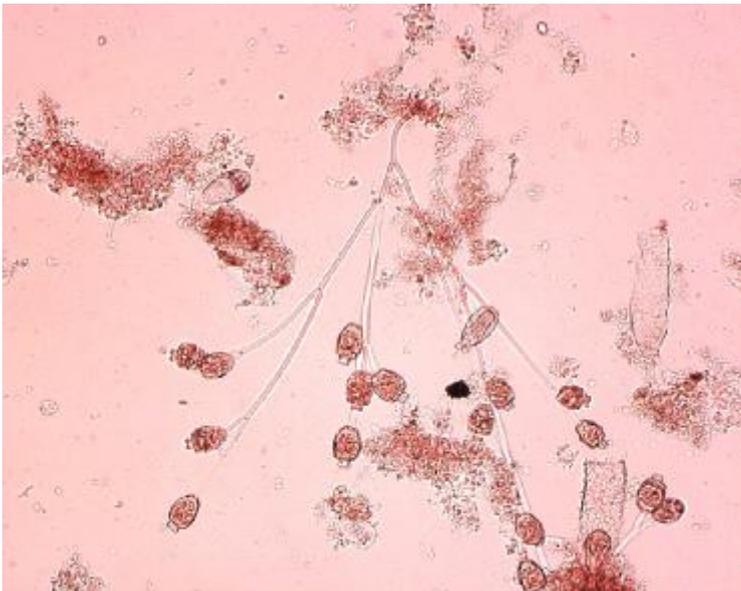


Abb. 39: Mikroskopisches Bild von Belebtschlamm

Nach der mikroskopischen Schlammuntersuchung konnten die Belebtschlammproben aus allen 5 Versuchen als Schlamm aus schwach- bis normalbelasteten Anlagen eingestuft werden, was auch nach Zugabe eines leicht abbaubaren Nährmediums zu erwarten war. Rotatorien und Ciliaten kamen teilweise in hoher Zahl vor, was auf einen guten Zustand des Schlammes schließen lässt. Vereinzelt fanden sich auch Rhizopoden und Flagellaten, die eher für instabile Anlagen charakteristisch sind. Am auffälligsten waren Veränderungen in der Farbe des Schlammes, die makroskopisch

zu erkennen waren. War der Schlamm zu Beginn des Versuches dunkelbraun, so wurde dieser im Verlauf des Testes durch das Auswaschen mineralischer Bestandteile immer heller, bis er am Ende eine hellbraun bis gelbliche Farbe zeigte.

Der Schlammvolumenindex (SVI) ist ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Absetzeigenschaften des Belebtschlammes. Der Schlamm sollte nach Möglichkeit ein gutes Absetzverhalten zeigen, da schlecht absetzbarer Schlamm, so genannter Blähschlamm, zu Betriebsstörungen der Kläranlage führt. Blähschlamm wirkt sich allerdings nur auf die Nachklärung nachteilig aus, eine fehlende Sedimentation des Schlammes kann zu Verunreinigungen des Ablaufs mit Schlamm führen. Die Prozesse im Belebungsbecken können hingegen dann optimal ablaufen, wenn die Flocken eine möglichst große Oberfläche besitzen und leicht in Schwebelage gehalten werden können, was bei Blähschlamm in besonderem Maße der Fall ist. Laut Mudrack und Kunst (1994) sind fädige Bakterien, die zumeist für den Blähschlamm verantwortlich sind, hoch leistungsfähig.

Die Anstiege der Gesamtfädigkeit im ersten Kläranlagenversuch spiegeln sich auch im Anstieg des Schlammvolumenindex (s. Abb. 34) wieder. Das heißt zwischen der Fädigkeit des Schlammes und den Absetzeigenschaften besteht in diesem Fall eine direkte Verbindung. Wird der Fadenwuchs zu stark, kann es zu so genanntem Blähschlamm kommen, bei dem die Absetz- und Eindickeigenschaften des Schlammes schlecht sind. Im Allgemeinen spricht man ab einem Schlammvolumen von 150 mg/l und bei einem gleichzeitigen Auftreten von Fadenorganismen von Blähschlamm (Mudrack und Kunst 1984). Unter Normalbedingungen liegen die SVI-Werte bei kommunalen Abwässern zwischen 80 und 120 ml/g (Houben 2001).

Bei der Anlage mit Vancomycin (1. Kläranlagenversuch) (s. Abb. 34) erfolgte der Anstieg des SVIs sehr sprunghaft von 103 ml/g am 25. Versuchstag auf 197 ml/g am 28. Versuchstag. Die zweite mit Ofloxacin beaufschlagte Anlage erreichte erst am 36. und die beiden Kontrollanlagen am 40. und 42. Versuchstag einen Wert von 150 ml/g. Die sprunghafte Blähschlamm-Bildung nach der Zugabe von Vancomycin könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass die Randbedingungen aufgrund zeitweise unterschiedlicher Förderleistungen von Sauerstoff- und Nährstoffpumpen nicht in allen Anlagen gleich war. Zum anderen wäre eine für fädige Bakterien positiv selektierende Wirkung des Antibiotikums denkbar. Die Wiederholung der Prüfsubstanz Vancomycin im 5. Kläranlagenmodellversuch zeigte jedoch keine Korrelation zwischen Zugabe des Antibiotikums und Blähschlamm-Bildung (s. Abb. 38). Daraus lässt

sich schließen, dass der sprunghafte Anstieg des SVIs auf die Randbedingungen rückzuführen ist. Ähnlich verhält es sich im 4. Kläranlagenversuch (s. Abb. 37). Auch hier korrelieren der SVI mit der Fädigkeit des Belebtschlammes. Allerdings sinkt der SVI in allen vier Anlagen gegen Ende des Versuches stark ab, was mit einem starken Verlust an TS einhergeht. Das mikroskopische Bild veränderte sich im Verlauf der übrigen drei Tests nur geringfügig. Während des gesamten Versuches konnte jeweils nur eine geringe Belastung der Anlagen mit fädigen Bakterien festgestellt werden, was sich auch in SVI Werten unter 150 ml/g widerspiegelte.

Der Trockensubstanzgehalt lag anfänglich bei allen Versuchen über dem von der OECD geforderten Bereich von 2,5 bis 3 g/l. Dies lag an dem sehr hohen Trockensubstanzgehalt der Kläranlage in Wyhl. Durch die Entnahme von Schlamm für die Chemotaxonomie sowie der zusätzlichen Schlammmentnahme bei sehr hohen TS-Gehalten, konnte im Laufe des Versuchs der TS-Gehalt dem empfohlenen Bereich angenähert werden. Im 4. Kläranlagenversuch (s. Abb. 37) wurde versucht die Trockenmasse geringer zu halten, was zur Folge hatte, dass der TS-Gehalt im Laufe des Versuches kontinuierlich abnahm und nicht mehr im Sollbereich gehalten werden konnte.

Um für die Nitrifikanten optimale Bedingungen zu schaffen, sollte die Schlammbelastung unter $0,1 \text{ mg DOC}/(\text{mg TS} \cdot \text{d})$ liegen. Bis auf die Versuchstage, an denen der TS-Gehalt sehr hoch war, was meist ein Absinken der Schlammbelastung zur Folge hatte, lag sie über diesem Wert (max. Wert $0,34 \text{ mg DOC}/(\text{mg TS} \cdot \text{d})$) (s. Abb. 34-38). Einen Einfluss der Schlammbelastung ($>0,1 \text{ mg DOC}/(\text{mg TS} \cdot \text{d})$) auf die Nitrifikation konnte nicht festgestellt werden, da in allen Kläranlagensimulationsversuchen eine Nitrifikation reduzierter Ammoniumverbindungen stattfand (s. Tab. 67). Schöberl (1991) macht nur die Aussage, dass eine Schlammbelastung von $0,1 \text{ mg DOC}/(\text{mg TS} \cdot \text{d})$ eine gute Nitrifikation gewährleistet, gibt aber keinen Grenzwert an. Seine Versuche zeigen lediglich, dass bei einer Belastung von rund $0,4 \text{ mg DOC}/(\text{mg TS} \cdot \text{d})$, die Nitrifikation stark beeinträchtigt wird. Wenn man das Schlammalter betrachtet, das von der Schlammbelastung abhängt, so ist dieses mehr als ausreichend für eine Nitrifikation. Nitrifikanten werden ab einem gewissen Schlammalter ausgewaschen und zwar dann, wenn dieses kleiner als ihre Generationszeit wird. Das Schlammalter sollte deshalb mindestens 2-3 Generationszeiten betragen. Die Generationszeit ist stark abhängig von der Temperatur und beträgt bei 20°C rund 1,3 Tage (Mudrack und Kunst 1994). Ein Schlammalter von 4 Tagen reicht demnach für eine Nitrifikation

völlig aus. In den Kläranlagen wurden Werte von 8 bis max. 45 Tage erreicht, also deutlich höher als für eine Nitrifikation nötig.

Stickstoffparameter

Tab. 67: Stickstoffparameter in Zu- und Ablauf

Versuch	Anlage	Ammonium		Nitrit		Nitrat	
		Zulauf [mg/l]	Ablauf [mg/l]	Zulauf [mg/l]	Ablauf [mg/l]	Zulauf [mg/l]	Ablauf [mg/l]
I	1	10,2 ± 4,1	1,4 ± 1,6	0,12 ± 0,09	0,02 ± 0,01	4,9 ± 1,9	27,7 ± 14,7
I	2	9,8 ± 5,2	1,6 ± 1,6	0,12 ± 0,11	0,02 ± 0,01	4,1 ± 0,11	25,4 ± 11,7
I	3	9,4 ± 4,3	1,1 ± 1,5	0,08 ± 0,04	0,02 ± 0,01	4,5 ± 1,9	30,9 ± 12,4
I	4	10,9 ± 3,2	1,0 ± 1,2	0,11 ± 0,08	0,04 ± 0,01	4,3 ± 1,8	29,7 ± 14,4
II	1	8,5 ± 4,4	0,14 ± 0,07	n.n.	0,71 ± 0,35	5,1 ± 2,3	21,7 ± 9,3
II	2	8,4 ± 4,4	0,13 ± 0,05	n.n.	0,30 ± 0,22	5,8 ± 2,4	20,3 ± 8,6
II	3	8,0 ± 4,1	0,14 ± 0,09	n.n.	0,52 ± 0,38	4,7 ± 2,1	21,4 ± 7,0
II	4	9,4 ± 4,0	0,17 ± 0,09	n.n.	0,60 ± 0,49	5,1 ± 2,1	24,4 ± 11,1
III	1	7,0 ± 1,3	0,43 ± 0,27	0,02 ± 0,01	0,26 ± 0,11	4,0 ± 0,92	17,6 ± 7,2
III	2	6,4 ± 1,9	0,39 ± 0,24	0,02 ± 0,02	0,23 ± 0,07	4,0 ± 0,93	17,7 ± 10,4
III	3	7,0 ± 2,1	0,37 ± 0,24	0,02 ± 0,01	0,24 ± 0,10	4,0 ± 0,91	16,5 ± 10,5
III	4	7,3 ± 1,5	0,43 ± 0,25	0,02 ± 0,01	0,19 ± 0,07	4,0 ± 0,91	14,6 ± 9,8
IV	1	6,1 ± 1,5	0,43 ± 0,31	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,04	4,4 ± 2,0	33,8 ± 10,1
IV	2	6,5 ± 1,6	0,55 ± 0,25	0,03 ± 0,01	0,14 ± 0,07	4,5 ± 2,1	43,7 ± 14,2
IV	4	6,9 ± 1,5	0,59 ± 0,45	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,04	4,4 ± 2,0	31,2 ± 11,5
V	1	6,6 ± 1,6	0,23 ± 0,15	0,04 ± 0,01	0,18 ± 0,14	4,4 ± 1,1	37,0 ± 10,0
V	2	6,1 ± 1,6	0,25 ± 0,21	0,03 ± 0,01	0,17 ± 0,12	4,5 ± 1,1	52,6 ± 16,2
V	3	5,4 ± 1,9	0,24 ± 0,13	0,03 ± 0,01	0,19 ± 0,09	4,5 ± 1,1	46,7 ± 13,4
V	4	6,1 ± 1,4	0,20 ± 0,11	0,03 ± 0,01	0,14 ± 0,08	4,5 ± 1,1	33,0 ± 7,2

n.n. = nicht nachweisbar

In Tab. 67 sind die Stickstoffparameter der Kläranlagenversuche dargestellt. Im 2. Versuch wurden die Parameter Nitrit und Nitrat mittels Ionenchromatografie ermittelt.

Die gemessenen Proben lagen unter der ionenchromatografischen Bestimmungsgrenze von Nitrit. Die restlichen Werte wurden fotometrisch ermittelt.

Laut OECD (1981) ist ein Kläranlagenversuch, der unter Nitrifikationsbedingungen durchgeführt wird, nur gültig, wenn die Ammoniumstickstoffkonzentration im Ablauf unter 1 mg/l und die Nitritstickstoffkonzentration unter 2 mg/l liegt. Diese Sollwerte wurden vornehmlich eingehalten. Beim ersten Versuch lag die mittlere Ammoniumstickstoffkonzentration über dem Sollwert. Unter Berücksichtigung der Zulaufkonzentrationen (s. Tab. 67) ist jedoch eine deutliche Nitrifikation erkennbar.

Gesamtstickstoff

Die Ergebnisse der Gesamtstickstoffbestimmung (s. Tabelle 68) lassen darauf schließen, dass in den Anlagen kein elementarer Stickstoff entsteht, also keine Denitrifikation stattfindet. Für eine genauere Aussage wäre es nötig, den Gesamtstickstoffgehalt des Zulaufwassers zu bestimmen. Dieser Wert wurde lediglich abgeschätzt. Eine Denitrifikation ist nur möglich, wenn sich in der Anlage anoxische Bedingungen unter gleichzeitiger Anwesenheit von NO_3^- und organischen H^+ -Donatoren einstellt. Dies wäre z. B. bei Ausfall eines Belüftungsmoduls im Belebungsbecken möglich. Zu solchen Bedingungen kann es auch im Absetzbecken kommen, wenn der Schlamm anoxisch wird. Im Extremfall kann dies schon nach 10 min der Fall sein (Mudrack und Kunst 1994). In den Modellkläranlagen wird diese Verweilzeit im Absetzbecken durchaus erreicht, aber die Menge an organischer Fracht ist zu klein um eine Denitrifikation zu ermöglichen. Nur wenn Belastungsstöße bis ins Absetzbecken reichen würden, könnten dort eine Denitrifikation und damit auch eine ungewollte Schlammflotation stattfinden.

Tab. 68: Mittlere Gesamtstickstoffkonzentration in Ablauf, Nährmedium und Belebtschlamm

Bezeichnung			Zulauf [mg N/l]	Ablauf [mg N/l]	Belebtschlamm*[g/kg N]
Ver-such	An-lage	Substanz			
I	1	-	32,5 ± 2,5	38,0 ± 8,5	83,1
I	2	Ofloxacin	31,0 ± 4,6	33,0 ± 8,8	52,1
I	3	Vancomycin	31,8 ± 2,0	36,0 ± 3,7	56,9
I	4	-	-	-	-
II	1	-	31,1 ± 1,0	42,0 ± 3,5	91,5
II	2	-	-	-	-
II	3	Tetracyclin	30,4 ± 1,5	41,4 ± 4,6	96,5
II	4	Amoxicillin	30,2 ± 1,9	41,0 ± 3,1	91,7
III	1	Metronidazol	40,5 ± 3,5	39,7 ± 2,2	101
III	2	Gentamycin	38,4 ± 4,4	43,0 ± 4,1	98,5
III	3	Erythromycin	35,5 ± 3,1	48,0 ± 12,7	96,2
III	4	-	34,7 ± 4,3	42,0 ± 13,1	104
IV	1	Clindamycin	34,1 ± 2,4	35,6 ± 2,5	107
IV	2	Chlortetracyclin	36,2 ± 3,9	37,7 ± 2,4	95
IV	4	-	32,2 ± 2,3	34,6 ± 4,5	94,3
V	1	-	45,1 ± 1,4	41,5 ± 5,4	91,1
V	2	Cefuroxim	46,9 ± 1,1	43,0 ± 7,2	91,9
V	3	Sulfamethoxazol	47,3 ± 1,4	51,0 ± 4,0	90,3
V	4	Vancomycin	46,3 ± 1,5	51,6 ± 4,5	88,9

*= Einzelbestimmung am Ende des Testes, - = Kontrollanlage

3.3.4.2 STOFFSPEZIFISCHE ANALYTIK

Tab. 69: Gemessene (IST) und vorgegebene (SOLL) Antibiotikakonzentrationen im Zulauf und Ablauf der Modellkläranlagen sowie im Belebtschlamm gemessene Konzentrationen

Antibiotikum	Zulauf			Ablauf			Belebtschlamm [µg/kg TS]
	IST [µg/l]	SOLL [µg/l]	Relative Konz. [%]	IST [µg/l]	SOLL [µg/l]	Relative Konz. [%]	
Amoxicillin	7200 ± 2100	10400	66 ± 22	1,0 ± 1,2	520	< 1	n.n.
Cefuroxim	1100 ± 150	1000	107 ± 15	10 ± 6,9	50	21 ± 14	n.n.
Chlortetracyclin	12 ± 8,4	600	2,0 ± 1,4	n.n.	30	n.n.	n.n.
Clindamycin	104 ± 21	160	65 ± 13	9,0 ± 2,5	8,0	110 ± 31	+ (250)
Erythromycin A	160 ± 9,1	200	81 ± 4,1	16 ± 12	10	156 ± 118	+ (390)
Gentamycin	n.q.	32	n.q.	n.q.	1,6	n.q.	n.n.
Metronidazol	347 ± 67	320	108 ± 21	14 ± 6,9	16	85 ± 43	n.n.
Ofloxacin	377 ± 29	440	86 ± 6,5	19 ± 3,9	22	87 ± 18	+ (2800)
Sulfamethoxazol	3550 ± 534	4440	82 ± 12	72 ± 61	222	33 ± 27	+ (110)
Tetracyclin	456 ± 93	800	57 ± 12	2,0 ± 1,4	40	6,0 ± 3,6	n.n.
Vancomycin	140 ± 13	140	100 ± 8,9	4,0 ± 0,8	7,0	58 ± 12	+ (130)
Vancomycin	109 ± 39	140	79 ± 29	3,0 ± 1,2	7,0	39 ± 18	+ (350)

+: nachgewiesen; n.n. = nicht nachweisbar, Werte in Klammern: halbquantitativ

In Tabelle 69 sind die gemessenen (IST) und vorgegebenen (SOLL) Antibiotikakonzentrationen im Zulauf und Ablauf der Modellkläranlagen sowie im Belebtschlamm dargestellt. Die relative Konzentration gibt den Anteil der IST-Konzentration an der SOLL-Konzentration an.

Die integrale Auswertung (Mittelwert, Standardabweichung) zeigt, dass es häufig Schwankungen innerhalb einer Serie gibt. Diese Schwankungen müssen nicht ausschließlich auf spezifische Substanzeigenschaften rückzuführen sein, sondern können auch instationären Bedingungen (z. B. Einfahrphase, Rückvermischung, Schwankungen in der Förderleistung von Pumpen, usw.) zugrunde liegen.

Die Antibiotikakonzentrationen im Belebtschlamm werden halbquantitativ angegeben (s. Kapitel 3.2.4.1).

Die Konzentration von **Amoxicillin** im Zulaufbehälter beträgt rund 66% der Sollkonzentration (10,4 mg/l). Aufgrund einer hydrolytischen Spaltung könnte ein Teil des

Wirkstoffes in der Zeit von den Probenahmen bis zur Messung eliminiert worden sein. Im Ablauf der Modellkläranlage befindet sich nur noch eine vernachlässigbar geringe Menge an Amoxicillin. Wahrscheinlich findet entweder ein biologischer Abbau oder eine Umwandlung aufgrund der Instabilität des β -Lactamringes statt. (s. auch Kapitel 4.1.3). Eine Adsorption an Klärschlamm kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, allerdings ist eine experimentelle Überprüfung anhand der in diesem Projekt angewandten sauren Extraktion (s. Kapitel 3.2.4.2) nicht möglich, da Amoxicillin unter diesen Bedingungen hydrolysiert. Die Ergebnisse wurden durch die Messungen in den Kläranlagen Kenzingen, Forchheim und Wyhl bestätigt (s. Kapitel 4.2.1.2 und 4.2.2), in deren Zu- und Ablauf ebenfalls kein Amoxicillin nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der Primärelimination im Closed Bottle Test (s. Kapitel 4.3.1.2) geht Alexy (2003) davon aus, dass Amoxicillin in der Umwelt nicht persistent ist.

Das Antibiotikum **Cefuroxim** gehört zur Gruppe der Cephalosporine und weist, ebenso wie Penicilline, einen viergliedrigen β -Lactamring im Grundgerüst auf. Im Zulauf der Modellkläranlage wurde die Substanz im Rahmen der Standardabweichung quantitativ wiedergefunden. Im Ablauf der Kläranlage wurden im Mittel 21% der Substanz gefunden. Auch hier muss ein biologischer Abbau oder eine Umwandlung aufgrund der Instabilität des β -Lactamringes stattfinden. Eigene Stabilitätsuntersuchungen (Kapitel 4.3.6) zeigten eine sichtliche Wärmeempfindlichkeit von Cefuroxim ($t_{1/2} = 14$ d). Im Belebtschlamm konnte Cefuroxim mit der sauren Extraktion wie erwartet nicht nachgewiesen werden.

Im Zulaufbehälter von **Tetracyclin** konnten nur rund 60% und im Zulaufbehälter von **Chlortetracyclin** rund 2% der Sollkonzentrationen nachgewiesen werden. In den Ablaufbehältern waren nahezu keine Tetracycline nachweisbar. Entweder ist bei der Herstellung der Lösungen ein Fehler aufgetreten oder ein Teil der Tetracyclinmenge konnte aufgrund einer Umwandlung des Wirkstoffes nicht nachgewiesen werden. Laut Hirsch et al. (1999) bilden Tetracycline mit Calcium oder verwandten Ionen einen Komplex. Da zur Herstellung der Antibiotikumlösungen im Zulaufbehälter die Antibiotikumstamlösungen mit Leitungswasser verdünnt wurden, kann eine solche Komplexbildung durchaus stattfinden. Eine Adsorption von Tetracyclinen an Belebtschlamm ist ebenfalls möglich, wie der Nachweis von Doxycyclin in den Beleb- und Faulschlammproben der Kläranlagen Forchheim und Wyhl zeigt (s. Kapitel 4.2.2). Allerdings werden, wie aus diesem Beispiel deutlich wird, drastischere Extrak-

tionsbedingungen benötigt, unter denen die hier untersuchten Wirkstoffe Tetracyclin und Chlortetracyclin nicht stabil sind.

Clindamycin konnte zu ca. 65% im Zulaufbehälter und zu über 100% im Ablaufbehälter (relative Konzentration) bestimmt werden. Im Belebtschlamm wurden 250 µg/kg TS Clindamycin gefunden. Die Konzentrationswerte im Ablauf der Modellkläranlagen lassen auf eine Stabilität und Persistenz von Clindamycin in der Umwelt schließen. Eigene Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit im CBT (s. Kapitel 4.3.1.1) zeigten, dass Clindamycin nicht leicht abbaubar ist.

Erythromycin A gehört zur Gruppe der Makrolide und weist ebenfalls im Ablaufbehälter eine relative Konzentration von über 100% auf. Im Belebtschlamm wurde ein Gehalt von 390 µg/kg bestimmt. Wegen der leichten Umwandlung von Erythromycin A zu Dehydrato-Erythromycin A (Volmer und Hui 1998), ist eine exakte Quantifizierung nur möglich, wenn in den Kalibrierproben und in den zu analysierenden realen Proben das gleiche Verhältnis zwischen beiden Formen vorliegt. Ist dies in individuellen Proben nicht der Fall, so kann dies zu größeren Quantifizierungsungenauigkeiten führen. Eine unabhängige Überprüfung ist nicht möglich, da beide Formen nicht in einzeln in stabiler Form erhältlich sind. Diese möglichen Quantifizierungsungenauigkeiten drücken sich in der vergleichsweise großen Standardabweichung in den Ablaufproben aus. Trotz dieser Quantifizierungsungenauigkeiten wird Erythromycin A bzw. sein Abbauprodukt Dehydrato-Erythromycin A im Zu- und Ablauf der Modellkläranlage in der erwarteten Größenordnung wiedergefunden, was die Persistenz dieser beiden Formen belegt. Auch im CBT zeigte sich das Makrolid als nicht leicht abbaubar (s. Kapitel 4.3.1).

Für das Aminoglycosid **Gentamycin** konnte keine stoffspezifische analytische Untersuchung seitens der TZW erfolgen, da bis dato keine geeignete Methode zur Quantifizierung von Gentamycin existiert.

Metronidazol konnte zu ca. 100% im Zulauf und zu ca. 85% (relative Konzentration) im Ablauf nachgewiesen werden. Eine Adsorption an Belebtschlamm fand nicht statt. Das Antibiotikum erwies sich im Modellkläranlagenversuch als nahezu stabil. Auch im CBT erwies sich Metronidazol als nicht leicht abbaubar (s. Kapitel 4.3.1). Stabilitätsuntersuchungen mit Metronidazol (s. Kapitel 4.3.6) zeigten hingegen eine Fotoinstabilität der Substanz ($t_{1/2} = 15$ d). Die Fotolyse spielt in den Kläranlagen jedoch eine geringe Rolle, da Schlamm die Substanz weitgehend vor Lichtabbau schützt.

Ofloxacin wurde nicht abgebaut und war im Ablauf in der gleichen Konzentration wie im Zulauf nachweisbar. Am Belebtschlamm adsorbierten während des Versuches 2800 µg/ kg TS Ofloxacin. Dieses Ergebnis wird durch eine Studie von Hektoen et al. (1995) bekräftigt, der von einer Bindung von Chinolonen an Schlamm berichtet. Hertle (1999) wies eine Adsorption des Chinolons Ciprofloxacin an Belebtschlamm nach. Im Kläranlagensimulationsversuch mit **Sulfamethoxazol** war eine deutliche Elimination der Prüfsubstanz zu erkennen. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu weiteren Untersuchungen zur abiotischen und biotischen Abbaubarkeit der Prüfsubstanz (s. Kapitel 4.3), bei denen Sulfamethoxazol als stabil eingestuft wurde. Eine Adsorption an Belebtschlamm findet teilweise statt. Es muss jedoch erwähnt werden, dass es noch weitere Formen der Elimination, wie z. B. die Komplexbildung mit Härtebildnern des Wassers (s. Tetracycline) oder Mineralisierung, gibt.

Der Modelkläranlagenversuch mit **Vancomycin** wurde wiederholt, um anhand einer Prüfsubstanz eine erweiterte Datenbasis zur Auswertung zur Verfügung zu stellen.

In beiden Versuchen war eine Elimination der Prüfsubstanz ersichtlich, wobei bei der Wiederholung des Testes eine stärkere Elimination, als auch Adsorption an Belebtschlamm zu erkennen war.

3.3.4.3 UNTERSUCHUNG DER POPULATIONSDYNAMIK

3.3.4.3.1 Chemotaxonomie

Chinone:

Menachinone

Menachinone dienen vor allem als Biomarker für gram-positive sowie obligat anaerobe Bakterien. Anhand der Chinonverteilung in den untersuchten Schlammproben kann zum Teil ein Rückschluss auf die dominierenden Bakteriengattungen gezogen werden. In den untersuchten Schlammproben konnten die Chinone M-6, M-7, M-8, M-8(H₂), M-8(H₄), M-8(H₄)+M-9, M-9(H₂), M-9(H₄)+M-10 sowie M-9(H₈) nachgewiesen werden, wobei M-7 und M-8 die dominierenden Komponenten waren. Hiraishi (1988) und Hiraishi et al. (1989) beschreiben die Zugehörigkeit einzelner Bakteriengruppen zu den Chinongruppen. So ist laut Hiraishi (1988) die Menachinongruppe M-6 in gram-negativen Vertretern des *Flavobacterium-Cytophaga*-Komplexes vorherrschend. Dieser Komplex enthält auch teilweise das Chinon M-7, das ansonsten noch auf gram-positive *Bacillus*- und *Staphylococcus*-Arten hinweist. Vertreter des *Flavobacterium-Cytophaga*-Komplexes sind zudem die einzig bekannten gram-negativen

Bakterien, die Menachinone enthalten. Hiraishi et al. (1989) schreiben dem M-8 Chinon die Gruppe *Micrococcus* zu, M-8(H₂) die Gruppen *Rhodococcus* und der coryneformen Bakterien. M-9(H₂) ist als Indikator für die Gruppen *Arthrobacter* und *Nocardia* bekannt (Hiraishi 1988).

Insgesamt ist anhand der Menachinonverläufe kein signifikanter Einfluss der Antibiotika auf die Belebtschlammpopulationen zu erkennen. Allgemein scheinen nach der Verteilung der Menachinone Vertreter des *Flavobacterium-Cytophaga*-Komplexes, der Gruppe *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Micrococcus* vorzuherrschen. Laut Lemmer et al. (1996) sind diese Gruppen auch in kommunalen Kläranlagen zu finden, wobei sie jedoch nicht die dominierenden Gruppen bilden. Hiraishi et al. (1991 und 1998) untersuchten Schlamm aus Laborkläranlagen und fanden heraus, dass bei den Menachinonen die Chinone M-7, M-8 und M-8(H₄) am häufigsten vertreten waren. Dies bestätigt auch die Beobachtungen der durchgeführten Kläranlagensimulationsversuche, wobei hier die M-8(H₄)+M-9 Gruppe eine untergeordnete Rolle spielte.

Ubichinone

Mit Hilfe der Ubichinone lassen sich Aussagen über die Verteilung von gramnegativen Bakterien in den verschiedenen Subklassen der Proteobakterien treffen. Bei der Auswertung konnten die drei Ubichinone Q-8, -9 und Q-10 nachgewiesen werden. Während der Kläranlagenversuche waren Q-8 und Q-10 die am häufigsten vorkommenden Komponenten. Laut Hiraishi et al. (1998) wird Q-8 vor allem bei Proteobakterien der β -Subklasse gefunden. Q-10 ist ein Biomarker für Proteobakterien der α -Subklasse und Q-9 wird der γ -Subklasse zugeordnet. Die Verteilung der gefundenen Ubichinone bestätigt sich durch Versuche von Hiraishi et al. (1989, 1991, 1998), bei denen auch Q-8 und Q-10 die dominierenden Komponenten waren. Abgesehen vom ersten Versuch, sanken die Q-8 Gehälter in den Modellkläranlagen während der Versuche etwas ab. Im Gegensatz dazu stieg der Gehalt an Q-10. Dies entspricht Beobachtungen von Hiraishi et al. (1991), nach denen die Belebtschlammpopulationen einige Zeit benötigen, um sich an das synthetische Abwasser zu adaptieren. Die Zusammensetzung der Populationen hängt teilweise stark davon ab, welches Abwasser dem Schlamm zugeführt wird. So unterscheiden sich Schlämme, die mit natürlichem Abwasser beaufschlagt werden, von denen, die synthetisches Abwasser zugeführt bekommen (Hiraishi et al. 1998). In der Akklimationsphase finden teilweise Populationsdynamiken statt, da unter Umständen einige Bakterien den

neuen Bedingungen besser angepasst sind als andere. Im Falle der durchgeführten Versuche heißt das, dass sich Bakterien der α -Subklasse der Proteobakterien im Abwasser bevorzugt vermehrt haben und teilweise Bakterien aus der β -Subklasse verdrängten. Ein Einfluss durch Antibiotika scheint ausgeschlossen.

Polyamine

Polyamine dienen vor allem als Biomarker für gram-negative Keime, da die geringen Polyaminkonzentrationen in gram-positiven Keimen überdeckt werden würden (Unger 2000). In der Literatur werden verschiedene Verteilungsmuster für die α -, β -, γ -Subklasse der Proteobakterien beschrieben (Auling 1991 und 1992, Busse und Auling 1988, Hamana und Matsuzaki 1992 und 1993). In der α -Subklasse sind drei Polyaminmuster bekannt. Der Spermidintyp (*Sphingomonas*, *Zymomonas*), der sym-Homospermidintyp (*Acetobacter*, *Glucobacter*) und der Spermidin-sym-Homospermidintyp (*Aquaspirillum*, *Azospirillum*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*). Cadaverin tritt ausschließlich als Nebenkomponente in *Paracoccus* und einigen *Thiobacillen* auf (Busse und Auling 1988, Hamana und Matsuzaki 1992 und 1993). Die Hauptkomponenten der β -Subklasse sind Hydroputrescin, Putrescin und Spermidin (Busse und Auling 1988, Hamana und Matsuzaki 1993). In der γ -Subklasse sind sieben unterschiedliche Verteilungsmuster beschrieben. Der erste Typ enthält keine Polyamine. Die anderen Typen sind der Spermidintyp (*Xanthomonas campestris*), der Putrescin bzw. Putrescin-Cadaverintyp (*Sphingomonas*), der Spermidin-Cadaverintyp (*Xantomonas*), der Spermidin-Putrescin-Cadaverintyp bzw. Putrescin-Spermidintyp (*Altermonas*) und der Diaminopropantyp (*Acinetobacter*) (Hamana und Matsuzaki 1992).

In allen Kläranlagensimulationsversuchen waren Putrescin und sym-Homospermidin die wichtigsten Komponenten. Hydroputrescin, Diaminopropan, Cadaverin und Spermidin waren in kleineren Mengen zu finden. Für die Modellkläranlagenversuche bedeutet dies, dass Bakterien der α_2 -Subklasse (sym-Homospermidin als Indikator) und der β -Subklasse der Proteobakterien sowie Flavo- und Cyanobakterien die vorherrschenden Arten waren. Auffällig war die Zunahme von Spermidin in fast allen Kläranlagenversuchen z. T. über den gesamten Versuchsverlauf, ausgenommen hiervon war der 3. bzw. 4. Versuch, bei dem die Spermidinverläufe nahezu konstant waren. Die Diaminopropangehalte stiegen jedoch in der letzten Versuchswoche des

4. Versuches deutlich in allen vier Anlagen an (von durchschnittlich 10-15% bis 30%).

Der Vergleich der Polyaminverteilung und der Ubichinonverteilung bestätigt die Dominanz von Bakterien aus der α - und β -Subklasse der Proteobakterien. Sowohl das Ubichinon Q-10, als auch das Polyamin sym-Homospermidin, die Indikatoren für diese Bakteriengruppe sind, finden sich in größeren Mengen in den Modellkläranlagen. Ebenso sind Bakterien der β -Subklasse Hauptbestandteil der Belebtschlammzönose. Dies bestätigt sich durch den Verlauf des Ubichinons Q-8 sowie durch den hohen Anteil an Putrescin. Der zeitliche Vergleich einzelner Ubichinone und Polyamine einer taxonomischen Gruppe ist aber nicht immer identisch. Kunz (2001) vergleicht die Marker für die β -Subklasse der Proteobakterien Q-8, Hydroputrescin und Putrescin. Es wird deutlich, dass der Verlauf des Ubichinons und der Polyamine nicht übereinstimmen. Als möglicher Grund nennt er die Existenz weiterer Untergruppen in der Subklasse, wobei eine dortige Populationsverschiebung Störungen im parallelen Verlauf verursachen kann.

Im Rahmen eines Simulationsversuches kann es durchaus zu Populationsdynamiken kommen, die auch innerhalb einer Subklasse stattfinden können. Dabei ist nicht auszuschließen, dass Effekte teilweise überlagert werden. Abschließend ist festzuhalten, dass die Zugabe der Antibiotika in den Modellkläranlagen keinen erkennbaren Einfluss auf die chemotaxonomischen Marker zeigte.

3.3.4.3.2 Statistische Auswertungsmethode der Chemotaxonomie

Statistische Grundlagen

Aus vorhergehenden Untersuchungen von Antibiotika in Kläranlagenversuchen konnte eine geeignete Methode zur Auswertung entwickelt werden. Wie in der Datenbeschreibung erwähnt weisen die Daten eine zeitliche Struktur auf, die sich auch in Form von Autokorrelationen zeigte.

Die Daten wurden zunächst mit Hilfe von generalisierten linearen Modellen als Repeated Measurements mit korrelierten Fehlern untersucht, da es wiederholte Messungen an dem selben Versuchsobjekt sind und eine zeitliche Abhängigkeit der Beobachtungen zwar aus fachwissenschaftlicher Sicht unwahrscheinlich, aber nicht vollkommen auszuschließen ist. Formal sieht ein solches Modell wie folgt aus:

$$(38) \quad y_{ijk} = m + a_j + b_k + e_{ijk}$$

Dabei sind die y_{ijk} die Beobachtungen einer chemotaxonomischen Variablen zum Zeitpunkt i an Anlage $j = 1, 2, 3$ – also einschließlich Kontrolle – auf Stufe $k = 0, 1$ des Antibiotikums, m das Gesamtmittel, a_j der Effekt der Anlage j und b_k der Effekt der Stufe k des jeweiligen Antibiotikums. Mit e_{ijk} wird der zufällige Fehler der i -ten Beobachtung an Anlage j und Antibiotikastufe k bezeichnet, wobei hier für e_{ijk} gilt:

$$(39) \quad e_{ijk} = xe_{(i-1)jk} + n_i \text{ für ein } j, \forall k$$

Dabei ist x ein fester Faktor für alle e_{ijk} , der den Zusammenhang zum zeitlichen Vorgänger beschreibt. Das hier bestimmte n_i soll dann normal verteilt mit Mittelwert 0 sein (s. auch Vonesh und Chinchilli 1997).

Um dieses lineare Modell für wiederholte Messungen allerdings sinnvoll anpassen zu können, werden mehr Messungen benötigt, als die in den Versuchen aufgrund der für die chemotaxonomischen Messungen benötigten Schlammengen möglich waren. Außerdem gab es auch ein Interpretationsproblem der Effekte der direkten Aufnahme der Kontrolle in das Modell. Auch die Einflussgrößen abgesehen vom Antibiotikum sollten nur in ihrem Unterschied zur Kontrolle eingehen.

Deshalb wurde das Modell der Differenzen zur Kontrolle vorgeschlagen. In diesem Modell werden die gemessenen Größen durch Abziehen der in der Kontrolle gemessenen Werte zu dieser Kontrolle in Relation gesetzt. Wenn zwei Kontrollen zur Verfügung standen, wurde eine davon als eigentliche Kontrolle verwendet und die Werte aus dieser Anlage wurden auch von den Werten der zweiten Kontrolle abgezogen.

Gruppierung der Antibiotika

Aufgrund der langen Versuchsdauer von etwa 12 Wochen inklusive Auswertung und der 11 zu testenden Antibiotika wurde festgestellt, dass ein vollständiger Versuchsplan mit allen zu testenden Antibiotika als einzelne Behandlungen zeitlich nicht durchführbar ist. Diese Feststellung führte zu der Entscheidung, eine Gruppierung der Antibiotika nach Wirkspektren vorzunehmen. So entstand die in der folgenden Tabelle dargestellte Einteilung in zwei wesentliche Gruppen, nämlich in Effekt nur auf gram-positive Bakterien und Breitbandantibiotika und Metronidazol als einziges Antibiotikum, das gegen Anaerobier wirkt. Deshalb wird dieses Antibiotikum in der abschließenden Gesamtauswertung nicht berücksichtigt.

Tab. 70: Einteilung der Antibiotika nach Wirkspektren

Antibiotikum	Gruppe	Einteilung	Wirkspektrum
Amoxicillin	Penicilline	gram+	Streptokokken, Gonokokken, Meningokokken, Diphtheriebakterien, Spirochäten, Haem. influenzae
Cefuroxim	Cephalosporine	Breitband	fast alle gramnegativen Stäbchen, Streptokokken, Gonokokken, Meningokokken, Haem. Influenzae, E. coli, Klebsiellen, Proteus, Acinetobacter
Chlortetracyclin	Tetracycline	Breitband	
Clindamycin	Lincosamide	gram+	Streptokokken, Pneumokokken, Staphylokokken, Bacterioides fragilis
Erythromycin	Makrolide	gram+	Staphylokokken, Streptokokken, Pneumokokken, Corynebact. diphtheriae, Mykoplasmen, Legionellen, Chlamydien, Campylobacter
Gentamicin	Aminoglykoside	Breitband	Staphylokokken
Metronidazol	Nitroimidazole	Anaerobier	
Ofloxacin	Chinolone	Breitband	Haem. Influenzae, Salmionellen, Shigellen, Yersenia, Campylobacter, Neisserien, Legionellen,
Sulfamethoxazol		Breitband	
Tetracyclin	Tetracycline	Breitband	Mykoplasmen, Chlamydien
Vancomycin	Glykopeptide	gram+	Staphylokokken, Enterokokken, Clostridium difficile, Corynebact. jeikeium

Jahreszeitliche Variation

Der Belebtschlamm unterliegt einer jahreszeitlichen Veränderung. Diese Veränderung ist nicht nur auf unterschiedliche Temperaturen, sondern auch durch die unterschiedliche Zusammensetzung des Abwassers bedingt. Da die Zusammensetzung des Animpfschlammes auch einen Einfluss auf die Population nach der Einfahrphase haben kann, soll dies als weiterer Effekt berücksichtigt werden.

Es ist aufgefallen, dass es in beiden Hauptgruppen einige Paare von sehr ähnlich wirkenden Antibiotika gibt. Deshalb wurde entschieden je ein Antibiotikum aus diesen Paaren im Sommerhalbjahr, d. h. im Zeitraum zwischen April und September, einzusetzen und eines im Winterhalbjahr, also zwischen Oktober und März.

Die folgende Tabelle gibt die Paare und ihre Einteilung in die Zeiten wieder, dabei wurde zufällig entschieden, welches Antibiotikum aus den Paaren im Sommer und welches im Winter eingesetzt wurde. Die Zahlen in Klammern geben die Versuchsnummer an, die den Stoffen später zugewiesen wurde. Die Zuteilung der übrigen

Antibiotika auf die Zeiten geschah ebenfalls zufällig, um jegliche Verzerrung durch bewusste Kombinationen zu vermeiden.

Tab. 71: Einteilung von Antibiotika Paaren in Sommersversuch / Wintersversuch

Sommerversuch	Wintersversuch
Clindamycin (4)	Erythromycin (3)
Chlortetracyclin (4)	Tetracyclin (2)
Ofloxacin (1)	Gentamycin (3)
Vancomycin (1)	Vancomycin (5)

Planerstellung

Folgende Randbedingungen wurden im Plan berücksichtigt:

- Der Effekt der beiden Hauptgruppen sollte bestimmbar sein.
- Der Unterschied zwischen Sommer und Winter sollte bestimmbar sein.
- Es standen vier Kläranlagen parallel zur Verfügung und sollten auch genutzt werden.
- Insgesamt erlaubte der Zeitrahmen fünf Testperioden.

Da nur zwei Hauptgruppen zu unterscheiden waren, genügt es, drei Anlagen für das Hauptziel der Unterscheidung nach Wirkspektren der Antibiotika zu verwenden. Dadurch wurde es möglich, je Testperiode noch eine Anlage entweder für ein weiteres Breitband-Antibiotikum, die die größere Anzahl der untersuchten Stoffe stellen, zu verwenden oder für weitere Informationen oder Wiederholungen zu nutzen.

Zwei der noch zu verteilenden Anlagen wurden genutzt, um die Grundannahme zu überprüfen, dass sich die Anlagen ohne Wirkstoffzugabe gleich entwickeln. Auch dies soll mögliche Unterschiede im Sommer und im Winter berücksichtigen, so dass für einen Versuch im Sommer und einen im Winter eine doppelte Kontrolle eingeplant wurde. Es verblieben noch zwei Kläranlagen, eine im Sommer und eine im Winter, von denen eine zur Wiederholung des Versuchs mit Vancomycin genutzt wurde.

Verbesserung des Versuchsablaufs

Zur Verbesserung der Kontrolle der Temperatur im Belebtecken wurden Aquariumheizungen eingesetzt. Diese Veränderung im Versuchsaufbau war notwendig geworden, da bei älteren Daten ein Temperaturtrend als wesentlicher Einfluss identifiziert wurde und durch starke Korrelation zur Antibiotikazugabe ein Effekt selbiger nicht

mehr identifizierbar war. Diese Heizungen ermöglichten es die Temperaturschwankungen nach unten zu begrenzen. Für die Versuche wurden durchweg 20°C eingestellt, so dass die Variation im Sommer unter einer Schwankungsbreite von etwa 3°C blieb und im Winter nur im Rahmen der Regelgenauigkeit der Aquariumheizung lag. Der Unterschied zwischen Winterversuchen und Sommersversuchen wurde damit nur noch durch den verschiedenen Animpfeschlamm erzeugt.

Planauswertung

Die Versuche wurden einzeln durch lineare Modelle auf den Differenzen zur Kontrolle ausgewertet. Dies soll zunächst einen unmittelbaren Eindruck vermitteln, ob sich ein Effekt des jeweils geprüften Antibiotikums auf die Chemotaxonomie finden lässt. Zu diesem Zweck wurde für jede chemotaxonomische Variable mit Hilfe der schrittweisen Regression die Kombination aus Einflussgrößen gesucht, die den größtmöglichen Teil der Variation erklärt.

Der ganze Versuchsplan wurde abschließend zusammenfassend ausgewertet. Dazu wurden zunächst über alle Beobachtungen der chemotaxonomischen Werte während der Zugabe der Antibiotika auf den Testanlagen und den zugehörigen Kontrollen gemittelt. Es wurde dann ein Modell im Faktor „Beeinflussung“ mit den Stufen „kein“ (Kontrolle), „gram+“ und „BreitbandAB“ und dem Faktor „Jahreszeit“ mit den Stufen „Winter“ und „Sommer“. Da die Stufe „kein“ des Faktors „Beeinflussung“ als Basisstufe im dann angepassten Varianzanalysemodell verwendet wird und die Einfahrphase mit ihrer größeren Variation herausgenommen wird, ist eine Differenzenbildung hier nicht notwendig.

Ergebnisse der Einzelversuche

Bei den meisten Einzelauswertungen der chemotaxonomischen Messungen für die Einzelauswertungen ließen sich keine geeigneten Modelle zur Erklärung der beobachteten Variation finden. Dies bedeutet nicht, dass es keine Effekte der Einflussgrößen gab, sondern dass diese Effekte in der Gesamtvariation untergegangen sind. Besonders interessant war die Untersuchung der zwei Versuche mit mehr als einer Kontrollanlage. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass bei der Verwendung aller Daten aus den Anlagen nur dann ein Zusammenhang zwischen den betrachteten Einflussgrößen und den chemotaxonomischen Parametern nachzuweisen war, wenn auch für die zweite Kontrolle eine Behandlung angenommen wurde. Dies bedeutet

nichts anderes, als dass sich unbehandelte Anlagen nach Ende der Einfahrzeit offenbar signifikant unterschiedlich entwickeln. Dadurch wird aber die Grundannahme des Modells „Differenzen zur Kontrolle“ in Frage gestellt. Dieses Modell basiert auf der Annahme, dass sich auch die chemotaxonomischen Variablen in allen Anlagen gleich entwickeln würden, wenn keine Beeinflussung durch Testsubstanzen stattfinden würde. Von dieser Feststellung ist die abschließende Gesamtauswertung nicht betroffen, da dort keine derart restriktiven Annahmen getroffen wurden.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die chemotaxonomischen Variablen, für die in den jeweiligen Versuchen überhaupt eine Anpassung mit einem $R^2_{adj.} > 0.3$ gefunden wurde und welche Einflussgrößen und Wechselwirkungen in den jeweiligen Modellen enthalten sind.

Tab. 72: Chemotaxonomische Variablen in Modelkläranlagenversuchen

Antibiotikum	Beeinflusste Variab.	Einflüsse im Modell	adj. R^2
Amoxicillin	Q9	O ₂ , pH-Wert, SVI	0,51
	Q10	pH-Wert, Antibiotikum	0,34
	M9H2	Temperatur, SVI, Antibiotikum , Wechselwirkung Temp./SVI	0,55
	M10M9	pH-Wert, Temperatur, Wechselwirkung pH-Wert/Temp.	0,31
	HPUT	pH-Wert, SVI, Antibiotikum	0,59
	CAD	O ₂ , Antibiotikum	0,46
Cefuroxim	Q9	O ₂ , SVI, Antibiotikum	0,87
	HPUT	Temperatur, Antibiotikum	0,37
Chlortetracyclin	Q8	O ₂ , SVI	0,35
	M8H2	SVI	0,65
	HPUT	SVI	0,31
	DAP	Temperatur	0,37
	PUT	pH-Wert, Temperatur	0,45
	CAD	pH-Wert, Temperatur	0,37
	HSPD	Temperatur	0,34
Clindamycin	M6	O ₂ , pH-Wert, SVI	0,86
	M7	O ₂	0,41
	M8	O ₂ , Antibiotika	0,44
	M8H2	O ₂ , pH-Wert	0,79
	M9M8	O ₂ , pH-Wert, SVI	0,84
	M10M9	Temperatur, Antibiotikum , Wechselwirkung Temp./Antibiotikum	0,77
	M9H4	pH-Wert, Antibiotikum	0,73
	HPUT	O ₂ , pH-Wert, Temperatur, SVI, Wechselwirkung pH-Wert/Temp.	0,71

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

Antibiotikum	Beeinflusste Variab.	Einflüsse im Modell	adj. R²
Erythromycin	Q9	pH-Wert, SVI	0,63
	Q10	pH-Wert, SVI	0,58
	M6	O ₂ , SVI, Antibiotikum , Wechselwirkung SVI/Antibiotikum	0,93
	M7	O ₂ , SVI, Antibiotikum , Wechselwirkung SVI/Antibiotikum	0,81
	M8	O ₂ , SVI, Antibiotikum , Wechselwirkung SVI/Antibiotikum	0,75
	M8H2	O ₂ , SVI, Antibiotikum , Wechselwirkung SVI/Antibiotikum	0,87
	M9M8	O ₂ , SVI, Antibiotikum , Wechselwirkung SVI/Antibiotikum	0,9
	M9H2	pH-Wert, SVI, Antibiotikum , Wechselwirkung SVI/Antibiotikum	0,82
	M10M9	SVI, Antibiotikum , Wechselwirkung SVI/Antibiotikum	0,81
	M9H4	SVI, Antibiotikum , Wechselwirkung SVI/Antibiotikum	0,85
	DAP	SVI, Antibiotikum , Wechselwirkung SVI/Antibiotikum	0,67
	PUT	pH-Wert	0,33
	CAD	pH-Wert, SVI, Wechselwirkung SVI/pH-Wert	0,42
	SPD	pH-Wert	0,49
Gentamycin	Q10	O ₂	0,39
	HPUT	pH-Wert, Temperatur, SVI	0,71
	DAP	O ₂ , pH-Wert, Wechselwirkung O ₂ /SVI	0,84
	PUT	pH-Wert, Temperatur, Antibiotikum , Wechselwirkung pH-Wert/Antibiotikum	0,74
	SPD	Temperatur	0,36
Metronidazol	M6	O ₂ , Antibiotikum	0,41
	HPUT	O ₂ , pH-Wert, Antibiotikum	0,59
Ofloxacin	Q8	O ₂ , Antibiotikum	0,85
	Q9	O ₂ , pH-Wert, Antibiotikum , Wechselwirkung O ₂ /pH-Wert	0,65
	M7	SVI	0,46
	M8	Antibiotikum , Heizer	0,5
	M8H2	pH-Wert, Antibiotikum	0,39
	M10M9	pH-Wert, Antibiotikum , Heizer, Wechselwirkung pH-Wert/Heizer	0,48
	M9H4	pH-Wert, Antibiotikum	0,46
	PUT	O ₂ , Antibiotikum	0,38
	HSPD	O ₂ , Temperatur, SVI, Antibiotikum , Wechselwirkungen O ₂ /Antibiotikum, Temperatur/SVI, Temperatur/Antibiotikum	0,98
Tetracyclin	DAP	O ₂ , pH-Wert, Temperatur, Wechselwirkung: O ₂ /pH-Wert	0,52
	HSPD	Temperatur, SVI, Antibiotikum , Wechselwirkung Temp./SVI	0,59

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

Antibiotikum	Beeinflusste Variab.	Einflüsse im Modell	adj. R ²
Sulfamethoxazol	Q8	pH-Wert	0,32
	Q10	Antibiotikum	0,31
	M10M9	pH-Wert	0,36
	M9H4	Antibiotikum	0,53
	PUT	pH-Wert	0,47
	SPD	pH-Wert, Temperatur, Antibiotikum , Wechselwirkungen pH-Wert/Temperatur, pH-Wert/Antibiotikum	0,74
	HSPD	pH-Wert, Antibiotikum , Wechselwirkung pH-Wert/Antibiotikum	0,5
Vancomycin 1. Versuch	Q8	Antibiotikum	0,49
	Q9	Antibiotikum , pH-Wert	0,42
	Q10	Antibiotikum	0,35
	M8H2	Antibiotikum , pH-Wert	0,36
	M10M9	O ₂ , pH-Wert, SVI, Heizer, Antibiotikum	0,76
	M9H4	O ₂ , pH-Wert, Temp., SVI, Antibiotikum , Wechselwirkungen pH/SVI, pH/Temp	0,99
	HPUT	O ₂ , Temperatur	0,55
	PUT	Heizer	0,32
Vancomycin 2. Versuch (Wdh.)	M9H4	Antibiotikum	0,3
	HPUT	Temperatur, SVI	0,32
2. Kontrolle 1. Versuch	Q9	Temperatur, Testphase , Heizer	0,37
	Q10	Temperatur, Testphase , Heizer	0,73
	M6	Temperatur, SVI	0,33
	M8	SVI	0,4
	M9M8	pH-Wert, Testphase	0,53
	M10M9	pH-Wert, Heizer	0,83
	HPUT	O ₂ , pH-Wert, Testphase	0,55
	PUT	O ₂ , Temperatur, Heizer	0,65
2. Kontrolle 2. Versuch	M7	O ₂ , SVI	0,36
	M9M8	Temperatur, SVI, Testphase	0,33
	M10M9	O ₂ , Temperatur, SVI	0,49
	M9H4	pH-Wert	0,44
	HPUT	Temperatur, Testphase	0,41
	DAP	Testphase	0,34

Wenn das jeweilige Antibiotikum als Einfluss erkannt wurde, ist es hervorgehoben. Aufgrund der Ergebnisse der Versuche mit mehreren Kontrollen heißt dies allerdings

nicht, dass dieses Antibiotikum einen Effekt auf die Bakterienpopulation hat, sondern nur dass sich die Population nach Ende der Einfahrphase deutlich von der Kontrolle entfernt hat.

Besonders auffällig sind die Unterschiede zwischen den Modellen in den beiden Vancomycin Versuchen. Es sollte allerdings angemerkt werden, dass im ersten Versuch die Aquariumheizungen fast gleichzeitig mit dem Beginn der Testphase eingesetzt wurden, so dass sich die Effekte dieser beiden Einflüsse nicht effektiv trennen ließen. Dies kann bedeuten, dass der Einsatz der Heizer den Einfluss ausgeübt hat, der nun dem Antibiotikum zugewiesen wird.

Weiter fällt auf, dass der Schlammvolumenindex häufig mit den Änderungen der chemotaxonomischen Variablen korreliert. Dies kann darauf hindeuten, dass die Bildung von Schwimmschlamm die wahrscheinlichere Ursache der Änderung in diesen Variablen ist. Die Entwicklung von Schwimmschlamm ist nicht hinreichend erforscht, um Ursachen benennen zu können.

Ergebnisse der Gesamtauswertung

Bei der Auswertung des Gesamtversuchsplans ergaben sich ebenso wie bei den Einzelauswertungen keinerlei erkennbare Einflüsse der Antibiotika. Nur die Jahreszeit ergab einen relevanten Unterschied bei dem Ubichinon Q8 und den Menachinonen M6, M7, M8H2, M9M8 und M9H4. Die einzelnen Varianzanalysetafeln befinden sich in der Tabelle 72.

Als Beispiel hier das Ergebnis für das Ubichinon Q8:

<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>Pr(>F)</i>
<i>Behandlung</i>	2 1.8527e+09	9.2634e+08	0.2738	0.7645
<i>Jahreszeit</i>	1 2.1400e+11	2.1400e+11	63.2462	1.467e-06
<i>Residuals</i>	14 4.7369e+10	3.3835e+09		

Dabei gibt die Spalte *Df* an, wie viele Freiheitsgrade (Anzahl Parameter bei den Einflüssen und Anzahl Beobachtungen bei den Fehlern) benötigt bzw. vorhanden sind. Die Spalte *Sum Sq* gibt für die Einflussfaktoren die Summe der quadrierten Abstände der Gruppenmittel zum Gesamtmittel und als letzten Eintrag die Summe der quadrierten Residuen an.

Der *F value* gibt den Wert der F-Statistik zum Test der Signifikanz des Unterschiedes zwischen der Quadratsumme der Parameter und der Fehlerquadratsumme an.

Die letzte Spalte gibt schließlich die kleinste Fehlerwahrscheinlichkeit an, mit der eine Nichtsignifikanz noch abgelehnt werden könnte. Womit in diesem Beispiel klar ist, dass zum 5%-Niveau nur die Jahreszeit einen Einfluss hat.

3.3.4.3.3 FISH (Floureszenz-In-Situ-Hybridisierung)

In Abhängigkeit des eingesetzten Antibiotikums konnten zum Teil deutliche Veränderungen der Bakteriengruppen im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Kontrollanlagen ermittelt werden. In sämtlichen Versuchsreihen, die zeitlich versetzt stattfanden, wurden jeweils die mit dem Mutterschlamm in die Laborkläranlagen eingetragenen Bakterienpopulationen jeweils einem Antibiotikum ausgesetzt. In allen Versuchsreihen wurden jeweils nach 3 Wochen Vortestphase, nach 1 Woche Dosierung des Antibiotikums sowie nach insgesamt 4 Wochen Antibiotikum-Dosierung je ein Aliquot des Schlammes stabilisiert und der Gensondenuntersuchung zugeführt. Über denselben Zeitraum wurde parallel zu den mit Antibiotika behandelten Laborkläranlagen auch mindestens eine unbehandelte Kontrolllaborkläranlage mit dem gleichen Mutterschlamm betrieben und die Schlammproben zu identischen Zeitpunkten stabilisiert. Allgemein kann festgehalten werden, dass sich der eingesetzte Mutterschlamm zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Versuchsreihen (zwischen Februar 2001 und Oktober 2002) leicht in seinen Anteilen an den Bakterien-Hauptgruppen unterschied (siehe Anlagendatei Vermicon 6.5 und 6.6, in denen auch die Werte des entsprechenden Mutterschlammes ermittelt wurden). Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise auf die unterschiedlichen Jahreszeiten der jeweiligen Schlammnahmen oder unterschiedliche Prozessführung der Kläranlage zurückführen. Weiterhin ließ sich feststellen, dass sich schon z. T. nach 3 Wochen Adaptionsphase des Mutterschlammes in den 2 oder 3 parallel betriebenen Laborkläranlagen leichte Unterschiede der Anteile der Bakterienpopulationen (max. 2%) ausgebildet hatten. Die Unterschiede der einzelnen Reaktoren untereinander lassen sich möglicherweise auf geringfügige Unterschiede in der Prozessführung der einzelnen Reaktoren zurückführen. Als deutliche Unterschiede zur jeweiligen Kontrollanlage sind daher im wesentlichen Trends der Bakteriengruppen gewertet worden, die sich stark von den Kontrollanlagen unterschieden. Dies kann sich durch eine stärkere Entwicklung einer Bakteriengruppe, aber in die gleiche Richtung (Vermehrung oder Verringerung der Population) manifestieren oder gar durch einen gegenläufigen Trend zeigen. Die FISH-Analysen der Schlämme nach Antibiotika-Dosierung zeigten für einige der eingesetzten Antibiotika geringe Verschiebungen für bestimmte Bakterienhauptgruppen,

während für andere Stoffe kaum bis keine Einflüsse auf die Bakterienzönose im Vergleich zur jeweiligen Kontrollanlage ermittelt werden konnten.

Die Bakterienhauptgruppen, die am häufigsten einen positiven bzw. negativen Trend unter Antibiotika-Einfluss unterlagen, waren meist die gram-negativen Gruppen der Alpha-Subklasse und das *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylum. Weniger häufig waren die Bakterien der Gamma-Subklasse oder die Vertreter der TM7-Gruppe betroffen. Sehr selten konnten in der Gruppe der Planctomyceten wie der gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt Einflüsse verzeichnet werden. Einige der verwendeten Antibiotika werden gezielt gegen pathogene gram-positive Bakterien eingesetzt. Ein Einfluss auf die im Klärschlamm vorhandenen gram-positiven Bakterien war aber nur sehr selten zu ermitteln. Als Ursache dafür kann angesehen werden, dass human-pathogene Bakterien, die von diesen Antibiotika abgetötet werden sollen, in signifikanter Menge nicht im Belebtschlamm zu erwarten sind und von daher entsprechend auch kaum eine Verschiebung diesbezüglich ermittelt werden dürfte. Im Folgenden werden die ermittelten Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen einzeln diskutiert. Die Ergebnistabellen befinden sich in der Anlagendatei 3.2.

Gentamycin

In der Gentamycin-Versuchsreihe ließen sich im Laufe des Versuchszeitraums v.a. für die Organismen des *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylums und der Alpha-Subklasse der Proteobakterien deutliche quantitative Veränderungen im Vergleich zur entsprechenden Kontrollanlage feststellen (Anlagendatei Vermicon 6.2). Ebenso ergaben sich in der Entwicklung der Beta-Subklasse der Proteobakterien deutliche Verschiebungen im Vergleich zur Kontrollanlage.

Während im Ausgangszustand des Versuches in beiden Anlagen dieser Versuchsreihe die Alpha-Subklasse und die Beta-Subklasse der Proteobakterien annähernd gleich stark vertreten waren, nahm der Anteil der Alpha-Bakterien in der Gentamycin-Anlage während des Versuchszeitraums signifikant ab. Nach der 4. Testwoche (3. Probe) dominierte in der Gentamycin-Anlage die Beta-Subklasse der Proteobakterien mit 32% deutlich über die Alpha-Subklasse, welche zu diesem Zeitpunkt nur noch mit 10% Anteil an der Bakteriengesamtpopulation vertreten war. Zwar war auch in der Kontrollanlage nach der 4. Testwoche eine Dominanz der Beta-Subklasse der Proteobakterien zu verzeichnen, jedoch resultierte diese aus einem stärkeren Anstieg dieser Gruppe und nicht aus einer Reduktion der Alpha-Subklasse. Der Anteil der Al-

pha-Subklasse der Proteobakterien blieb in der Kontrollanlage während des Versuchszeitraumes auf einem annähernd gleichen Niveau von 25-28%. Der Anteil der Beta-Subklasse der Proteobakterien stieg jedoch deutlich um 10% von 27% auf 37% an.

Neben der Beta-Subklasse der Proteobakterien entwickelte sich in der Gentamycin-Anlage über den Versuchszeitrahmen das *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylum zur zweitstärksten Fraktion. Diese Entwicklung ist auf die deutliche Zunahme des filamentösen Bakteriums *Haliscomenobacter hydrossis* innerhalb dieses Subphylums zurückzuführen. *Haliscomenobacter* wird durch ein hohes Schlammalter in seinem Wachstum gefördert und hat bei Sauerstofflimitation erhebliche Wachstumsvorteile. Bei diesem Organismus handelt es sich um einen bekannten Schwimm- und Blähschlammbildner. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich in der Populationszusammensetzung der Gentamycin-Anlage die deutlichsten Veränderungen bei der Alpha-Subklasse der Proteobakterien und dem *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylum zu beobachten waren. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit den aus der Literatur bekannten Angaben über die Wirkungsweise des Aminoglykosid-Antibiotikums Gentamycin korrelieren. Hier wird eine vorwiegende Hemmung der Proteinbiosynthese an der 30S Untereinheit des Ribosoms von gram-negativen Bakterien beschrieben. Es scheint, als ob die Angehörigen der Alpha-Subklasse der Proteobakterien durch die Gentamycin-Zugabe während des Versuchszeitraums in ihrem Wachstum offenbar gehemmt werden und die Wachstumsbedingungen für *Haliscomenobacter hydrossis* als Hauptvertreter des *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylums anscheinend deutlich besser werden. Ein Einfluss dieses Antibiotikums auf die Reduktion von gram-positiven Bakterien konnte zu keinem Messpunkt detektiert werden.

Tetracyclin:

Tetracycline gelten als Breitbandantibiotika. Sie wirken sowohl auf gram-positive als auch auf gram-negative Bakterien, auf Rickettsien, große Viren, Mycoplasmen und sogar auf einige Protozoen. Nach Zudosierung des Antibiotikums Tetracyclin in der zweiten Versuchsreihe konnten die deutlichsten Populationsveränderungen für das *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylum, für das Phylum TM7 sowie für die Alpha-Subklasse ermittelt werden (Anlagendatei Vermicon 6.3). Für die Alpha-Subklasse konnte über den Versuchszeitraum ein stetiger Anstieg der Anteile im Vergleich zur

Kontrollanlage analysiert werden. In der 3. Probe hatte die Alpha-Subklasse einen Wert von 22%, während der Wert für die Kontrollanlage nur bei 17% lag. Auffallend hierbei war, dass die Alpha-4 Untergruppe ebenso einen höheren Wert als in der Kontrollanlage aufwies, während die Alpha-2a Untergruppe fast identische Werte im Vergleich zur Kontrollanlage zeigte. Ebenso konnten mengenmäßige Erhöhungen über die Zeit für Vertreter der Beta-Subklasse der Proteobakterien und der Planctomyceten ermittelt werden. Die Veränderungen bei beiden Gruppen ähnelten allerdings dem Verlauf der Kontrollanlage, wobei nach der 4. Testwoche in der Tetracyclin-Anlage die Menge der Bakterien der Beta-Subklasse höher (37% Kontrolle: 32%) und die Menge der Planctomyceten niedriger (7%; Kontrolle: 9%) lagen als in der Kontrollanlage. Während die Populationen des *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylums und des Phylums TM7 bis nach der 4. Testwoche der Versuchsreihe in der Kontrollanlage eine stetige Zunahme der Populationsstärken aufwiesen, zeigte sich bei beiden Bakteriengruppen unter Tetracyclindosierung zunächst ein Anstieg und dann wieder ein signifikanter Rückgang. Für *Haliscomenobacter hydrossis*, der in der Gentamycin-Anlage über den Versuchszeitraum deutlich zugenommen hatte (von 10% auf 22%), konnte nur ein geringer Anstieg von 4% auf 7% festgestellt werden. Die bekannte Wirkweise dieses Antibiotikums auch auf gram-positive Bakterien, konnte nicht durch ein stetiges Absinken der Bakterien mit hohem DNA G+C-Gehalt (HGC) über den Analysenzeitraum detektiert werden. Diese pendelten sich von der 2. Probe bis zur 3. Probe stabil zwischen 4% und 5% ein, allerdings lagen die Werte während des Versuchszeitraums unter den Werten der Kontrollanlage, die zuletzt bei 7% lagen.

Chlortetracyclin:

Das Antibiotikum Chlortetracyclin gehört wie Tetracyclin zur Wirkstoffgruppe der Tetracycline und bewirkt eine Hemmung der ribosomalen Proteinsynthese der Bakterien. Die Ergebnisse, die Anlagendatei Vermicon 6.4 zu entnehmen sind, zeigten im Vergleich zur Kontrollanlage dieser Versuchsreihe vom Juni/Juli 2002 keine signifikanten Populationsverschiebungen. Lediglich die Gruppe der Alpha-Subklasse zeigte eine geringfügige Abweichung zu den Verläufen der Kontrollanlage. Sie zeigte eine geringfügige Zunahme von 20% auf 21%, während die Werte in der Kontrollanlage etwas stärker von 20% auf 23% anstiegen. Dies steht im Gegensatz zur Tetracyclintestreihe, die im November/Dezember 2001 stattfand und in der eine Zunahme der

Alpha-Subklasse zu verzeichnen war. Die restlichen untersuchten Bakterienhauptgruppen zeigten keine größere Beeinflussung durch Chlortetracyclin im Vergleich zur Kontrollanlage. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Zunahme einer Bakterienpopulation unter Antibiotika-Einfluss am wahrscheinlichsten darauf zurückzuführen ist, dass eine andere Bakterienpopulation abnimmt und so bestimmte Nährstoffe nicht mehr durch den Konkurrenten verstoffwechselt werden. Als Folge stehen diese Substrate einer anderen Population zur Verfügung, die sie verstoffwechseln kann und sich besser vermehren kann. Der oder die Organismen, die möglicherweise als Gegenspieler zur Alpha-Subklasse durch das Antibiotikum gehindert werden, konnte durch diese Gruppenanalyse nicht detektiert werden. Darüber hinaus ist auch nicht auszuschließen, dass die Dosierung von Chlortetracyclin im Vergleich zu Tetracyclin zu niedrig war, um einen messbaren Effekt auf die Bakterienpopulationen der Belebtschlammprobe zu messen.

Amoxicillin:

Die Wirkung des Antibiotikums Amoxicillin verhielt sich für viele Bakteriengruppen (vor allem Alpha- und Beta-Subklasse der Proteobakterien) ähnlich wie das Antibiotikum Tetracyclin, obwohl hier ein völlig anderer Bereich in der Bakterienzelle beeinflusst wird (Anlagendatei Vermicon 6.3). Amoxicillin zeichnet sich im Gegensatz zu Tetracyclin und Gentamycin durch eine Hemmung der Transpeptidasen aus, die für die Aminosäurequervernetzung bei der Zellwandsynthese verantwortlich sind. Allerdings konnten einige Verschiebungen bei den Vertretern der gram-positiven Bakterien und der Gamma-Subklasse im Vergleich zur Kontrollanlage festgestellt werden.

Nach einem anfänglich hohen Wert der Bakterien der Gamma-Subklasse vor Beginn der Dosierung von 9%, reduzierte sich der Anteil der Gruppe deutlich auf 2% nach der 1. Testwoche. In der 4. Testwoche dieser Versuchsreihe scheint sich diese Population aber wieder erholt zu haben, denn der quantifizierte Wert stieg wieder auf 5% an, was deutlich über dem Wert in der Kontrollanlage lag (1%). Ein negativer Einfluss dieses Antibiotikums auf gram-positive Bakterien mit einem hohen DNA G+C-Gehalt ließ sich anhand der ermittelten Werte zeigen. Nach anfänglich ermittelten 8% vor Beginn der Dosierung nahm der Anteil dieser Gruppe an der Gesamtpopulation bis nach der 4. Testwoche auf 2% ab, während in der Kontrollanlage der Wert nach der 4. Testwoche relativ unverändert bei 7% lag.

Clindamycin:

Clindamycin gehört zur Wirkstoffgruppe der Lincosamide. Es bindet an die 50S-Untereinheit der Ribosomen und unterbricht so die Proteinsynthese. Zum Wirkungsspektrum gehören einerseits gram-positive Bakterien (insbesondere Staphylokokken, welche zu den gram-positiven Bakterien mit niedrigem DNA G+C-Gehalt gehören) und andererseits einige anaerob wachsende Stäbchen wie z. B. die meisten Stämme von *Bacteroides fragilis*, die zum *Cytophaga-Flexibacter* Subphylum gehören.

Clindamycin beeinflusste nur in geringem Maße die Bakterienzusammensetzung des Schlammes. Hierzu gehörten die Alpha-Subklasse und die gram-positiven Bakterien mit einem hohen DNA G-C-Gehalt (HGC). Mit Dosierung von Clindamycin ging eine Abnahme der Alpha-Subklasse (von 22% auf 18%) gegenüber der Kontrollanlage einher, deren Werte für die Alpha-Subklasse von 20% auf 23% zunahm (siehe Anlagendatei Vermicon 6.4). Des Weiteren konnte ein geringfügig positiver Einfluss auf die gram-positiven Bakterien mit einem hohen DNA G+C-Gehalt verzeichnet werden. Während die Anteile in der Kontrollanlage über den Versuchszeitraum von 8% über 7% auf 9% relativ konstant blieben, zeigten die Werte in der Clindamycin-Anlage eine Zunahme von 6% auf 8%.

Erythromycin:

Erythromycin gehört zur Wirkstoffgruppe der Makrolide und ist dadurch charakterisiert, dass es die Proteinsynthese durch Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen hemmt. Anwendung findet Erythromycin vorwiegend gegen gram-positive Bakterien sowie einige *Legionella*-Arten.

Die deutlichsten Veränderungen nach der Zugabe des Antibiotikums Erythromycin konnten für die Bakterien des *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylums sowie für die Alpha-Subklasse ermittelt werden, deren Anteile im Gegensatz zur Kontrollanlage (Zunahme von 25% auf 28%) von 21% auf 18% im Versuchsverlauf abnahmen (Anlagendatei Vermicon 6.5).

In der Bakteriengruppe des *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylums konnte ein positiver Einfluss durch das Antibiotikum nachgewiesen werden. In der Kontrollanlage lagen die Werte in etwa auf einem konstanten Niveau bei 10%, wohingegen in der Erythromycin-Anlage im Versuchszeitraum eine gleichmäßige Zunahme von 13% auf 17% stattfand.

Obwohl in der Literatur die Hemmung gram-positiver Bakterien durch das Erythromycin beschrieben ist, konnte dies für die Belebtschlammpopulation des Versuchsansatzes nicht gezeigt werden. Das Gegenteil wurde beobachtet, denn die Anteile der HGC-Gruppe stiegen sogar leicht an. Als Erklärung kann hier wiederum angeführt werden, dass die pathogenen gram-positiven Bakterien, gegen die das Antibiotikum eingesetzt wird, i.d.R. in Belebtschlammproben nicht vorkommen sollten.

Bei den Bakterien der Beta-Subklasse konnte zwar bei der Gegenüberstellung von Kontrollanlage und Antibiotika-Anlage im Trend keine Veränderung aufgezeigt werden, jedoch fiel auf, dass durch die Zudosierung des Erythromycin längst nicht ein Anstieg von 10% wie in der Kontrollanlage zu beobachten war, sondern nur von 5%.

Metronidazol:

Anhand der Ergebnisse aus der Metronidazol-Dosierung konnten Veränderungen der Anteile für die Bakterien der Alpha-Subklasse, der gram-positiven Bakterien mit einem hohen DNA G+C-Gehalt, der Planctomyceten sowie der Bakterien des *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylums ermittelt werden (Anlagendatei Vermicon 6.5). Metronidazol gehört zur Wirkstoffgruppe der Nitroimidazol-Derivate. Der Wirkungsmechanismus ist eine Reaktion der Nitro-Derivate mit den Basen der DNA. Es kommt dadurch zu einer Schädigung der DNA-Stränge. Dieses Antibiotikum richtet sich sowohl gegen einige gram-positive als auch gram-negative Bakterien und auch gegen einige Parasiten. Unter Metronidazol-Einfluss konnte eine Erniedrigung des Bakterienanteils der Alpha-Subklasse im Vergleich zur Kontrollanlage festgestellt werden. Es konnte eine Abnahme um 5% ermittelt werden, wohingegen die Werte der Kontrollanlage leicht von 25% auf 28% anstiegen.

Eine Zunahme konnte für die Bakteriengruppe des *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylums unter Metronidazol Einfluss beobachtet werden. Dabei konnte während des Versuchszeitraumes ein Anstieg von 12% auf 17% verzeichnet werden. In der Kontrollanlage dagegen blieb der Wert für das *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylum relativ konstant bei 10%. Weiterhin konnte durch Zugabe von Metronidazol ein leicht positiver Einfluss auf gram-positive Bakterien mit einem hohen DNA G+C-Gehalt verzeichnet werden. Hier stiegen die Anteile leicht von 6% auf 8%, wohingegen die Werte der Kontrolllaborkläranlage keine Veränderungen zeigten und annähernd bei 5% blieben.

Cefuroxim:

Das Antibiotikum Cefuroxim gehört zur Wirkstoffgruppe der β -Lactam-Antibiotika und wird in die Gruppe der Cephalosporine der zweiten Generation eingeordnet. Cefuroxim hemmt die Synthese der Bakterienzellwand und wirkt somit auf Bakterien in der Teilungsphase bakteriozid. Anwendung findet das Breitbandantibiotikum vorwiegend gegen gram-positive Staphylokokken und gram-negative Bakterien (viele Enterobacteriaceen).

Die deutlichsten Veränderungen nach der Zugabe des Antibiotikums Cefuroxim konnten für die Bakterien der Alpha-Subklasse sowie für die gram-positiven Bakterien mit einem hohen DNA G+C-Gehalt ermittelt werden (Anlagendatei Vermicon 6.6). Während die Alpha-Bakterien in der Kontrollanlage im Verlauf der Testphase konstant mit 17% vertreten waren, konnte in der Anlage mit Cefuroxim-Behandlung ein Anstieg um insgesamt 3% auf 20% beobachtet werden. Laut Literaturangaben erfolgt durch den Einsatz des Antibiotikums Cefuroxim eine Hemmung gram-positiver Bakterien. Dieser Einfluss konnte für Belebtschlammzönose anhand dieser Versuchsreihe bestätigt werden. Während die HGC-Gruppe im Testverlauf in der Kontrollanlage relativ konstante Anteile aufwies, ergab die Untersuchung in der Cefuroxim-Anlage eine stetige Abnahme der gram-positiven Bakterien um 2%. Die Entwicklung der Beta-Subklasse zeigte sowohl in der Kontrollanlage als auch in der Cefuroxim-behandelten Anlage den gleichen zunehmenden Trend, jedoch konnte in der Kontrollanlage nur ein Anstieg von 1% am Ende beobachtet werden, in der Antibiotika-Anlage dagegen um 4%.

Vancomycin:

Nach Vancomycin Dosierung konnten insgesamt nur sehr geringe Veränderungen der Bakterienpopulationen ermittelt werden. Lediglich für die Anteile der Alpha- und der Gamma-Subklasse konnten schwache Veränderungen detektiert werden (Anlagendatei Vermicon 6.6).

Vancomycin gehört zur Wirkstoffgruppe der Glykopeptid-Antibiotika. Der Wirkungsmechanismus ist die Hemmung der Mureinsynthese, die für die vollständige Ausbildung der Zellwand ein wesentlicher Schritt ist. Dies führt zum Absterben der Bakterien. Vancomycin wird gegen Staphylokokken, Pneumokokken, Corynebakterien und einige andere gram-positive Bakterien eingesetzt. Während die Werte der Alpha-Subklasse in der Kontrollanlage während des gesamten Versuchszeitraumes unver-

ändert bei 17% lagen, konnte man in der Vancomycin-Anlage insgesamt eine geringfügige Zunahme von 17% auf 18% beobachten. Ein deutlicherer Einfluss durch das Antibiotikum konnte für die Gamma-Subklasse festgestellt werden. In der Kontrollanlage waren auch hier die Anteile relativ konstant zwischen 7% und 8%. Dagegen zeigte die Quantifizierung der Gamma-Bakterien in der Vancomycin-Anlage im Verlauf der Testreihe einen steigenden Trend von 7% auf 9%. Die restlichen untersuchten Bakterienhauptgruppen scheinen laut der Ergebnisse nicht durch das Antibiotikum Vancomycin zumindest nicht in der verabreichten Dosierung beeinflusst zu werden.

3.3.5 Kläranlagensimulationstest OECD 303 A : 1981 mit radioaktiv markierten Substanzen

3.3.5.1 BELEBTSCHLAMM- UND VERFAHRENSPARAMETER

Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Temperatur

In Abb. 40 ist der Sauerstoffgehalt aller Tests dargestellt. Der Grenzwert von 2 mg/l wurde in wenigen Fällen für kurze Zeit infolge einer sehr hohen Biomassekonzentration im Belebungsgefäß unterschritten.

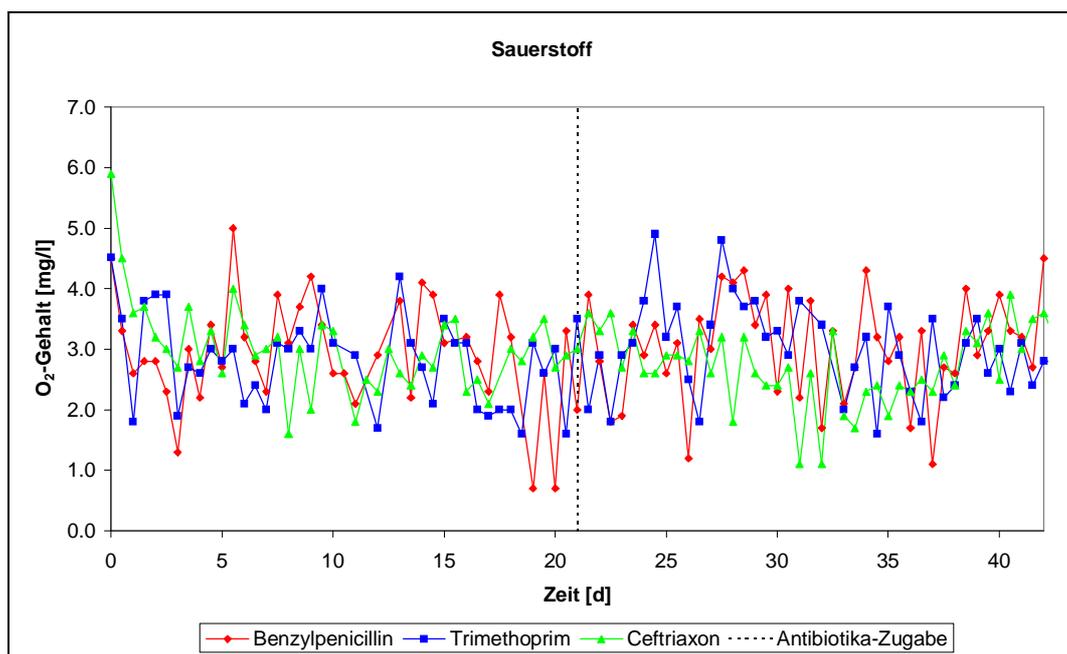


Abb. 40: Verlauf des Sauerstoffgehaltes im Belebungsgefäß

Durch die Klimatisierung des Versuchsraumes lag die Temperatur im Belebungsgefäß stets im geforderten Bereich von $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ (Abb. 41).

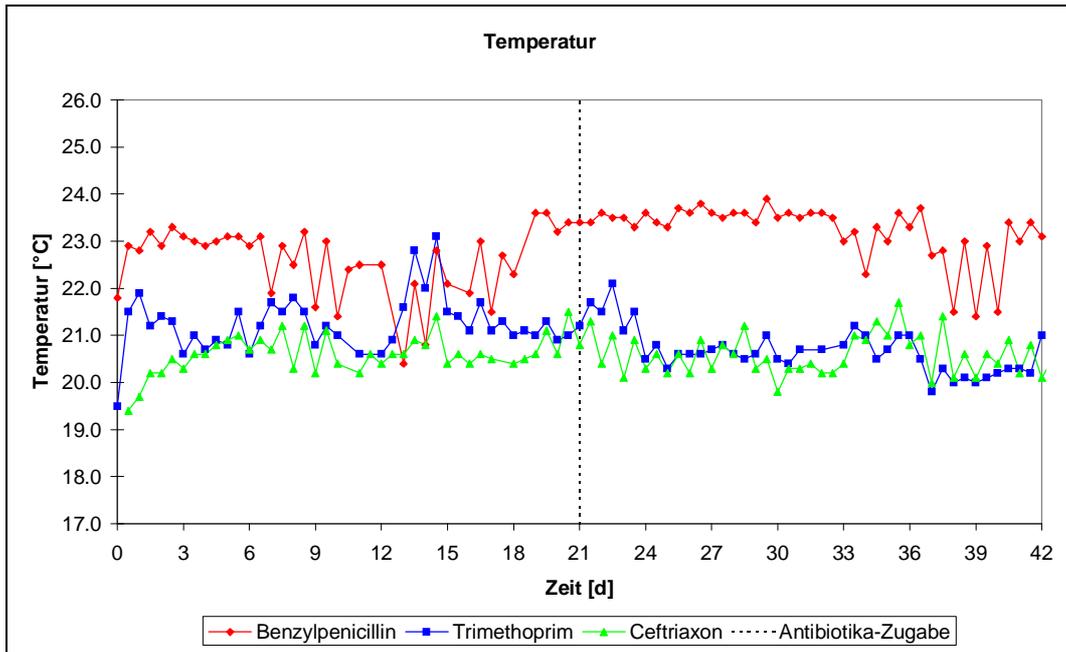


Abb. 41: Temperaturverlauf im Belebungsgefäß

Der pH-Wert lag während allen drei Simulationstests sowohl in der Einfahr- als auch in der Testphase zwischen 7,1 und 7,7 und somit innerhalb des Sollbereiches (Abb. 42).

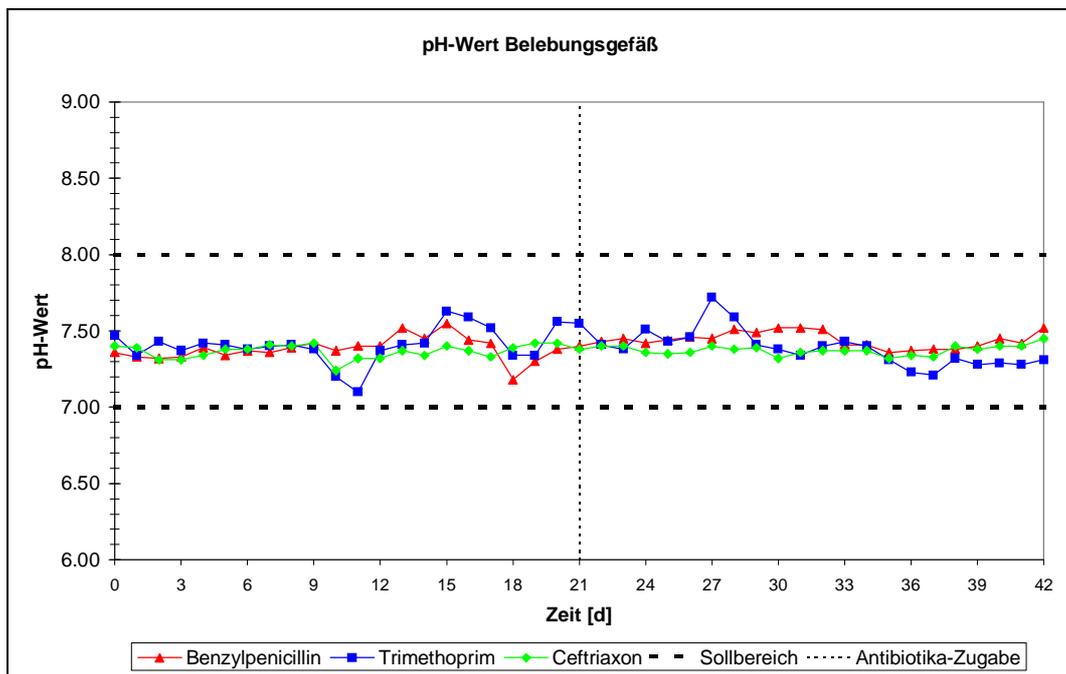


Abb. 42: Verlauf des pH-Wertes im Belebungsgefäß

Biologischer Abbaugrad / DOC-Elimination

Der biologische Abbaugrad schwankte zwischen 85 und 95%, d. h. die DOC Elimination lag dauerhaft über den geforderten 80%. Lediglich am letzten Tag des Simulationstests mit Trimethoprim wurde dieser Grenzwert unterschritten (76,9%). Dieser niedrige Wert wurde durch eine starke Trübung im Überstand des Absetzgefäßes ausgelöst, woraus hohe DOC-Werte im Ablauf der Laborkläranlage resultierten (s. Tab. 73).

Tab. 73: Mittlere DOC-Elimination in der Laborkläranlage

	Einfahrphase		Testphase	
	Mittelwert [%]	Standardabweichung [%]	Mittelwert [%]	Standardabweichung [%]
Benzylpenicillin	88,4	2,3	91,8	1,6
Trimethoprim	90,1	1,9	88,9	4,7
Ceftriaxon	89,7	1,7	91,0	1,7

Trockensubstanzgehalt

Der Trockensubstanzgehalt (TS-Gehalt) schwankte während allen Simulationstests um den Sollwert von 2,5 g/l. Bei TS-Gehalten über 2,5 g/l wurde dem Belebungsgefäß Überschussschlamm entnommen. Die Messwerte lagen zwischen 2,2 und 3,7 g/l.

Tab. 74: Mittlerer TS-Gehalt im Belebungsgefäß

	Einfahrphase		Testphase	
	Mittelwert [g/l]	Standardabweichung [g/l]	Mittelwert [g/l]	Standardabweichung [g/l]
Benzylpenicillin	2,5	0,2	2,7	0,1
Trimethoprim	3,0	0,4	2,6	0,3
Ceftriaxon	2,5	0,2	2,6	0,2

Schlammvolumen und Schlammvolumenindex

Beim Versuch mit Ceftriaxon stieg das Schlammvolumen zwischen Tag 15 und Tag 30 auf Werte um 400 ml/l an. Der Mittelwert lag bei Ceftriaxon bei 276 ml/l, bei Trimethoprim bei 218 ml/l und bei Benzylpenicillin bei 230 ml/l.

Der Schlammvolumenindex stieg im Versuch mit Ceftriaxon an zwei Messpunkten über den Grenzwert für Blähschlamm von 150 ml/g. Die nachfolgende Tabelle enthält die gemittelten Werte für den Schlammvolumenindex während der Versuche.

Tab. 75: Mittelwerte des Schlammvolumenindex

	Einfahrphase		Testphase	
	Mittelwert [ml/g]	Standardabweichung [ml/g]	Mittelwert [ml/g]	Standardabweichung [ml/g]
Benzylpenicillin	88	14	90	8
Trimethoprim	75	5	84	11
Ceftriaxon	93	35	118	26

Schlammbelastung

Die Schlammbelastung während allen drei Abbauversuchen schwankte zwischen 0,07 und 0,12 mg DOC / (mg TS · d). Die Schwankungen waren nur sehr gering, was sich an den geringen Standardabweichungen ablesen lässt.

Tab. 76: Mittlere Schlammbelastung in der Laborkläranlage

	Einfahrphase		Testphase	
	Mittelwert [mg/(mg*d)]	Standardabweichung [mg/(mg*d)]	Mittelwert [mg/(mg*d)]	Standardabweichung [mg/(mg*d)]
Benzylpenicillin	0,11	0,01	0,10	0,01
Trimethoprim	0,09	0,01	0,11	0,01
Ceftriaxon	0,10	0,01	0,10	0,01

Stickstoffparameter

Während der Testphasen aller Simulationstests konnten zeitweise erhöhte Konzentrationen an Ammonium-Stickstoff gemessen werden. Bei den Simulationstests mit Benzylpenicillin und Trimethoprim wurde der Grenzwert für Ammonium-Stickstoff (Mittelwert im Ablauf < 1 mg/l) überschritten. Die Funktionsfähigkeit war während den Testphasen aller Simulationstests jedoch gewährleistet, da alle weiteren Betriebsparameter der Laborkläranlage, insbesondere DOC-Elimination und Stickstoff(-Gesamt)-Elimination im geforderten Bereich lagen.

Tab. 77: Messwerte der Stickstoffparameter

	Einfahrphase			Testphase		
	NH ₄ ⁺ -N [mg/l]	NO ₂ ⁻ -N [mg/l]	NO ₃ ⁻ -N [mg/l]	NH ₄ ⁺ -N [mg/l]	NO ₂ ⁻ -N [mg/l]	NO ₃ ⁻ -N [mg/l]
Benzylpenicillin	3,62 ± 3,47	0,11 ± 0,09	21,5 ± 1,9	3,89 ± 3,56	0,04 ± 0,02	22,9 ± 3,6
Trimethoprim	3,83 ± 3,49	0,02 ± 0,01	19,8 ± 4,5	1,30 ± 0,95	0,03 ± 0,04	20,9 ± 4,4
Ceftriaxon	3,94 ± 3,70	1,36 ± 1,76	20,1 ± 5,4	0,67 ± 0,33	0,02 ± 0,02	20,6 ± 3,1

Tab. 78 zeigt die Gesamtstickstoff-Konzentrationen für die Zulauf-, Belebtschlamm- und Ablaufproben aller drei Simulationstests. Die Stickstoff(-Gesamt)-Elimination lag an allen Messpunkten über 93%.

Tab. 78: Gesamtstickstoffkonzentrationen in Zulauf, Belebtschlamm und Ablauf der Laborkläranlage

	Datum	Zulauf [mg N/l]	Belebtschlamm [mg N/l]	Ablauf [mg N/l]
Benzylpenicillin	30.07.2001	33,4	184,6	30,6
	03.08.2001	34,71	231,5	18,9
	08.08.2001	33,2	254,0	32,0
	10.08.2001	33,9	231,7	25,4
	13.08.2001	33,6	286,3	30,7
Trimethoprim	12.11.2001	33,7	186,3	27,4
	16.11.2001	25,0	126,9	19,0
	22.11.2001	28,4	179,2	16,1
	26.11.2001	32,7	222,2	30,5
	28.11.2001	32,9	240,8	34,6
Ceftriaxon	18.02.2002	32,7	214,4	26,4
	22.02.2002	33,9	298,6	27,1
	27.02.2002	34,4	253,2	31,6
	04.03.2002	33,7	238,6	30,3
	06.03.2002	35,8	253,5	30,6

¹⁴C-Bilanzierung

Die Ergebnisse der ¹⁴C-Bilanzierung unterscheiden sich in den drei Versuchen deutlich. Die Bilanzierung erfolgte jeweils an 5 Messpunkten während der Testphase und zwar einmal am Ende der ersten, einmal Mitte der zweiten sowie dreimal in der dritten Woche.

Die Mineralisation – gemessen als $^{14}\text{CO}_2$ – betrug bei Benzylpenicillin ca. 25%, bei Trimethoprim 0% und bei Ceftriaxon 0,4%. Entsprechend war in Bezug auf die Gesamtradioaktivität der Anteil der Aktivität im Ablauf der Laborkläranlage bei Benzylpenicillin mit 58,9% deutlich geringer als bei Trimethoprim (91,2%) und Ceftriaxon (89,0%).

Durch Probenahmen (z. B. Schlamm- und Ablaufproben) wurde der Laborkläranlage zwischen 1,2% und 5,5% der zudosierten Radioaktivität entnommen. Der bei Testende in der Anlage befindliche Teil der Aktivität war stets kleiner 10% (bezogen auf die insgesamt zudosierte Radioaktivität).

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug bei Benzylpenicillin 98,4%, bei Trimethoprim 94,8% und bei Ceftriaxon 99,7% der zudosierten Radioaktivität.

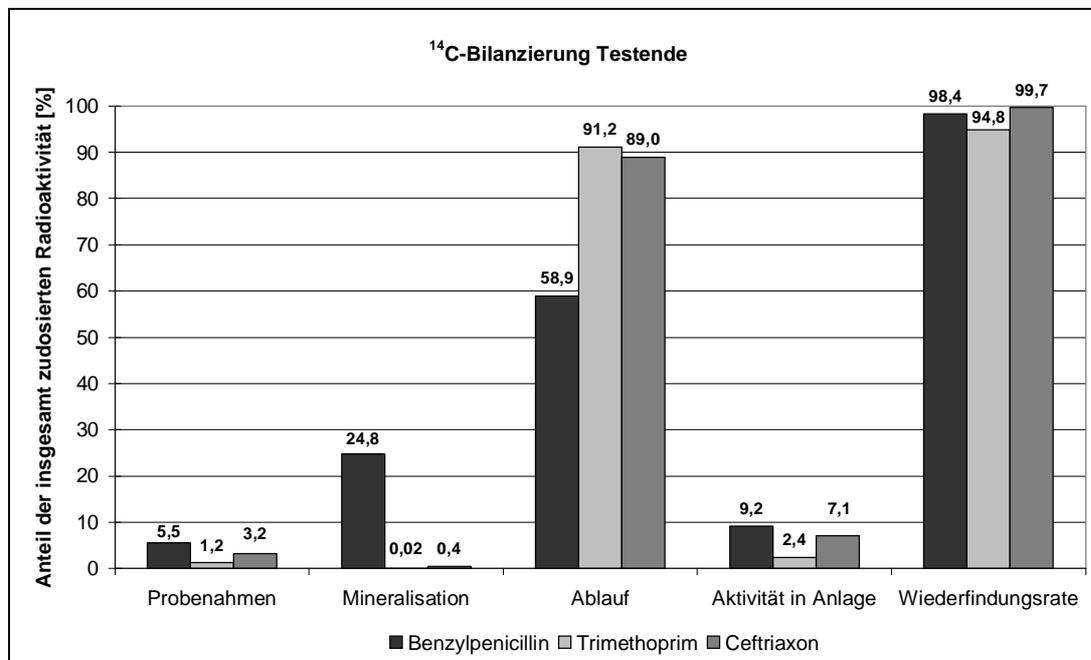


Abb. 43: Ergebnisse der ^{14}C -Bilanzierung aller drei Tests bei Testende

Zusätzlich konnte durch tägliche Messungen die Radioaktivität im Zulauf, Belebtschlamm und Ablauf der Anlage gegenübergestellt werden. In allen drei Versuchen blieb die Radioaktivität in Zu- und Ablauf über den gesamten Versuch konstant (ca. 500 dpm/ml). Bei der Radioaktivität im Belebtschlamm zeigen sich allerdings deutliche Unterschiede. Im Versuch mit Benzylpenicillin stieg die gemessene Aktivität im Belebtschlamm bis zum Testende deutlich an (bis auf über 3500 dpm/ml), im Versuch mit Trimethoprim verlief die Aktivität konstant, jedoch auf einem höheren Niveau (ca. 600 bis 700 dpm/ml), im Versuch mit Ceftriaxon stieg die Aktivität zunächst

stark an (ca. 2000 bis 2500 dpm/ml), wobei nach der Hälfte der Testphase ein Gleichgewichtszustand erreicht wurde.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass sich die Substanzen unterschiedlich im Belebtschlamm verhalten. Ob es sich hierbei um eine Adsorption der Testsubstanz oder um einen Einbau in die Schlammbiomasse handelt, wäre durch eine zusätzliche stoffspezifische Analytik zu bestimmen.

3.3.5.2 STOFFSPEZIFISCHE ANALYTIK FÜR ¹⁴C-TRIMETHOPRIM

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 79) zeigt eine Übersicht der Ablaufproben, die im Rahmen der stoffspezifischen Analytik für ¹⁴C-Trimethoprim untersucht wurden. Die Analytik wurde am 05. August 2002 am Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene in Freiburg durchgeführt.

Tab. 79: Ergebnisse der stoffspezifischen Analytik von ¹⁴C-Trimethoprim in Proben aus dem Anlagenablauf

Datum der Probenahme	Volumen [ml]	Gemessene Radioaktivität [Bq]	Nominelle Testsubstanzkonzentration [µg/l]	Gemessene Testsubstanzkonzentration [µg/l]
13.11.2001	100	452	16,3	21,3
16.11.2001	100	823	28,6	34,8
23.11.2001	100	793	29,5	22,6
26.11.2001	100	820	29,5	25,2
28.11.2001	100	819	29,6	30,2
Mittelwert aller untersuchten Ablaufproben				103,3 %

Zur Bestimmung der Nominellen Testsubstanzkonzentration in den Proben wurde eine Abschätzung unter Verwendung der vom Hersteller angegebenen spezifischen Radioaktivität (1,477 MBq/mg) vorgenommen. Dieser Abschätzung lag die Annahme zugrunde, dass das Verhältnis zwischen radioaktiver Testsubstanz und nicht markierter Testsubstanz im Ablauf der Anlage gleich dem Verhältnis im Zulauf ist (1:5,319).

Die Ergebnisse machen deutlich, dass es sich bei der im Ablauf der Anlage nachgewiesenen Radioaktivität um Trimethoprim handelt. Metabolite wurden nicht nachgewiesen.

3.3.6 Licht- und Temperaturempfindlichkeit

Der Abbau chemischer Substanzen lässt sich nicht ausnahmslos auf biologische Aktivitäten zurückführen. Einige Substanzen neigen aufgrund ihrer chemischen Struktur zur abiotischen Zersetzung, z. B. durch Hydrolyse oder einem Zerfall unter Licht (Fotolyse) bzw. Wärmeeinwirkung (Thermolyse). Verliert eine chemische Substanz auf diese Weise ihre Aktivität, spricht man auch von einer abiotischen Deaktivierung. Soll für ein Antibiotikum eine Risikoabschätzung erfolgen, so ist es wichtig, neben dem biotischen Abbau über Kenntnisse zum abiotischen Abbauverhalten der Substanz zu verfügen.

Bei 10 Antibiotika (Amoxicillin, Benzylpenicillin, Ceftriaxon, Cefuroxim, Chlortetracyclin, Metronidazol, Sulfamethoxazol, Tetracyclin, Trimethoprim und Vancomycin) wurde ihre Licht- und Temperaturempfindlichkeit untersucht. Drei Ansätze mit jeweils drei Parallelproben wurden mit sterilfiltriertem Antibiotikastandard vier Wochen lang an unterschiedlichen Orten aufbewahrt (im Wärmeschrank im Dunkeln bei 20°C, im Kühlschrank im Dunkeln bei 4°C und im Tageslicht bei Temperatur ca. 20°C). Die Proben wurden an den gleichen Tagen wie im CBT genommen und mittels HPLC vermessen.

In Tabelle 80 sind die Halbwertszeiten und Geschwindigkeitskonstanten für die untersuchten Antibiotika angegeben. Dabei muss berücksichtigt werden, dass dem Abbau eine Reaktion 1. Ordnung zugrunde gelegt wird. Da der Logarithmus der Geschwindigkeit umgekehrt proportional zur absoluten Temperatur ist (Arrhenius Gleichung), lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten bzw. Halbwertszeiten von beliebigen Temperaturen berechnen, wenn gemessene Werte bei mindestens zwei unterschiedlichen Temperaturen vorliegen. In der folgenden Tabelle werden die Werte nur für 15°C dargestellt, da die durchschnittliche Temperatur in den Kläranlagen während des Jahres bei 14-15°C liegt. Für die Abbildungen 45 bis 51 wurden alle extrapolierten Werte zwischen 4°C und 20°C herangezogen.

Tab. 80: Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten des Abbaus von Antibiotika in sterilen Ansätzen, berechnet auf 15°C

Substanz	Geschwindigkeitskonstante				Halbwertszeit			
	k [1/d]				t _{1/2} [d]			
	4°C Dunkelheit	15°C Dunkelheit	20°C Dunkelheit	20°C Licht	4°C Dunkelheit	15°C Dunkelheit	20°C Dunkelheit	20°C Licht
Amoxicillin	0,0019	0,0052	0,0081	0,0073	365	132	86	95
Benzylpenicillin	0,0096	0,0422	0,0798	0,0836	77	16	9	8
Ceftriaxon	0,0113	0,0652	0,1384	0,1731	61	11	5	4
Cefuroxim	0,0063	0,0257	0,0470	0,0651	110	27	15	11
Chlortetracyclin	0,0070	0,0109	0,0132	0,0144	99	64	53	48
Metronidazol	0,0105	0,0113	0,0116	0,0471	66	62	60	15
Sulfamethoxazol	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil
Tetracyclin	0,0108	0,0284	0,0431	0,0561	64	24	16	12
Trimethoprim	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil
Vancomycin	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil	stabil

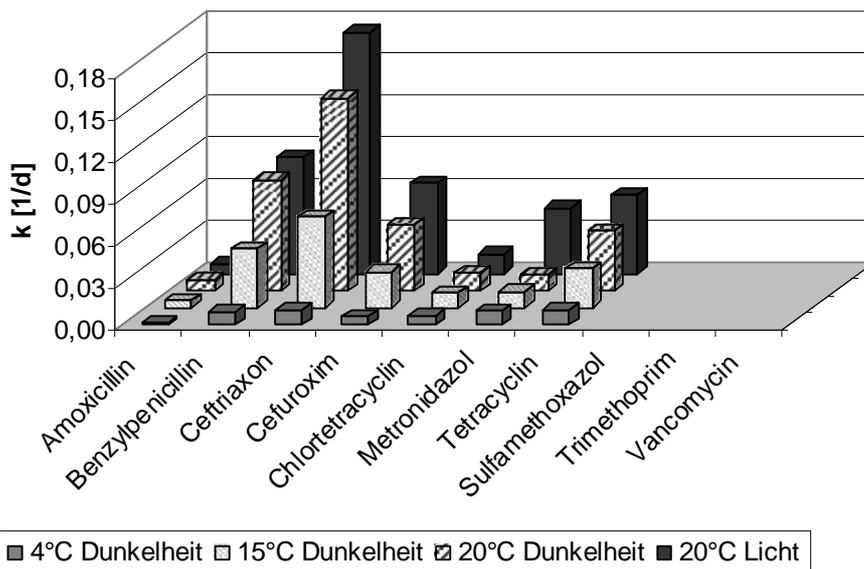


Abb. 44: Geschwindigkeitskonstanten von Antibiotika in sterilen Ansätzen

Der durchgeführte Licht- und Temperaturempfindlichkeitstest umfasst jedoch nicht alle Arten der abiotischen Elimination einer Substanz. Eine weitere Form der abiotischen Elimination kann die Adsorption der Antibiotika an z. B. Sediment und Schlamm sein (s. Kapitel 4.3.7), was zu einer Reduktion der antibakteriellen Aktivität führen kann. Allerdings besteht hier die Möglichkeit, dass die Antibiotika unter geeigneten Umständen remobilisiert werden. Darüber hinaus sind einige Antibiotika in der Lage, mit Ionen eine Komplexbildung einzugehen, wie z. B. die Komplexbildung von Tetracyclinen mit Calcium- und Magnesiumionen (Hirsch et al. 1999).

Die Konzentrationsabnahme von Amoxicillin nach 28 d bei 4°C im Dunkeln lag bei 3% bezogen auf die Ausgangskonzentration und ist demnach vernachlässigbar gering. Die Proben, die bei 20°C im Dunkeln und bei ca. 20°C im Licht gelagert wurden, zeigten dagegen nach 28 d eine deutliche Abnahme (21% bzw. 18%). Da in beiden Fällen die Konzentrationsabnahme nahezu identisch war, kann davon ausgegangen werden, dass der Lichteinfluss nur unwesentlich zum Abbau beigetragen hat und die Substanz wärmeempfindlich ist. Die Unterschiede in den Halbwertszeiten (86 bzw. 95 d, s. Tab. 80) sind wohl auf die Extrapolation zurückzuführen. Die Halbwertszeit im CBT (Dunkelheit, 20°C) lag für Amoxicillin bei 7 d, also deutlich unter den Ergebnissen aus Sterilansätzen mit gleichen Bedingungen (86 d). Es ist anzunehmen, dass die Elimination im Testansatz entweder durch Adsorption an Gefäß- und Bakterienzellwände zustande kam oder durch biologische Prozesse, welche ohne messbaren Sauerstoffverbrauch abgelaufen sind. In beiden Tests wurde während der analytischen Bestimmung ein Metabolit der Substanz beobachtet, wobei nicht klar ist, ob dieser weiterhin eine antibiotische Wirkung besitzt. Dieser Metabolit besitzt eine kürzere Retentionszeit, d. h. ist polar. Man kann davon ausgehen, dass der Metabolit durch eine Oxidation des Antibiotikums entstanden ist. Gleiches gilt auch für die anderen Antibiotika, bei denen ein oder sogar mehrere Metabolite festgestellt wurden. Für die Aktivierungsenergie der Zerfallsreaktion im Licht- und Temperaturempfindlichkeitstest ergab sich ein Wert in der Größenordnung von etwa 61 kJ/mol. Nach Harris (1982) liegen die Aktivierungsenergien für die Hydrolyse von organischen Substanzen üblicherweise in der Größenordnung von 60 kJ/mol bis 100 kJ/mol mit einer Häufung im Bereich von 70 bis 90 kJ/mol.

Da zur Bestimmung der Funktion $k(T)$ nur zwei Messwerte (4°C und 20°C) zur Verfügung standen, ist die Bestimmung der Aktivierungsenergie sowie der Halbwertszeit bei den Temperaturen dazwischen für alle Stoffe (s. Abb. 45 bis 51) lediglich eine

Abschätzung. Zur genaueren Betrachtung müssten mehr Messungen durchgeführt werden.

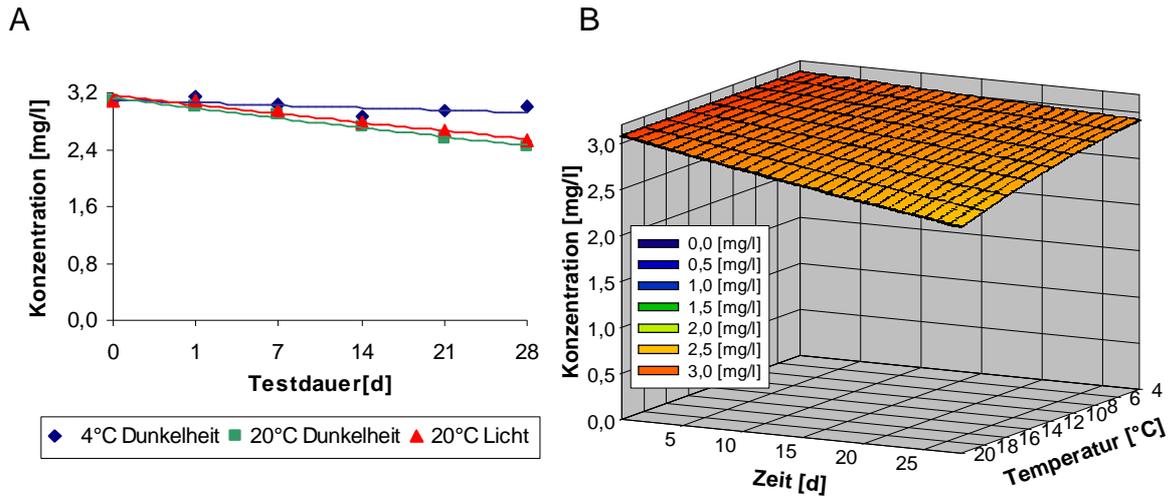


Abb. 45: A: Stabilitätsprofil von **Amoxicillin** unter drei unterschiedlichen Bedingungen (nichtlineare Regression: $y = a \cdot \exp(-b \cdot x)$, Reaktion der 1. Ordnung); B: Simulation des Abbauverhaltens von **Amoxicillin** mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung und den Abbauraten der Substanz bei 4°C und 20°C in Dunkelheit

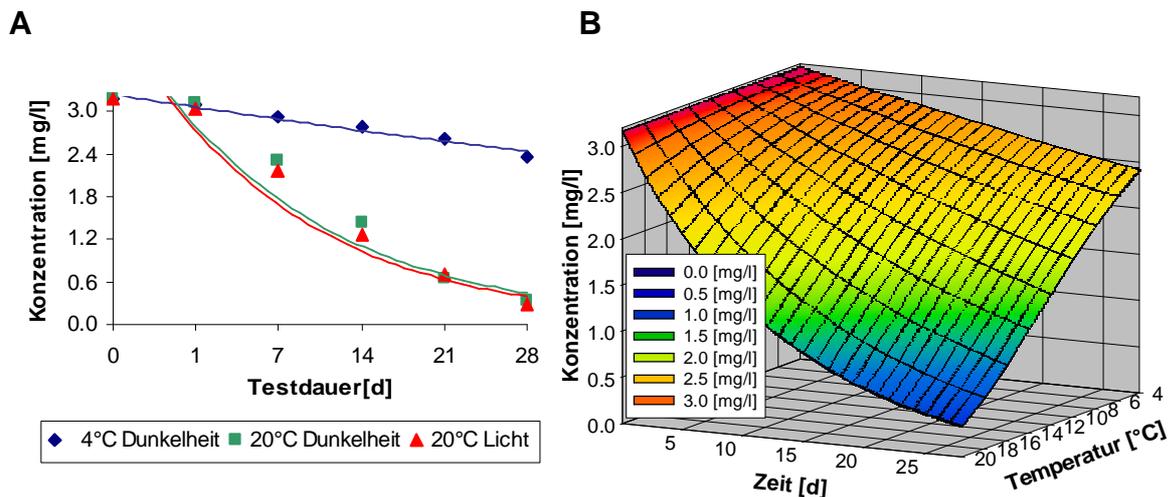


Abb. 46: A: Stabilitätsprofil von **Benzylpenicillin** unter drei unterschiedlichen Bedingungen (nichtlineare Regression: $y = a \cdot \exp(-b \cdot x)$); B: Simulation des Abbauverhaltens von **Benzylpenicillin** mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung und den Abbauraten der Substanz bei 4°C und 20°C in Dunkelheit

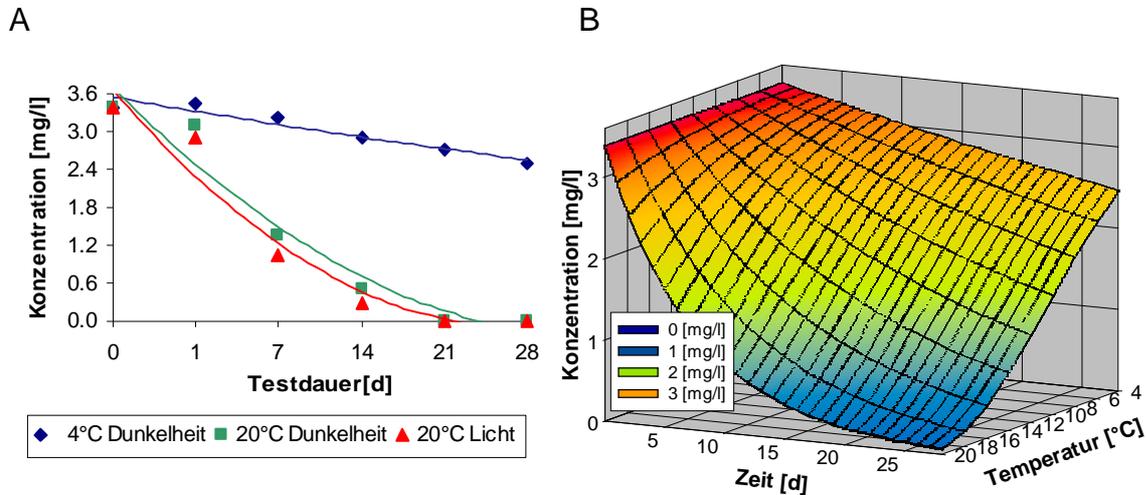


Abb. 47: A: Stabilitätsprofil von **Ceftriaxon** unter drei unterschiedlichen Bedingungen (nichtlineare Regression: $y = a \cdot \exp(-b \cdot x)$); B: Simulation des Abbauverhaltens von **Ceftriaxon** mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung und den Abbauraten der Substanz bei 4°C und 20°C in Dunkelheit

Bei Benzylpenicillin reduzierte sich die gemessene Anfangskonzentration um 25% in den bei 4°C im Dunkeln gelagerten Ansätzen. Die Halbwertszeiten für 20°C im Dunkeln und bei Lichteinwirkung lagen fast identisch bei 9 bzw. 8 d. Daher kann Benzylpenicillin genauso wie Amoxicillin als wärmeempfindlich eingestuft werden (rund 90%-ige Primärelimination in 28 d). Die Aktivierungsenergie lag bei 89,4 kJ/mol. Im CBT wurde Benzylpenicillin sogar nach 14 d völlig eliminiert, wobei 26% der Substanz biologisch abgebaut wurde. Damit sind die Ergebnisse aus beiden Tests vergleichbar. Ebenfalls wurden bei dieser Testsubstanz mehrere Metabolite beobachtet (näheres s. Amoxicillin S. 233).

Ceftriaxon wurde im Licht- und Temperaturempfindlichkeitstest schneller eliminiert als im CBT und ist als stark wärmeempfindlich einzustufen (Halbwertszeit 5 d bei 20°C im Dunkeln und 4 d bei 20°C unter Lichteinwirkung, s. Abb. 47). Weshalb nur 30% der Substanz nach 28 d im CBT abgebaut wurden, wenn unter den gleichen Bedingungen in sterilen Ansätzen schon nach 21 d Ceftriaxon nicht mehr vorhanden war, ist unklar. Daher wurde dieser Test erneut angesetzt und dabei fast identische Ergebnisse gemessen (Halbwertszeit 5 d bei 20°C im Dunkeln und auch bei 20°C unter Lichteinwirkung). Der relative Messfehler lag bei $\pm 3,3\%$, für die Aktivierungsenergie ergab sich ein Wert von 105,8 kJ/mol. Es könnte zur Komplexbildung der Substanz mit Nährlösung im CBT kommen und dadurch zur Stabilisierung des Ceftriaxons.

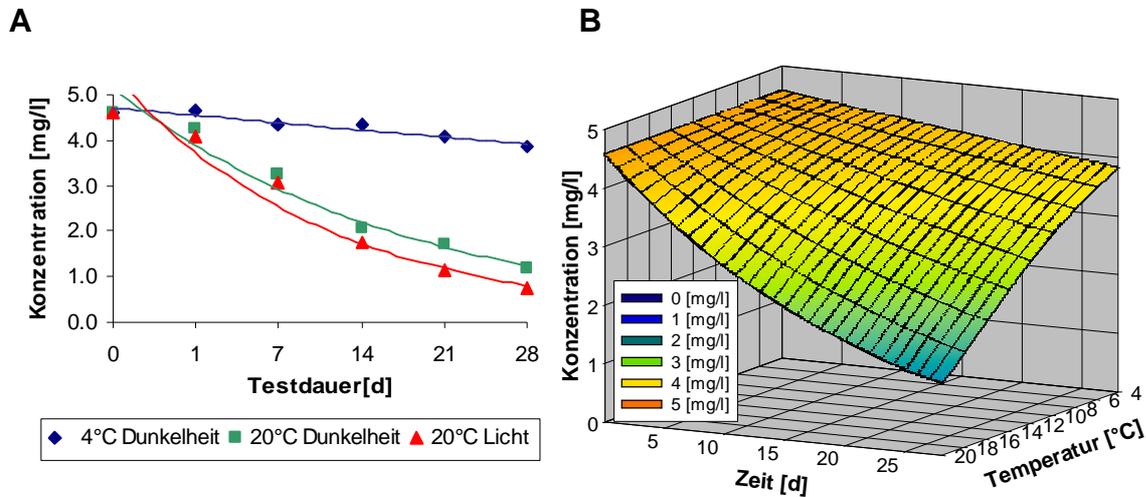


Abb. 48: A: Stabilitätsprofil von **Cefuroxim** unter drei unterschiedlichen Bedingungen (nichtlineare Regression: $y = a \cdot \exp(-b \cdot x)$); B: Simulation des Abbaubehaltens von **Cefuroxim** mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung und den Abbauraten der Substanz bei 4°C und 20°C in Dunkelheit

Bei Cefuroxim konnte eine Abnahme der Konzentration in allen drei Ansätzen gemessen werden ($E_A=84,8$ kJ/mol). Dabei sanken die Konzentrationen bei ca. 20°C und Lichteinwirkung sowie bei 20°C im Dunkeln um ca. 80% ab, wobei eine etwas höhere Konzentrationsabnahme der in Licht gelagerten Ansätze zu erkennen war. Da die Temperatur bei ca. 20°C lag, lässt sich die Elimination des Cefuroxims maßgeblich auf die Temperatur zurückführen. Cefuroxim besitzt also eine sichtliche Wärmeempfindlichkeit und eine deutlich geringere Lichtempfindlichkeit. Bei den gekühlt (4°C, Dunkelheit) gelagerten Proben konnte ebenfalls eine Konzentrationsabnahme gemessen werden, die allerdings deutlich niedriger lag (Abnahme ca. 17% in 28 d). Die Halbwertszeit von 13 d im CBT (Tab. 56) ist identisch mit dem Ergebnis des Licht- und Wärmeempfindlichkeitstests (20°C, Dunkelheit, Tab. 80). Bei beiden Cephalosporinen wurden Metabolite gemessen.

Ebenso erfolgte bei Chlortetracyclin eine Abnahme der Konzentration in allen drei Testansätzen ($E_A=26,8$ kJ/mol), wobei auch hier Metabolite gemessen wurden. Dabei verringerte sich die Konzentration der beiden in der Wärme gelagerten Ansätze innerhalb 28 d um etwa den gleichen prozentualen Wert (ca. 33%). Hieraus lässt sich schließen, dass der Lichteinfluss nur unwesentlich zum Abbau beitrug. Die bei 4°C in der Dunkelheit gelagerten Ansätze zeigten sich am stabilsten und wurden lediglich um 17% reduziert, wobei nach dem siebten Tag die Konzentration nahezu konstant

blieb, was evtl. auf Adsorptionsverluste zurückzuführen ist. Der relative Messfehler lag bei $\pm 0,8\%$ für Chlortetracyclin.

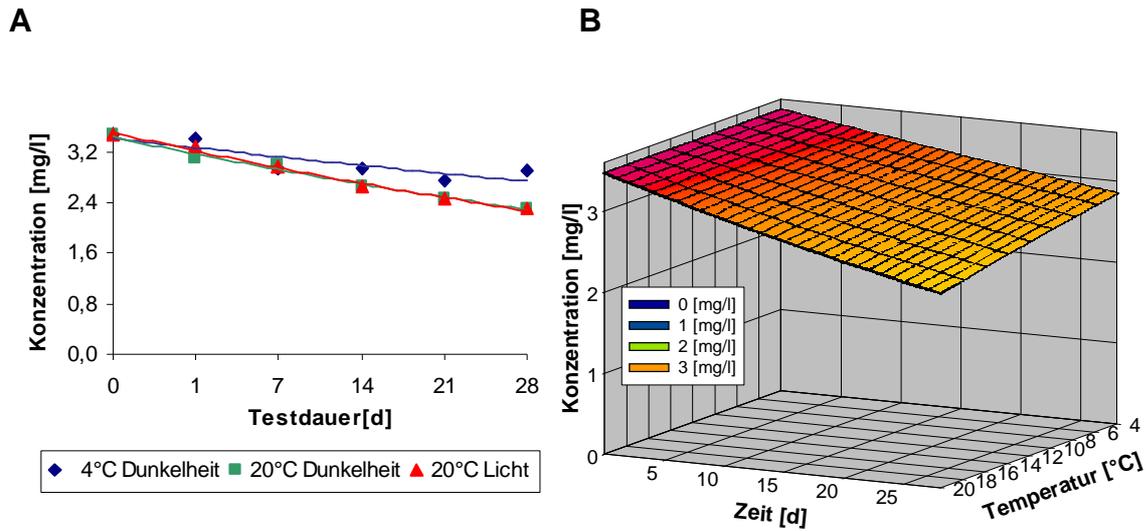


Abb. 49: A: Stabilitätsprofil von **Chlortetracyclin** unter drei unterschiedlichen Bedingungen (nichtlineare Regression: $y = a \cdot \exp(-b \cdot x)$); B: Simulation des Abbauverhaltens von **Chlortetracyclin** mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung und den Abbauraten der Substanz bei 4°C und 20°C in Dunkelheit

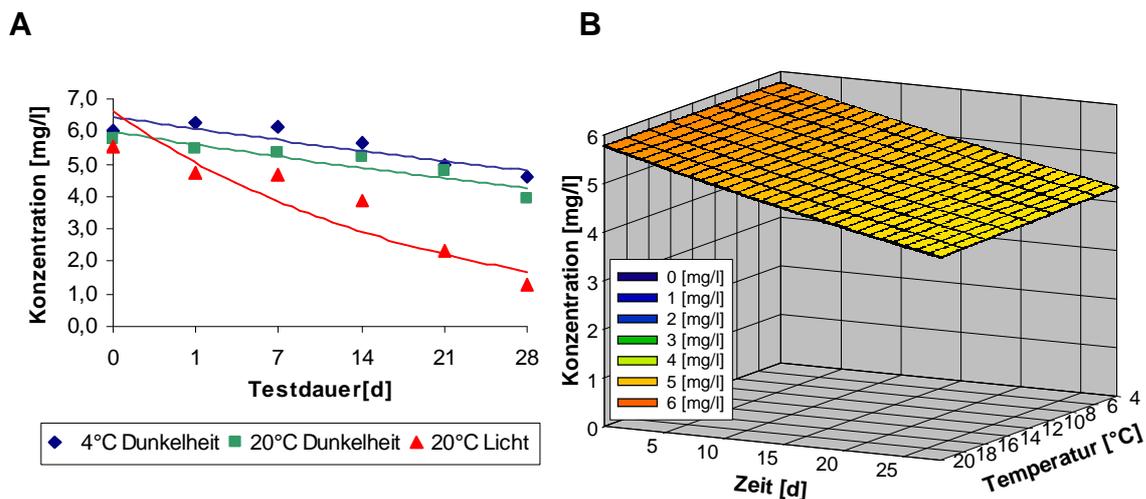


Abb. 50: A: Stabilitätsprofil von **Metronidazol** unter drei unterschiedlichen Bedingungen (nichtlineare Regression: $y = a \cdot \exp(-b \cdot x)$); B: Simulation des Abbauverhaltens von **Metronidazol** mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung und den Abbauraten der Substanz bei 4°C und 20°C in Dunkelheit

Nach einer Studie von Gavalchin und Katz (1994) wurden in einem mit Chlortetracyclin dotierten Boden innerhalb von 30 d bei 30°C bis zu 66% der Substanz abgebaut. Bei 20°C belief sich der Abbau auf 22%, und bei 4°C fand überhaupt keine Eliminierung statt. Die Ergebnisse von Gavalchin und Katz sind allerdings nicht unmittelbar mit den durchgeführten Untersuchungen zu vergleichen. Es ist zu berücksichtigen, dass es sich um zwei unterschiedliche Matrices handelt. Hinsichtlich einer Risikoabschätzung für Chlortetracyclin sollte die Wärmeempfindlichkeit der Substanz berücksichtigt werden. Im CBT war Chlortetracyclin bereits nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar. Dies könnte mit der Komplexierung von Tetracyclinen mit Calcium- und Magnesiumionen erklärt werden (Hirsch et al. 1999), da diese Ionen in dem Nährmedium des CBT vorhanden sind, wobei die Ansätze im Licht- und Temperaturempfindlichkeitstest steril sind.

Metronidazol ist licht- und wärmeempfindlich, was aus den Ergebnissen gefolgert wurde (77% Elimination bei 20°C und Licht, 32% bei 20°C und Dunkelheit nach 28 d). Nach 14 d begann der Abbau der Substanz auch bei 4°C im Dunkeln (nach 28 d 23%-ige Elimination). Für die Aktivierungsenergie ergab sich ein Wert von 4,2 kJ/mol und der relative Messfehler lag bei $\pm 0,5\%$. Desgleichen wurde bei Metronidazol ein Metabolit gemessen. Es liegen keine Vergleichsdaten aus dem CBT vor, da dort die Proben nicht gesammelt wurden. Nach der Faktendatenbank GSBL ist Metronidazol instabil in Gegenwart von Licht.

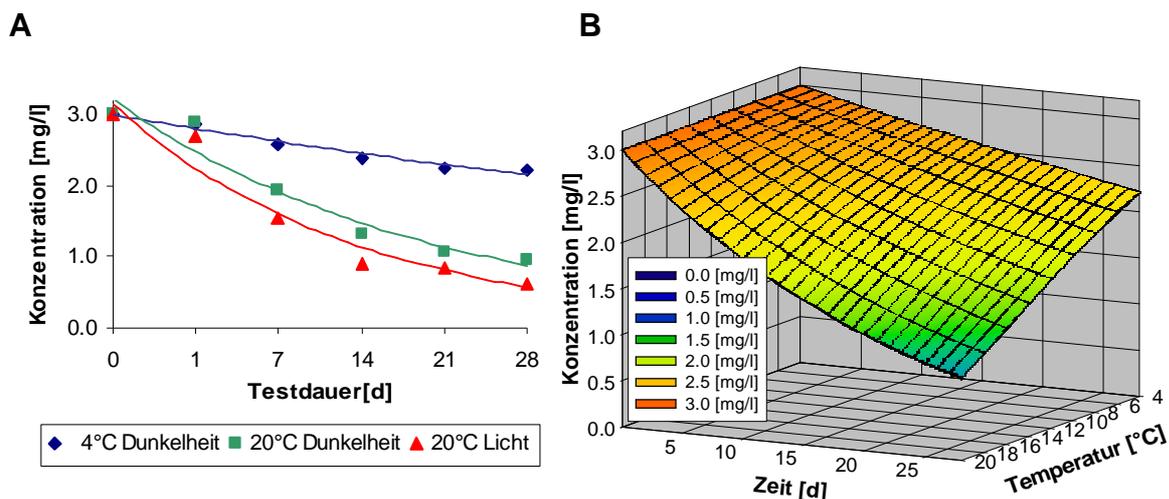


Abb. 51: A: Stabilitätsprofil von **Tetracyclin** unter drei unterschiedlichen Bedingungen (nichtlineare Regression: $y = a \cdot \exp(-b \cdot x)$); B: Simulation des Abbaubehaltens von **Tetracyclin** mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung und den Abbauraten der Substanz bei 4°C und 20°C in Dunkelheit

Bei Tetracyclin ist eine höhere Abnahme der Konzentration bei 20°C unter Lichteinwirkung (79%) gegenüber der Lagerung bei 20°C im Dunkeln zu erkennen (68%). Dies deutet auf eine Lichtempfindlichkeit hin. Der relative Messfehler lag bei $\pm 1,2\%$. Neben dem fotochemischen Abbau ist aber auch eine Elimination durch Wärme erkennbar. Bei 20°C im Dunkeln werden in 28 d 68% eliminiert, bei 4°C 26%. Der Tetracyclinverlust bei 4°C könnte in den Kläranlagen eine Rolle spielen. Die Aktivierungsenergie beträgt 54,8 kJ/mol. Die Halbwertszeit für die gleichen Bedingungen (20°C, Dunkelheit) sind in beiden Tests (Licht- und Temperaturempfindlichkeitstest, CBT) identisch (16 d).

Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Vancomycin erwiesen sich während der Testdauer von 28 d als stabil (Halbwertszeiten >mehrere Jahre) und wurden deshalb grafisch nicht dargestellt. Nur bei Sulfamethoxazol wurde eine eindeutige Abnahme der Anfangskonzentration mit der Testdauer beobachtet, jedoch lagen die Halbwertszeiten >1 Jahr (relativer Messfehler $\pm 0,5\%$, $s \pm 6,6\%$ bei 20°C und Licht, $s \pm 5,6\%$ bei 20°C und Dunkelheit, $s \pm 5,7\%$ bei 4°C und Dunkelheit). Bei Trimethoprim und Vancomycin wurden lediglich Schwankungen während der einzelnen Messtagen beobachtet. Die gemessenen Werte für beide Substanzen schwankten maximal um $s \pm 3,4\%$ voneinander. Solche geringfügige Schwankungen lassen sich auf die Messmethode zurückführen.

Aufgrund einer Probenahme im Zu- und Ablauf einer kommunalen Kläranlage, schätzten Jekel et al. (2000) die Eliminationsraten von Sulfonamiden auf ungefähr zwei Drittel. Sie gehen davon aus, dass die unvollständige Eliminierung auf die zu geringen Aufenthaltszeiten bei starker Konkurrenz durch besser abbaubare Substanzen im Belebungsbecken zurückzuführen ist. Auch in limnischen Oberflächengewässern reduzierte sich die Konzentration von Sulfamethoxazol in der anaeroben Untergrundpassage. Die Reduktion war höher, als durch eine reine Verdünnung zu erwarten gewesen wäre. Die Autoren gehen von einer anaeroben Bioabbaubarkeit von Sulfamethoxazol aus. Sulfadiazin und Sulfamerazin werden in der Untergrundpassage hingegen nicht eliminiert (Jekel et al. 2000).

Die biologische Abbaubarkeit verschiedener Sulfonamide in einem Screening-Test und in der Kläranlage wurde von Ingerslev und Halling-Sørensen (2000) untersucht. Keine der untersuchten Substanzen wurde im Screening-Test abgebaut, weshalb die Sulfonamide als schwer biologisch abbaubar eingestuft wurden. In der Kläranlage mit nicht adaptiertem Schlamm konnte eine Elimination innerhalb von wenigen Tagen

festgestellt werden, die bei einer Temperatur von 20°C allerdings erst nach einer 7- bis 10-tägigen lag-Phase einsetzte. Bei geringeren Temperaturen begann der Abbau erst sehr viel später. Schlamm, der bereits an ein Sulfonamid adaptiert war, konnte dieses und alle anderen Sulfonamide sehr schnell abbauen. Da alle Sulfonamide hinsichtlich ihrer Abbaurate fast identisch waren, kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die Untersuchung einiger weniger Vertreter dieser Gruppe für die Beurteilung der gesamten Sulfonamid-Gruppe ausreicht.

Ähnliches Verhalten des Sulfamethoxazols wurde auch beim CBT in der Toxizitätskontrolle (Antibiotikum + Natriumacetat) festgestellt, wo nach bestimmtem Zeitraum ein Abbau der Substanz mit Natriumacetat als leicht verarbeitenden Kohlenstoffquelle beobachtet wurde.

Die Untersuchungsergebnisse von Trimethoprim bestätigen die von Lunestad et al. (1995) durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Fotostabilität. In Meerwasser gelöstes Trimethoprim erwies sich nach einem Inkubationszeitraum von drei Wochen, bei Lagerung auf Meeresspiegel sowie in ein Meter Tiefe als stabil. Fjelde et al. (1993) dokumentierten eine fotochemische Stabilität für Trimethoprim in Meerwasser, indem die Substanz in Quarzgläsern 20 Tage lang dem Tageslicht ausgesetzt wurde. Sulfamethoxazol und Trimethoprim erwiesen sich als stabil, ebenso im CBT.

Bei Vancomycin zeigte sich in keinem der Sterilansätze eine signifikante Abnahme, obwohl im CBT die Substanzkonzentration in den 28 d um 47% abnahm. Daher kann die Elimination im CBT nicht auf Foto- oder Thermolyse zurückgeführt werden. Es ist anzunehmen, dass die Elimination entweder durch Adsorption an Gefäß- und Bakterienzellwände zustande kam oder durch biologische Prozesse, welche ohne messbaren Sauerstoffverbrauch abgelaufen sind.

Die Fotostabilität spielt in Kläranlagen jedoch eine geringere Rolle, da Schlamm die Substanz weitgehend vor Lichtabbau schützt. Für die Beurteilung des Risikopotenzials von Antibiotika in Kläranlagen sollte die berechnete Thermostabilität bei 15°C berücksichtigt werden. Dabei darf die hydraulische Verweildauer des Abwassers in Kläranlagen nicht vergessen werden. Da ebenfalls in der aquatischen Umwelt ein Großteil der Antibiotika nicht an der Wasseroberfläche zu finden ist, dürfte der fotochemische Abbau dieser Substanzen beschränkt sein.

3.3.7 Adsorption

Die Adsorption kann physikalische, chemische oder auch physiologische Ursachen haben und zur Akkumulation von Antibiotika im Belebtschlamm führen. Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden drei Versuchsansätze in zwei Konzentrationen mit Ofloxacin gewählt, die eine Prüfung der Adsorption an Belebtschlamm ermöglichten. Bei beiden Konzentrationen ist deutlich zu sehen, dass der größte Anteil der Adsorption bei den Ansätzen mit Schlamm schon direkt nach der Antibiotikazugabe erfolgt (Abb. 52 und 53).

Bei einer Konzentration von 10 mg/l ergab sich für die Blindprobe ein Mittelwert von 8,06 mg/l (Abb. 52, $s=0,53$ mg/l). Bezogen auf den Sollwert von 10 mg/l entspricht das einer Adsorptionsrate von 19%. Beim Ansatz mit Belebtschlamm fand sich direkt nach Zugabe des Antibiotikums eine Konzentration von 3,08 mg/ml. Im weiteren Verlauf sank die Konzentration auf 0,35 mg/ml nach 24 h. Dies entspricht einer Konzentrationsverminderung um 96% in Bezug auf den Mittelwert der Blindprobe bzw. einer Adsorption von 3,1 mg/g TS nach 24 h. Beim Ansatz mit Quecksilberchlorid lag die Konzentration zu Beginn des Versuchs bei 3,16 mg/l und sank im weiteren Verlauf auf 1,51 mg/l nach 24 h. Dies entspricht einer Konzentrationsverminderung um 81% in Bezug auf den Mittelwert der Blindprobe bzw. einer Adsorption von 2,6 mg/g TS nach 24 h.

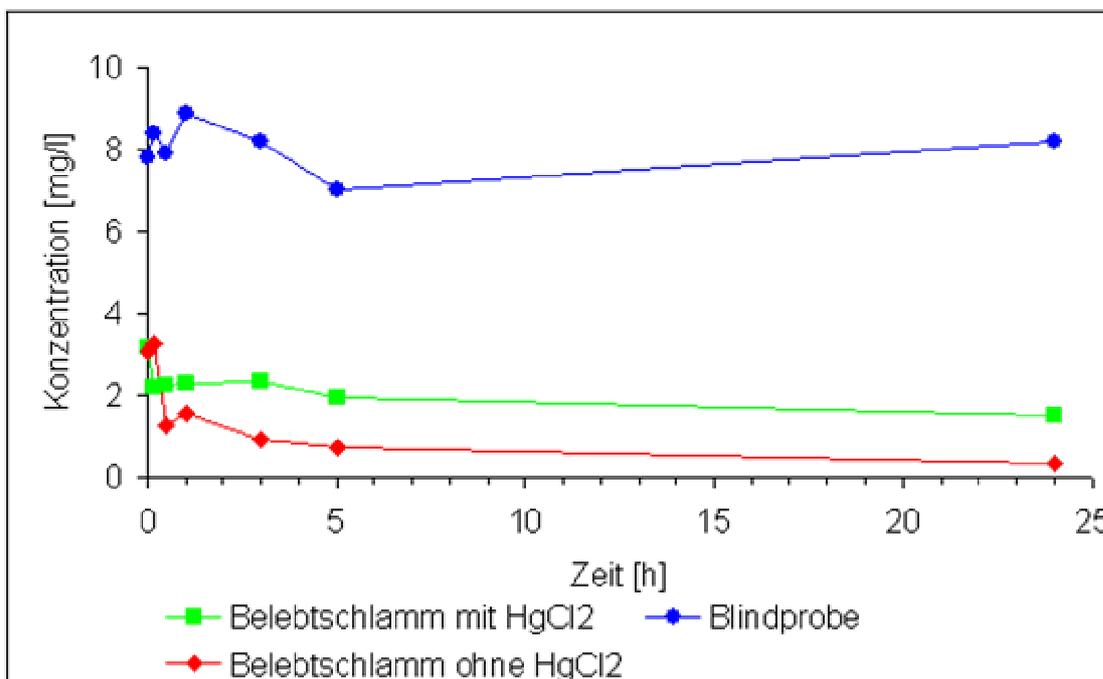


Abb. 52: Konzentrationsverlauf von Ofloxacin im Adsorptionsstandtest ($c=10$ mg/l)

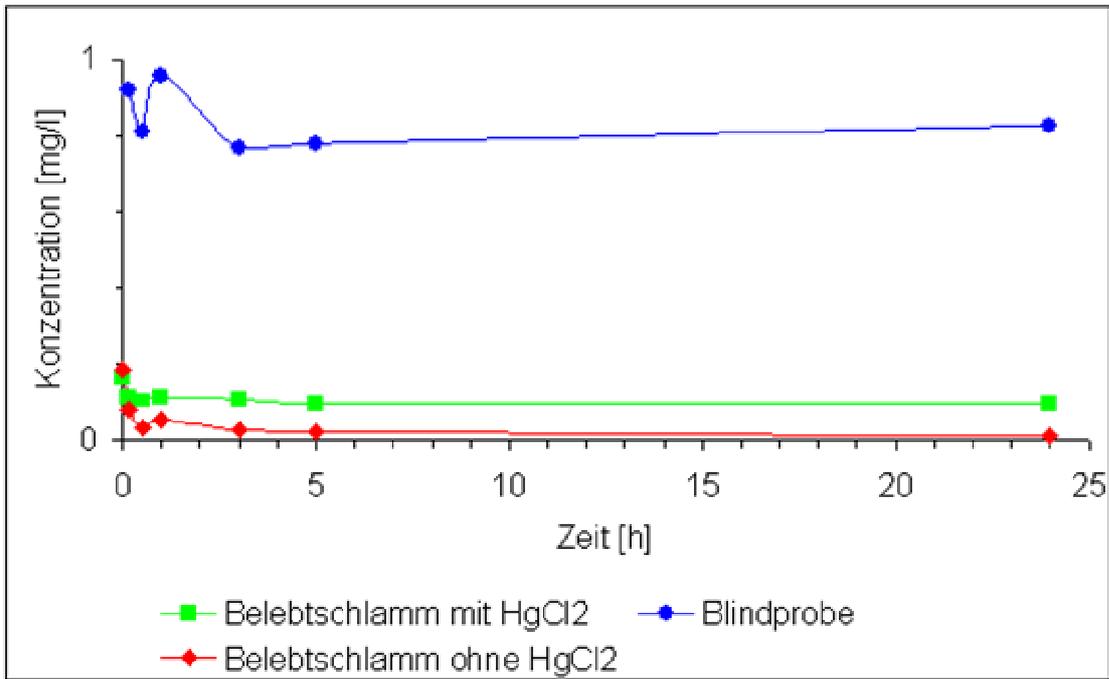


Abb. 53: Konzentrationsverlauf von Ofloxacin im Adsorptionsstandtest ($c=1$ mg/l)

Bei der Konzentration von 1 mg/l ergab sich für die Blindprobe ein Mittelwert von 0,84 mg/l (Abb. 53, $s=0,07$ mg/l). Das entspricht bezogen auf den eingestellten Wert von 1 mg/l einer Adsorptionsrate von 16%. Beim Ansatz mit Belebtschlamm zeigte sich bezogen auf den Mittelwert der Blindprobe mit einer Konzentration von 0,18 mg/ml eine Verminderung um 80% direkt nach Zugabe des Antibiotikums und mit einer Konzentration von 0,01 mg/ml eine Verminderung um 99% nach 24 h. Dies entspricht einer Adsorption von 0,33 mg/g TS nach 24 h. Beim Ansatz mit Quecksilberchlorid lag die Konzentration bei 0,17 mg/ml direkt nach Versuchsbeginn (entspricht 80% Verminderung) und bei 0,10 mg/ml nach 24 h (entspricht 88% Verminderung). Auffällig bei allen Ansätzen war auch, dass die Konzentrationen in der ersten halben Stunde sanken, dann aber bis eine Stunde nach Versuchsbeginn wieder leicht anstiegen, um daraufhin wieder abzusinken. Dies deutet auf eine zeitweilige Rücklösung bereits adsorbierten Ofloxacins hin (Houben 2001).

Der Test zeigte eine deutliche Adsorption von Ofloxacin an Belebtschlamm in beiden Konzentrationen. Dabei bestand ein deutlicher Unterschied zwischen abgetötetem und unbehandeltem Belebtschlamm. Lag die prozentuale Elimination nach 24 Stunden beim abgetötetem Belebtschlamm bei 81% für die Konzentration von 10 mg/l und bei 89% für die Konzentration von 1 mg/l, waren es beim unbehandeltem Belebtschlamm 96% für die Konzentration von 10 mg/l und sogar 99% für die Konzentration von 1 mg/l. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Adsorptions-

raten bei behandeltem und unbehandeltem Belebtschlamm wäre eine Beeinflussung der Adsorption von Ofloxacin durch die Zugabe von Quecksilberchlorid. Im Gegensatz zum CBT mit niedriger Bakteriendichte weist Belebtschlamm eine höhere Keimdichte und eine größere mikrobielle Diversität auf, so dass auch ein biologischer Abbau auf der Basis des Co-Metabolismus eine Erklärung für die größere Elimination im Ansatz mit Belebtschlamm sein könnte. Beispielsweise konnten Jacobson et al. (1980) für Herbizide den Abbau durch Co-Metabolismus, also der Modifizierung einer Substanz ohne Energiegewinn, im Abwasser nachweisen.

Für andere Fluorchinolone konnte bereits eine Elimination durch Adsorption an Sedimente (Nowara et al. 1997) und Belebtschlamm (Hertle 1999) nachgewiesen werden, so dass eine Adsorption auch von Ofloxacin an Belebtschlamm zu erwarten gewesen war.

Die erwartete Kläranlagenzulaufkonzentration von Ofloxacin liegt bei 1,10 µg/l und damit im Bereich der MHK_{50} empfindlicher pathogener Keime, aber weit unter den im Wachstumshemmtest (s. Kapitel 4.4.2 Wachstumshemmtest) bestimmten EC_{50} von 2,4 mg/l bzw. 0,27 mg/l für die häufig im Abwasser vorkommenden Keime *Enterococcus faecalis* bzw. *Pseudomonas putida*. Betrachtet man die hohen Adsorptionsraten von Ofloxacin an Belebtschlamm, ist es durchaus vorstellbar, dass hierdurch Konzentrationen erreicht werden, die Effekte auf mikrobielle Lebensgemeinschaften ausüben. Es besteht die Möglichkeit, dass Ofloxacin durch Adsorption an Bodenminerale und Komplexbildung mit Kationen in einer weniger aktiven Form vorliegt. Außerdem ist zu bedenken, dass auch andere in die Kläranlage eingetragene Substanzen an Belebtschlamm adsorbieren, so dass dort nicht die maximale Adsorption von Ofloxacin zu erwarten ist.

Die Akkumulation von Ofloxacin könnte auch einen Beitrag zur Resistenzentwicklung bei Bakterien leisten, indem ins Abwasser eingetragene resistente pathogene Bakterien positiv selektioniert werden und in Oberflächengewässer entlassen werden. Da ein horizontaler Gentransfer auch zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies möglich ist (Chandrasekaran et al. 1998) und die Bedingungen dafür in der Kläranlage aufgrund der hohen Keimdichte besonders günstig sind (Schäfer 1996), wäre auch die Übertragung von Resistenzplasmiden von unschädlichen auf pathogene Bakterien denkbar. Diese könnten, z. B. durch Verschlucken von Badeseewasser, wieder auf Tier und Mensch übertragen werden. Nach Untersuchungen von Brunswik-Titze (2001) ließ sich jedoch kein Zusammenhang erkennen zwischen dem Eintrag von

Antibiotika wie zum Beispiel Ciprofloxacin oder Vancomycin in Kläranlagen und dem Vorkommen resistenter pathogener Bakterien, so dass das vermehrte Auftreten resistenter Keime in Gewässern in den letzten Jahren (UBA 1997, Feuerpfeil et al. 1999) wohl auf den Eintrag über Fäkalkeime zurückzuführen ist.

3.4 WIRKUNG VON ANTIBIOTIKA AUF BAKTERIEN

3.4.1 Koloniebildende Einheiten (KBE) im CBT

Die Bestimmung der KBE wurde durchgeführt, um neben der Toxizitätskontrolle einen weiteren Indikator für eine evtl. Toxizität zu haben. Zu berücksichtigen ist aber, dass hierdurch nur die Toxizität der Testsubstanz auf die auf Kappessermedium kultivierbaren Bakterien erfasst wird. Aufgrund der unzureichenden Kenntnis mikrobieller Interaktionen ist bisher nur ein kleiner Prozentsatz der Umweltbakterien mit klassischen Methoden kultivierbar (Amann et al. 1995). Die KBE-Messung kann daher nur erste Hinweise auf toxische Einflüsse der eingesetzten Substanz auf Teile der Bakterienpopulation geben.

Es wurden die KBE aus allen Doppelansätzen bestimmt. Das eingesetzte Inokulum aus dem Ablauf der Kläranlage in Wyhl wies 10^4 KBE/ml auf. In den verschiedenen Testansätzen fanden sich zu Beginn durchschnittlich etwa $4,0 \cdot 10^2$ KBE/ml, was dem empfohlenen Wert von 10^1 bis 10^3 KBE/ml entspricht.

In allen Ansätzen ist ein deutlicher exponentieller Wachstumsverlauf zu erkennen, wie er der bakteriellen Wachstumsdynamik in einer Batch-Kultur entspricht.

In der Abb. 54 und 55 sind die Anzahlen der koloniebildenden Einheiten (KBE) beispielhaft für zwei Antibiotika mit und ohne Einfluss auf die Bakterien in beiden Ansätzen logarithmisch dargestellt.

Die Anzahl der KBE der Referenzkontrolle mit dem leicht abbaubaren Natriumacetat war in allen Testansätzen am größten. Bei Amoxicillin, Ofloxacin, Tetracyclin und Vancomycin in beiden Konzentrationsbereichen und bei Benzylpenicillin, Cefuroxim, Imipenem und Sulfamethoxazol nur im Konzentrationsbereich von 2-130 µg/l zeigt sich ein sehr homogener Kurvenverlauf (Abb. 54).

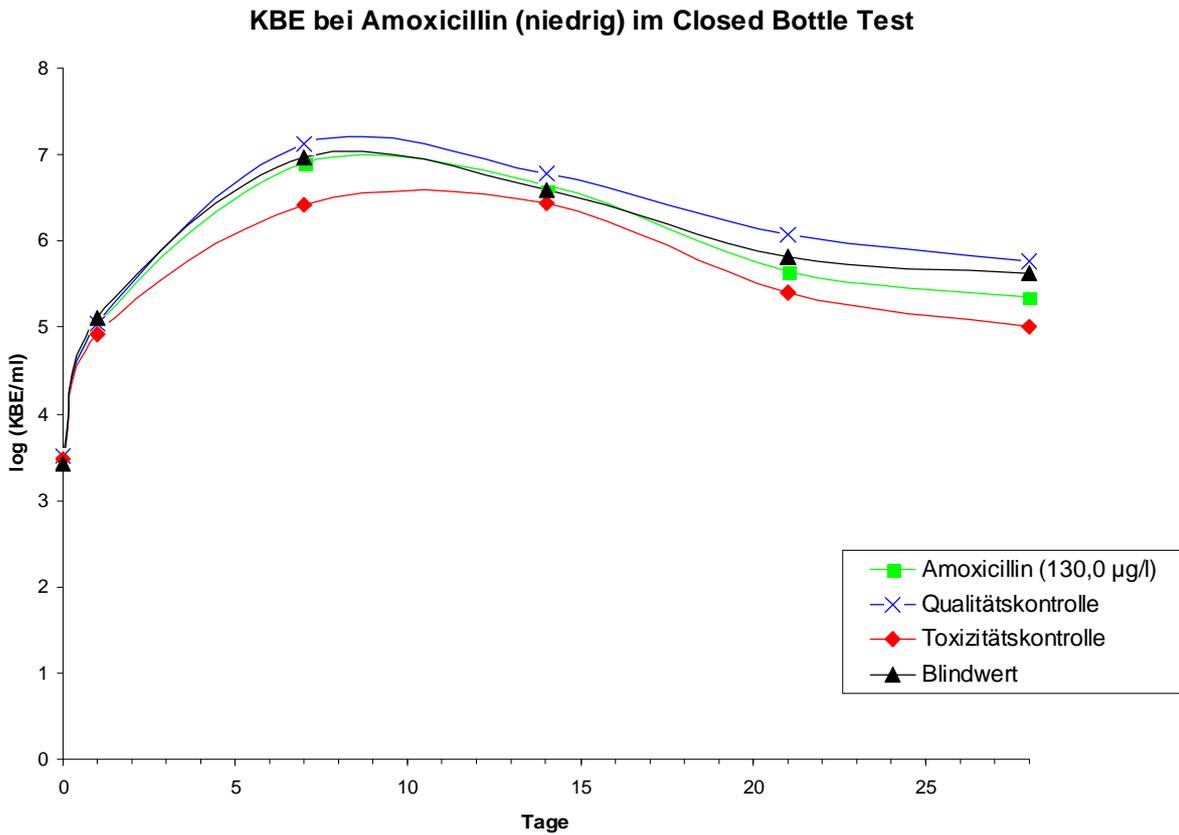
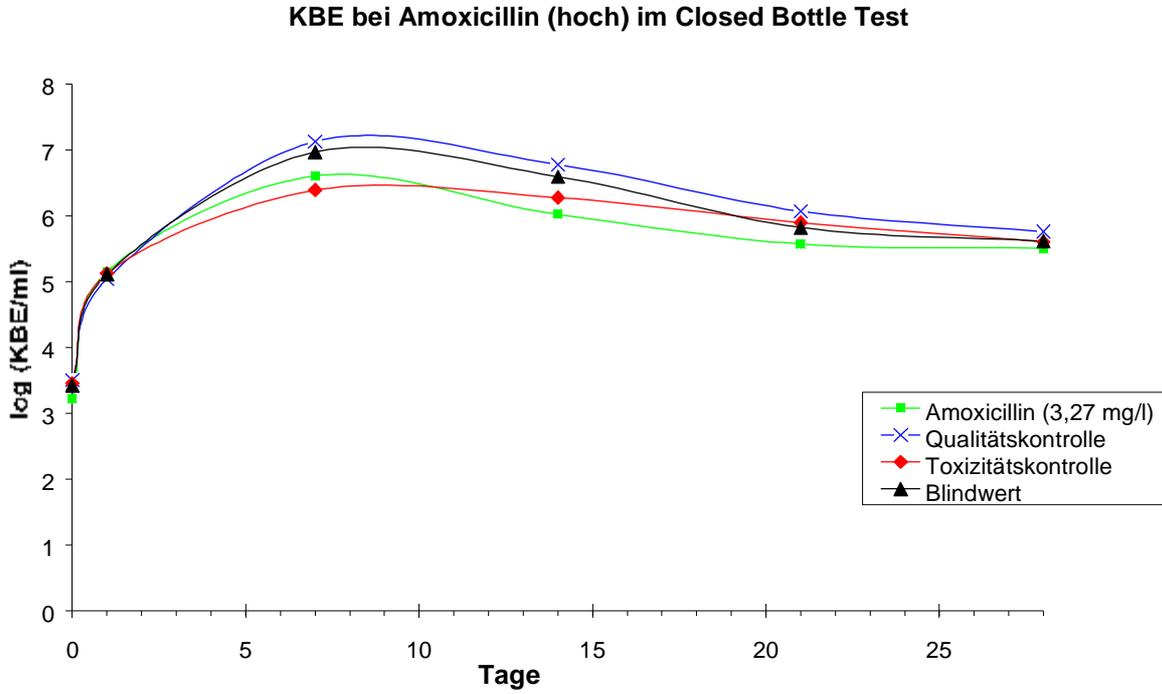


Abb. 54: Homogener Kurvenverlauf der KBE im CBT mit Amoxicillin (oben: mg/l-, unten: µg/l-Konzentrationsbereich)

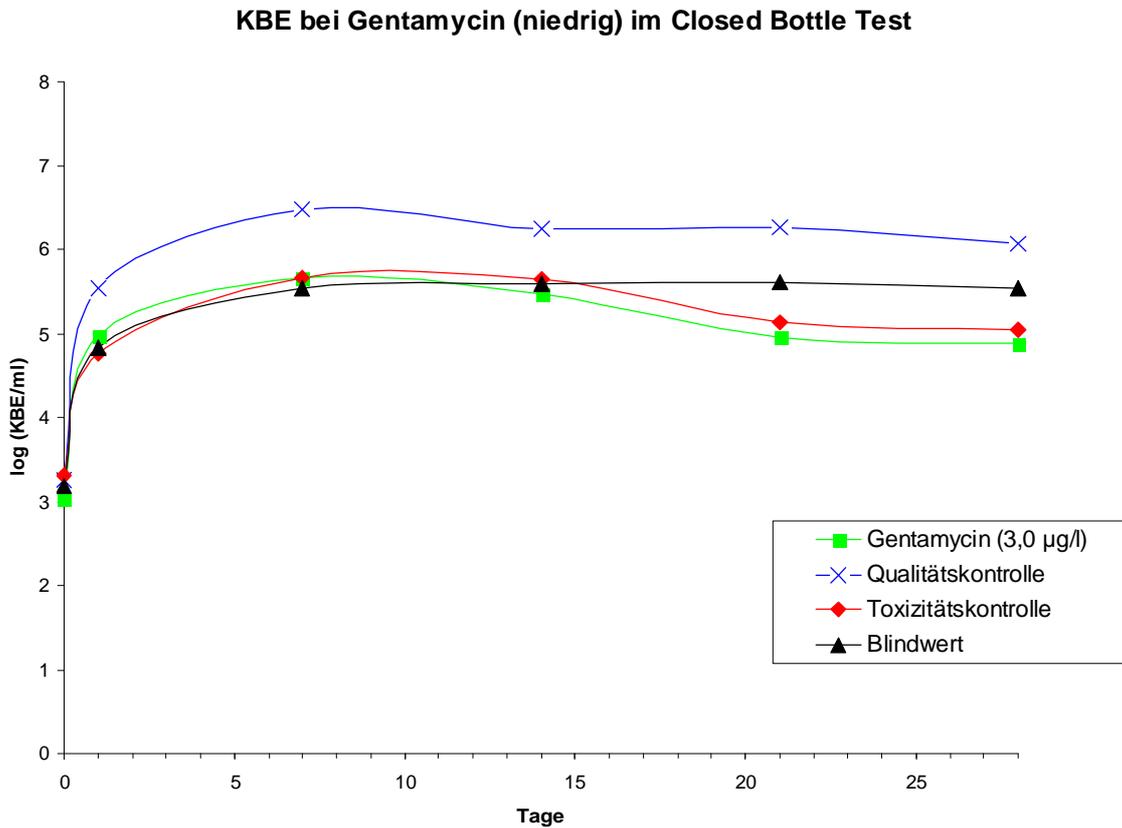
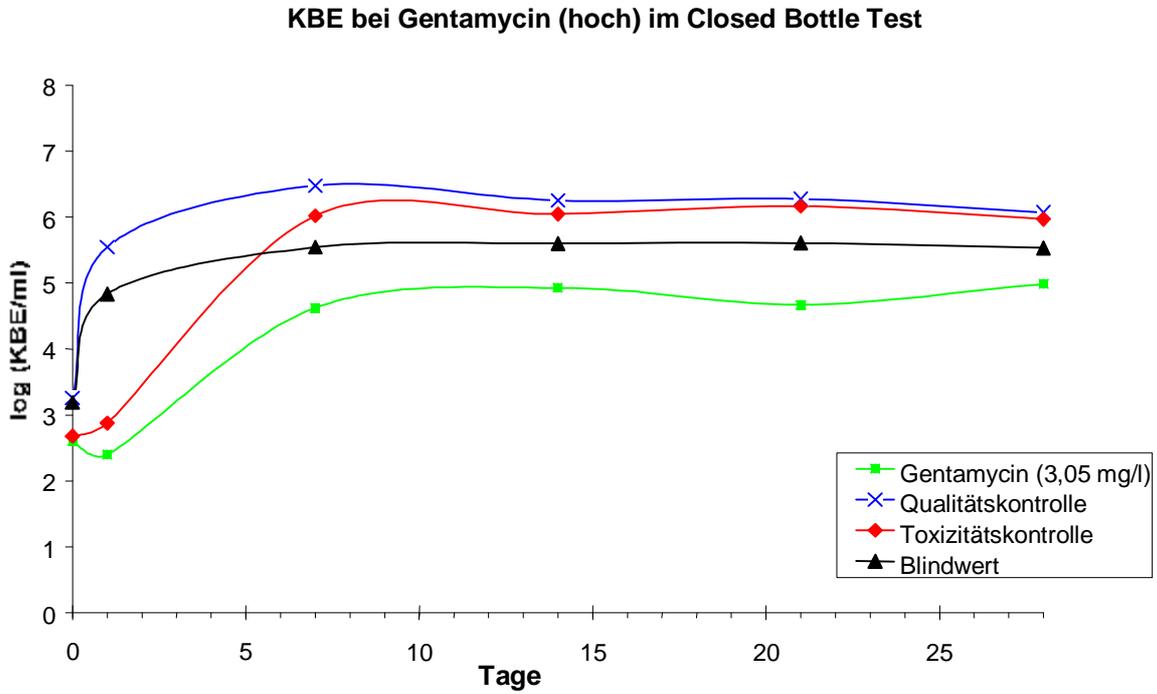


Abb. 55: Markante Wirkung des Gentamycins im mg/l bzw. µg/l Konzentrationsbereich auf das Wachstum der Bakterien im CBT (KBE)

Einen inhomogenen Kurvenverlauf (ohne Effekte beobachten zu können) zeigte das Benzylpenicillin und Sulfamethoxazol im mg/l Konzentrationsbereich. Bei Monensin, Metronidazol und Trimethoprim verlief die Kurve des Testansatzes in beiden Konzentrationsbereichen am tiefsten, die restlichen Kurven der Ansätze verliefen während der gesamten Testdauer inhomogen. Die Antibiotikaansätze lagen bei Chlorotetracyclin, Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin und Gentamycin im Konzentrationsbereich von 2-6 mg/l am tiefsten, d. h. unter dem Blindansatz und bei den gleichen Substanzen in 2-130 µg/l Konzentrationen wurde eine kleine Hemmung außer beim Testansatz auch bei der Toxizitätskontrolle und dem Blindansatz sichtbar. Die Kurven des Substanzansatzes und der Toxizitätskontrolle in beiden Konzentrationsbereichen bei Ceftriaxon, Nystatin und im mg/l Konzentrationsbereich bei Cefuroxim liegen um eine log-Stufe tiefer und ähneln sich stark in ihrer Wachstumsdynamik, was auf eine leichte Reaktion der Bakterien auf das Antibiotikum hinweist. Bei einigen Substanzen wurde ein signifikanter Unterschied in der Keimdichte und der vorkommenden Koloniefarbe zwischen der Qualitätskontrolle und dem Testansatz sowie zwischen den 2-130 µg/l und 2-6 mg/l Konzentrationen beobachtet, was ein deutlicher Hinweis auf die Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Populationszusammensetzung ist.

Es muss aber erwähnt werden, dass nur Abweichungen von mindestens einer log-Stufe als signifikanten Hinweis auf Toxizität gewertet werden kann, was bei Cefuroxim und Imipenem (jeweils nur in mg/l Konzentration), sowie Ceftriaxon, Chlortetracyclin, Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin, Gentamycin, Metronidazol, Monensin, Nystatin und Trimethoprim der Fall ist.

Die erhaltenen Ergebnisse betreffen nur die biologischen (aeroben) Prozesse und daher ist es fraglich, inwieweit man diese Ergebnisse auf das Oberflächengewässer übertragen kann, da im Sediment von Oberflächengewässer häufig auch anaerobe Prozesse stattfinden, die zur Elimination der Stoffe in der Umwelt führen können. Zudem werden einige Antibiotika (z. B. Fluorchinolone) auch fotolytisch abgebaut (Burhenne et al. 1999, Fasani et al. 1998).

3.4.2 Wachstumshemmtest (EN ISO 10712 : 1995)

Nach Brock et al. (2000) wird Wachstum in der Mikrobiologie als Zunahme der Zellzahl definiert. Wachstum ist ein essenzieller Bestandteil der Funktion von Mikroorganismen, da jede Zelle in der Natur nur eine begrenzte Lebensdauer hat und die Art

nur durch ständiges Wachstum der Population überlebt. Zu den wesentlichen Umweltfaktoren, die sich auf das mikrobielle Wachstum auswirken, gehören außer Temperatur, pH-Wert, Wasserpotenzial und Sauerstoff auch im Wasser gelöste Substanzen. Die Einflüsse unterschiedlicher Konzentrationen einer Testsubstanz auf das Wachstum von Bakterien lassen sich mit dem *Pseudomonas putida* Wachstumshemmtest nach DIN EN ISO 10712 : 1995 bestimmen.

Der genormte Wachstumshemmtest wird üblicherweise nur mit dem gramnegativen Keim *Ps. putida* durchgeführt, während einige Antibiotika auch oder ausschließlich gegen grampositive Keime wirken. Für grampositive Bakterien existiert kein entsprechender Test. Daher wurde eine einfache Methode mit dem grampositiven Keim *Enterococcus faecalis* in Anlehnung auf den Wachstumshemmtest mit *Pseudomonas putida* entwickelt.

3.4.2.1 KEIMAUSWAHL UND METHODENENTWICKLUNG

Bakterien teilen sich in zwei große Gruppen (grampositive und gramnegative), die sich deutlich im Aussehen ihrer Zellwände unterscheiden. Entsprechend wurden Antibiotika mit unterschiedlichen Wirkspektren entwickelt, wobei mit dem genormten Wachstumshemmtest mit *Ps. putida* die hemmende Wirkung der Antibiotika auf das Bakterienwachstum nur teilweise erfasst wird. Daher wurde eine einfache Methode mit dem grampositiven Keim *Enterococcus faecalis* in Anlehnung auf den Wachstumshemmtest mit *Ps. putida* entwickelt und diese hinsichtlich Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur und Nährlösung verändert.

Pseudomonaden sind gramnegative, obligat aerob (nie gärende) Bakterien. Sie haben sehr geringe Nährstoffanforderungen und wachsen chemoorganotroph bei neutralem pH-Wert und bei Temperaturen im mesophilen Bereich. Eine der bemerkenswerten Eigenschaften der Pseudomonaden ist die große Vielfalt organischer Verbindungen als Kohlenstoffquellen und als Elektronendonoren für die Energieerzeugung zu nutzen. Die Pseudomonaden sind ökologisch bedeutende Mikroorganismen im Boden und Wasser und wahrscheinlich für die Zersetzung von vielen löslichen Verbindungen verantwortlich, die aus dem Abbau von Pflanzen- und Tiermaterial in aeroben Biotopen stammen (Brock et al. 2000).

Enterococcus faecalis (grampositive Kokken) ist ein repräsentativer Mikroorganismus der normalen Magen-Darm-Flora des Menschen und gehört zu den Milchsäurebakterien. Die Enterokokken sind in dem menschlichen Magen-Darm-Trakt verteilt im Dünndarm (pH 4-5) und Dickdarm (pH 7). *E. faecalis* als wichtiger Darmbewohner

gelangt stets über die Ausscheidungen ins Abwasser, wo er auch an Abbauvorgängen beteiligt ist. Im Vergleich zu *Ps. putida* ist *E. faecalis* nicht nur ein Umweltkeim. *Enterococcus*-Spezies sind sehr häufig die Ursache nosokomialer Infektionen (*E. faecalis* - Harnwegsinfektionen) und gehören somit zu den fakultativ pathogenen Bakterien. Fast alle nosokomiale Pathogene gehören zur normalen Flora entweder der Patienten oder des Personals. Als Milchsäurebakterium gehört er zu der Gruppe homofermentativer Bakterien, d. h. er produziert ein einziges Gärungsprodukt, Milchsäure. Alle Milchsäurebakterien wachsen anaerob. Im Gegensatz zu vielen Anaerobiern sind jedoch die meisten Milchsäurebakterien nicht gegen O₂ empfindlich, sie sind aerotolerante Anaerobier. Aus den oben genannten Gründen (Umweltkeim, leichte Handhabung im Labor etc.) wurde *E. faecalis* als repräsentativer Keim für die grampositiven Bakterien ausgewählt.

Da die Bakterien unterschiedliche Ansprüche an die Umweltbedingungen haben, wurden die Testbedingungen von dem Wachstumshemmtest mit *Ps. putida* für *E. faecalis* entsprechend angepasst.

Das für *Pseudomonas putida* verwendete Nährmedium erwies sich als ungeeignet für *Enterococcus faecalis*. Die Enterokokken zeigten in diesem Nährmedium ein sehr geringes Wachstum. Nach sechs Stunden Inkubation bei 37°C konnte nicht einmal eine Verdopplung der Zelldichte gemessen werden; die optische Dichte erhöhte sich innerhalb der sechs Stunden lediglich von 0,063 auf 0,11 (s. Tab. 81A und Abb. 56A). Aufgrund der unterschiedlichen Nährstoffbedingungen für *Pseudomonas putida* und *Enterococcus faecalis* wurde in dem entwickelten Wachstumshemmtest das von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) für *Enterococcus faecalis* empfohlene Medium verwendet (Medium 53 - Corynebacterium Agar). Bei diesem Nährmedium wurden enorme Wachstumsraten ($\mu = 0,74 \text{ h}^{-1}$) von *E. faecalis* erzielt. Bei 37°C erhöhte sich die optische Dichte nach sieben Stunden von 0,058 auf 2,06 (s. Tab. 81B und Abb. 56B).

Tab. 81: A – gemessene optische Dichte von *Ps. putida* und *E. faecalis* in der Nährlösung nach EN ISO 10712 : 1995 für *Ps. putida*; B – gemessene optische Dichte von *E. faecalis* in Medium 53 bei 25°C und 37°C

A

Zeit [h]	<i>Ps. putida</i>	<i>E. faecalis</i>	
	OD (25°C)	OD (25°C)	OD (37°C)
0	0,063	0,066	0,063
1	0,076	0,061	0,065
2,5	0,119	0,061	0,072
4	0,196	0,069	0,086
5	0,253	0,084	0,103
6	0,33	0,089	0,11

B

Zeit [h]	<i>E. faecalis</i>	
	OD (37°C)	OD (25°C)
0	0,058	0,059
1	0,065	0,067
2	0,089	0,072
3	0,201	0,103
4	0,418	0,164
5,5	1,76	0,245
7	2,06	0,41
8	2,08	0,594

Bei der für *Pseudomonas putida* optimalen Temperatur 25°C sind die Enterokokken vergleichsweise langsam gewachsen. Wie in der Tabelle 26B zu erkennen ist, war die Zelldichte bei 37°C in Medium 53 nach 5,5 Stunden siebenmal höher als bei 25°C; nach 7 Stunden war die Zelldichte bei 37°C fünfmal so groß wie bei 25°C. Das an Körpertemperatur angepasste Bakterium *Enterococcus faecalis* wächst also optimal bei 37°C. Richter (1999) hatte ein Temperaturoptimum von 37-39°C für *Enterococcus faecalis* herausgefunden. Deshalb und aufgrund der experimentellen Ergebnisse wurde die Wachstumstemperatur auf 37°C festgesetzt.

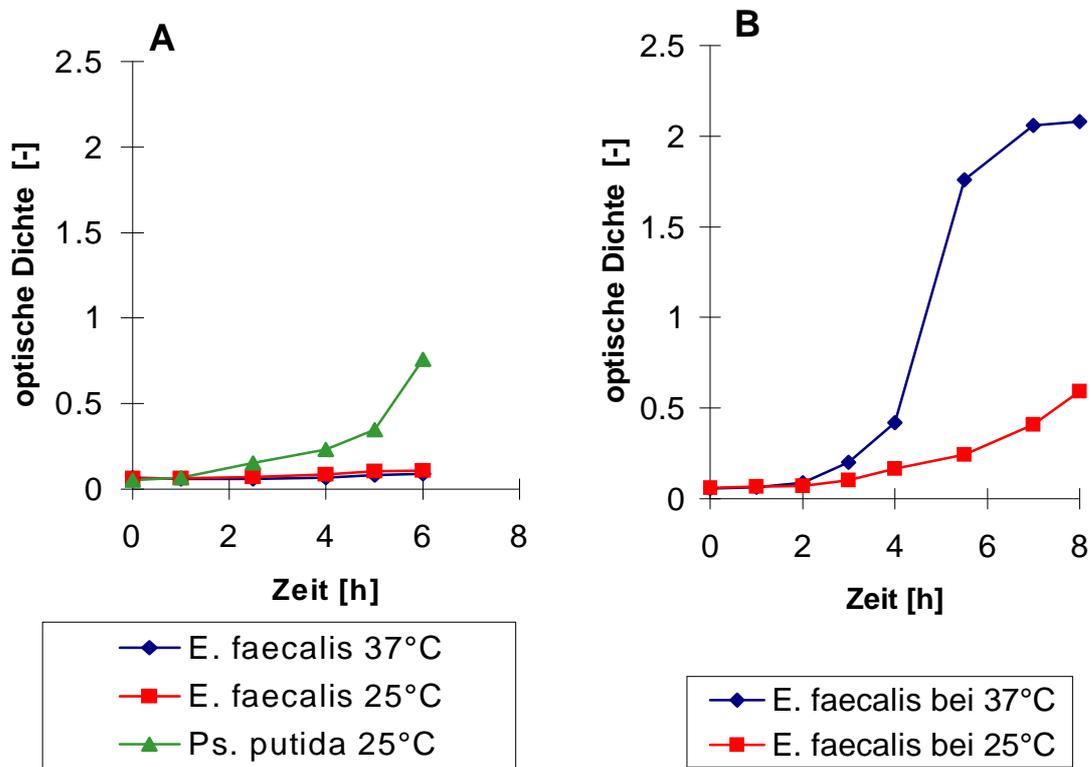


Abb. 56: A: Wachstum von *E. faecalis* und *Ps. putida* in der Nährlösung nach EN ISO 10712 : 1995 für *Ps. putida*; B: Wachstum von *E. faecalis* in Medium 53 bei 25°C und 37°C

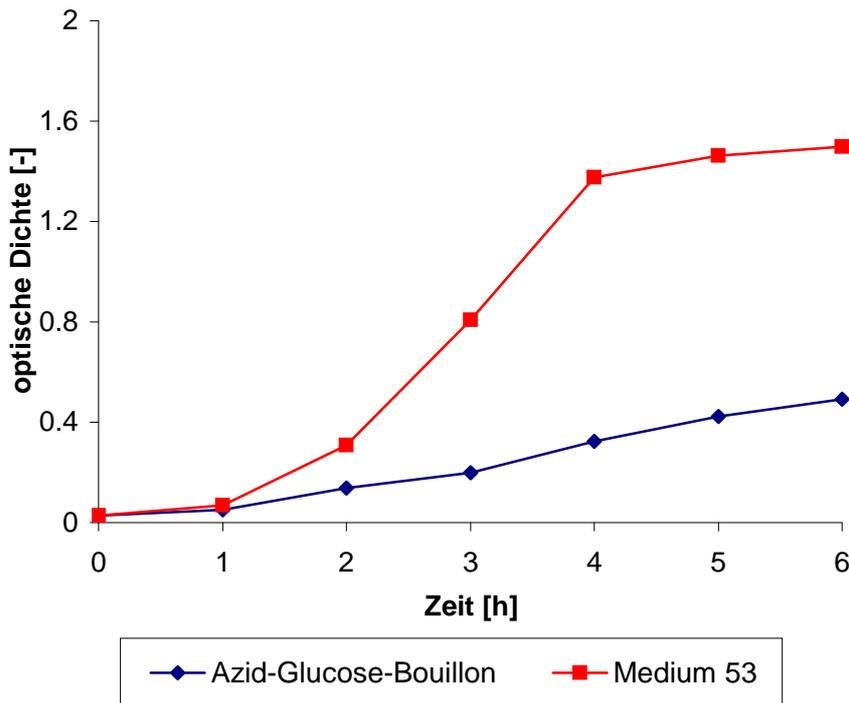


Abb. 57: Wachstum von *E. faecalis* in Medium 53 und Azid-Glucose-Bouillon

Da es sich bei der von der DSMZ empfohlenen Nährmedium 53 um eine Nährlösung für Corynebakterien handelt, wurde diese auch mit Azid-Glucose-Bouillon, einem Nährmedium zur selektiven Anreicherung von *E. faecalis* verglichen.

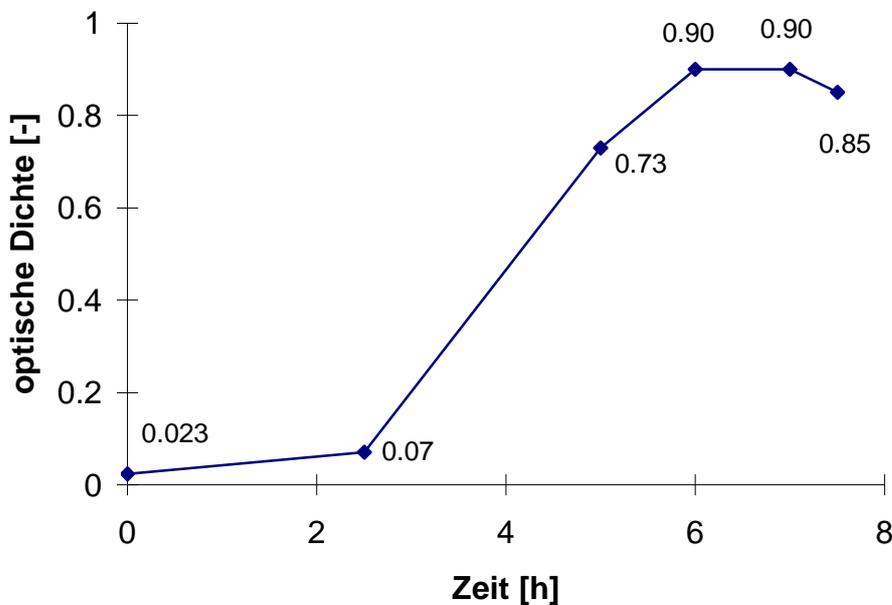
Abb. 57 zeigt den Wachstumsverlauf von *E. faecalis* in den beiden unterschiedlichen Nährmedien.

Nach sechsständiger Inkubation bei 37°C konnte im Ansatz mit Medium 53 eine Wachstumsrate von 0,95 h⁻¹ und eine Generationszeit von 1,05 h über die optische Dichte berechnet werden. In Azid-Glucose-Bouillon betrug die Wachstumsrate von *E. faecalis* lediglich 0,68 h⁻¹ mit einer Generationszeit von 1,47 h. Vergleicht man den Wachstumsverlauf der beiden Kurven, so lag die optische Dichte im Testansatz mit Medium 53 dreimal höher als im Ansatz mit Azid-Glucose-Bouillon.

Auch bei der Testdauer waren Veränderungen nötig, da *E. faecalis* in der ausgewählten Nährlösung (Medium 53) und der festgesetzten Temperatur (37°C) sehr viel schneller wächst als *Ps. putida*. Es wurde eine Wachstumskurve von *E. faecalis* in Medium 53 aufgenommen, wobei die Verdünnung derjenigen im Wachstumshemmtest entspricht (1:5). Aus der Wachstumskurve ist ersichtlich, dass sich eine Sättigung bereits nach sechs Stunden einstellt; die Bakterien befinden sich also nach sechs Stunden in der stationären Phase (s. Abb. 58). Da sich *Ps. putida* zu dieser Zeit noch in der exponentiellen Wachstumsphase befindet und die Stagnationsphase erst später erreicht wird, wurde die Inkubationszeit nach der DIN EN ISO 10712 : 1995 auf 16 Stunden festgelegt. Die Dauer der Inkubation für *E. faecalis* wird wegen der unterschiedlichen Wachstumskinetik auf sechs Stunden angesetzt. Eine längere Inkubationszeit könnte sich negativ auswirken, weil nach 7,5 Stunden bereits bei *Enterococcus faecalis* eine Abnahme der optischen Dichte gemessen wurde, d. h. die Bakterienpopulation geht von dem kryptischen Wachstum (stationäre Phase) in die Absterbephase über. Die Inkubationszeit der Vorkultur wird auf drei Stunden angesetzt, weil sich *E. faecalis* nach drei Stunden in der logarithmischen Phase befindet und die Bakteriendichte ausreichend ist, um eine Suspension zu erhalten, die der optischen Dichte von 50 FNU entspricht (s. Abb. 58).

Tab. 82: Gemessene optische Dichte von *E. faecalis* bei 37°C in Medium 53 (Verdünnung 1:5)

Zeit [h]	<i>E. faecalis</i> Optische Dichte
0	0,023
2,5	0,07
5	0,73
6	0,90
7	0,90
7,5	0,85

Abb. 58: Wachstum von *E. faecalis* bei 37°C in Medium 53 (Verdünnung 1:5)

Im Wachstumshemmtest mit *Pseudomonas putida* (EN ISO 10712 : 1995) kann der Test als valide betrachtet werden, wenn sich das Inokulum im Kontrollansatz (5 FNU) innerhalb der Testzeit mindestens um den Faktor 60 vervielfacht hat und wenn die EC_{50} der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol im Bereich von 10 mg/l und 30 mg/l liegt.

Im Wachstumshemmtest mit *Enterococcus faecalis* können die Kriterien übernommen werden, was die EC_{50} der Referenzsubstanz betrifft. Hinsichtlich der Vervielfachung müssen dagegen Veränderungen in den Gültigkeitskriterien vorgenommen werden. Anhand der aufgenommenen Wachstumskurve (Abb. 58) kann man erse-

hen, dass sich die Bakteriendichte von *Enterococcus faecalis* höchstens um den Faktor 39 vervielfacht hat, nämlich von 0,023 OD auf 0,85 OD (Tab. 82). In Anbetracht der Ergebnisse, die die aufgenommene Wachstumskurve liefert, wird der Test bereits als gültig betrachtet, wenn eine Vervielfachung um den Faktor 30 gemessen wird.

Da *Enterococcus faecalis* zu dem aerotoleranten Anaerobier gehört und nach der Testvorschrift für *Pseudomonas putida* die Testansätze wegen ausreichenden Sauerstoffzufuhr geschüttelt werden müssen, wurden auch die Sauerstoffansprüche des grampositiven Keimes überprüft. Aus Abbildung 59 ist ersichtlich, dass der fakultativ anaerobe Keim *E. faecalis* unter Schütteln und Luftzufuhr deutlich besser wächst als unter nahezu anaeroben Bedingungen.

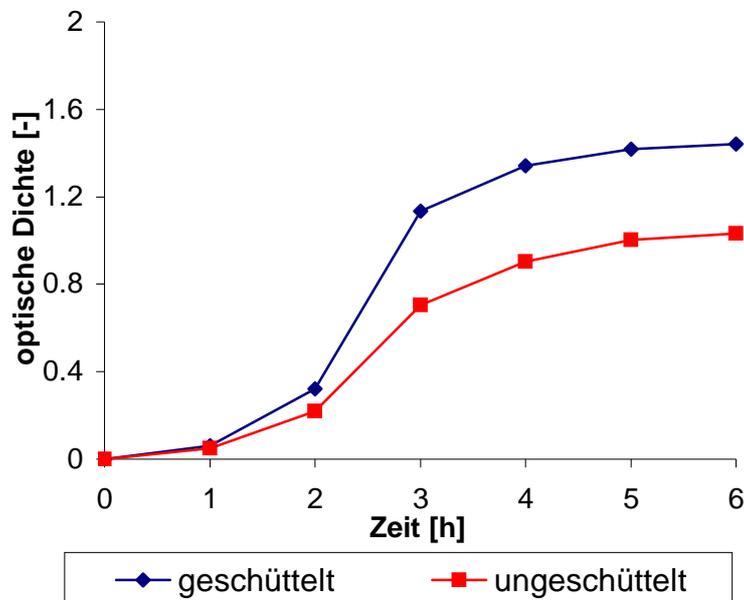


Abb. 59: Wachstum von *E. faecalis* mit und ohne Luftzufuhr

Unter Luftausschluss und ohne Schütteln betrug die Wachstumsrate für *E. faecalis* $0,96 \text{ h}^{-1}$ mit einer Generationszeit von 1,16 h. Die optische Dichte des Inokulums vervielfachte sich dabei um etwa den Faktor 36. Im Gegensatz dazu konnte im belüfteten und geschüttelten Ansatz eine Wachstumsrate von $0,96 \text{ h}^{-1}$ und eine Generationszeit von 1,04 h ermittelt werden. Die optische Dichte erhöhte sich um etwa den Faktor 55.

In Abb. 60 ist das Wachstum in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Aus der Grafik ergibt sich ein Wachstumsbereich für *E. faecalis* von etwa pH 6 bis pH 10. Das Wachstumsoptimum liegt ungefähr zwischen pH 7 und 8.

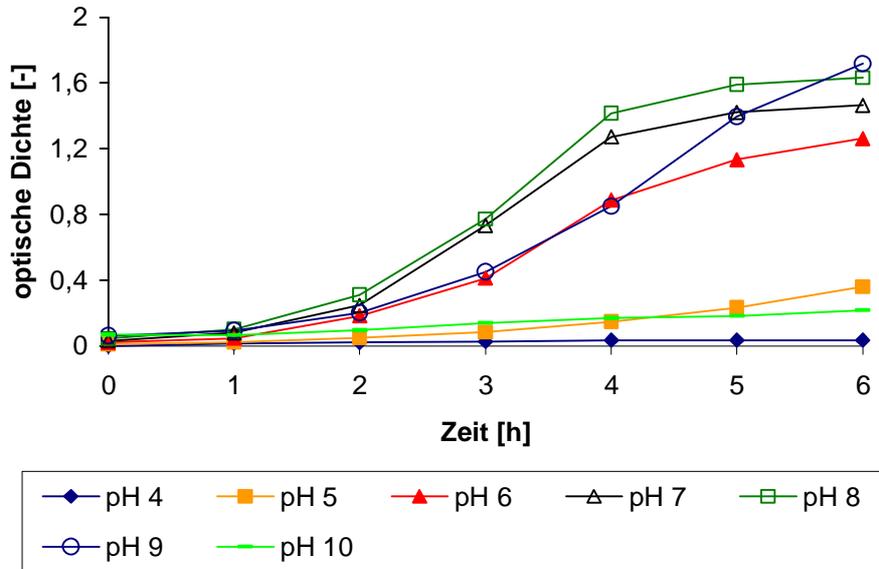


Abb. 60: Wachstum von *E. faecalis* in Abhängigkeit des pH-Wertes

Abb. 61 zeigt den pH-Verlauf der Testansätze mit pH 4 bis pH 10 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.

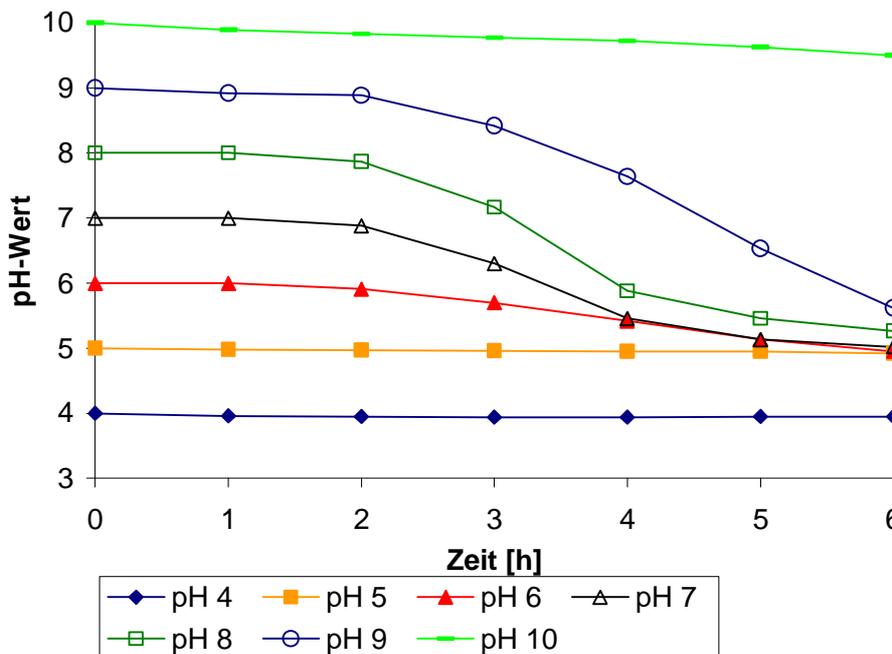


Abb. 61: pH-Wert in den Testansätzen mit pH 4 bis pH 10

Vergleicht man den Verlauf der Kurven in Abb. 60 und 61, so wird ein deutlicher Zusammenhang zwischen Wachstumskurve und pH-Wert ersichtlich.

Bei einem pH-Wert kleiner 5 und größer 9 trat nahezu kein Wachstum ein, und der pH-Wert in den Testansätzen blieb weitgehend konstant. In einem pH-Bereich zwischen pH 6 und pH 9 verhielt sich das Wachstum von *E. faecalis* proportional der

pH-Wert Senkung. Sank der pH-Wert in den Testansätzen auf einen Wert von etwa pH 5, stagnierte das Wachstum.

Dieser Zusammenhang bestätigt darüber hinaus die Festlegung der Inkubationsdauer auf 6 h. Die in Abb. 60 dargestellten Kurven entsprechen in ihrer Zusammensetzung Blindwertansätzen, bei denen ohne Zugabe einer Prüfsubstanz maximales Wachstum bzw. maximale pH-Wert Absenkung zu erwarten ist. Betrachtet man in Abb. 61 die beiden Kurven für pH 7 und pH 8 (Optimum pH 7,2-7,4) so zeigt sich, dass innerhalb 6 h eine pH-Wert Absenkung auf ca. pH 5 eintritt, wodurch kaum Wachstum mehr stattfinden kann.

3.4.2.2 VERGLEICH DER ERGEBNISSE FÜR BEIDE KEIME

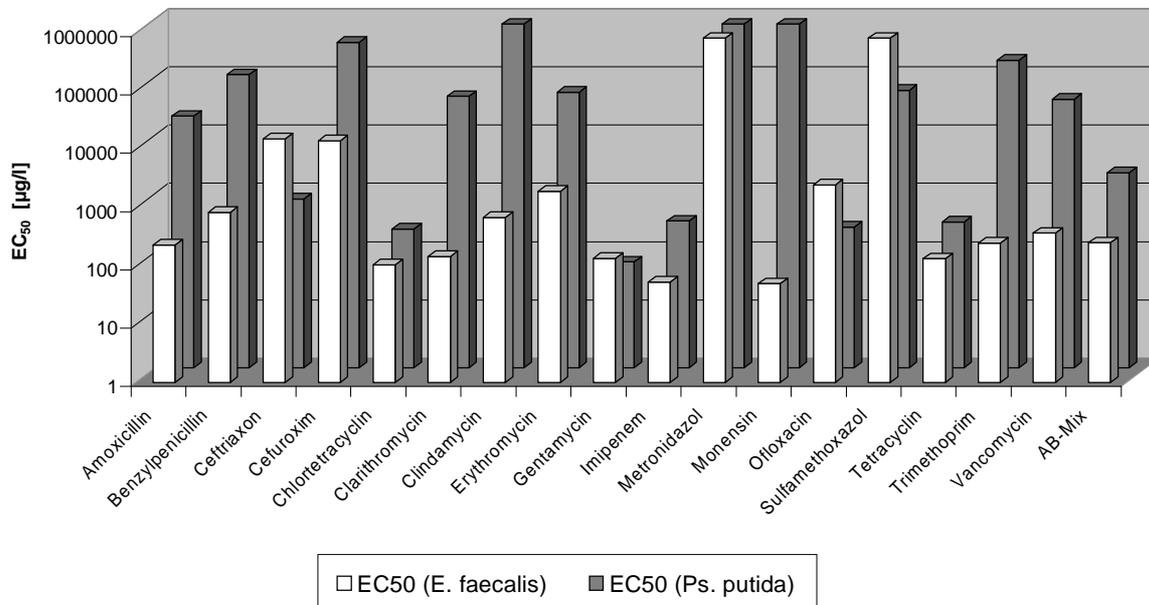


Abb. 62: Vergleich der EC₅₀-Werte aus dem Wachstumshemmttest mit *E. faecalis* und *Ps. putida*

Tab. 83: Effektkonzentrationen aus dem Wachstumshemmtest mit *Ps. putida* (ATCC 50026)

Substanz	EC ₁₀ [µg/l]	EC ₅₀ [µg/l]	EC ₉₀ [µg/l]	PEC ^{*)} [µg/l]	PEC/PNEC (TGD, 1996)	PEC/PNEC (IUK)
Amoxicillin	1.540	20.926	284.267	2,571	0,001	0,123
Benzylpenicillin	46.908	108.638	251.600	0,143	0,000	0,001
Ceftriaxon	102	799	6.259	0,071	0,001	0,089
Cefuroxim	78.757	389.469	>800.000	0,250	0,000	0,001
Chlortetracyclin	79	241	736	-	-	-
Clarithromycin	12.692	46.062	167.168	0,054	0,000	0,001
Clindamycin	>800.000	>800.000	>800.000	0,040	0,000	0,000
Erythromycin	10.718	54.498	277.098	0,053	0,000	0,001
Gentamycin	26	66	168	0,006	0,001	0,091
Imipenem	111	333	998	0,036	0,001	0,108
Metronidazol	342.368	>800.000	>800.000	0,084	0,000	0,000
Monensin	>800.000	>800.000	>800.000	-	-	-
Nystatin	Antimykotikum	-	-	0,102	-	-
Ofloxacin	90	265	779	0,110	0,004	0,415
Sulfamethoxazol	17.393	58.711	198.182	1,113	0,000	0,019
Tetracyclin	71	322	1.468	0,000	0,000	0,000
Trimethoprim	95.793	190.208	377.680	0,153	0,000	0,001
Vancomycin	7.263	40.910	230.529	0,036	0,000	0,001
AB-Mix	750	2.259	6.806	-	-	-

*) Bilanzierung für gesamte BRD, 1998 (Kümmerer und Henninger 2003)

Tab. 84: Effektkonzentrationen aus dem Wachstumshemmtest mit *E. faecalis* (ATCC 29212)

Substanz	EC ₁₀ [µg/l]	EC ₅₀ [µg/l]	EC ₉₀ [µg/l]	PEC ^{*)} [µg/l]	PEC/PNEC (IUK)
Amoxicillin	76	225	669	2,571	11,427
Benzylpenicillin	249	821	2.699	0,143	0,174
Ceftriaxon	944	14.867	234.056	0,071	0,005
Cefuroxim	1.528	13.828	125.163	0,250	0,018
Chlortetracyclin	33	102	312	-	-
Clarithromycin	42	143	485	0,054	0,378
Clindamycin	312	672	1.448	0,040	0,060
Erythromycin	562	1.866	6.195	0,053	0,028
Gentamycin	34	133	525	0,006	0,045
Imipenem	15	52	184	0,036	0,692
Metronidazol	474.306	>800.000	>800.000	0,084	0,000
Monensin	3	49	897	-	-
Nystatin	Antimykotikum	-	-	0,102	-
Ofloxacin	632	2.424	9.295	0,110	0,045
Sulfamethoxazol	153.592	>800.000	>800.000	1,113	<0,001
Tetracyclin	19	131	880	0,000	0,000
Trimethoprim	91	242	645	0,153	0,632
Vancomycin	78	361	1.672	0,036	0,100
AB-Mix	92	248	668	-	-

*) Bilanzierung für gesamte BRD, 1998 (Kümmerer und Henninger 2003)

Tab. 85: Vergleich der EC₅₀- und EC₉₀-Werte von *Ps. putida* mit Literaturwerten

Substanz	MHK ₅₀	EC ₅₀	Quotient	Bereich d. MHK	EC ₉₀	Quotient
	<i>Ps. putida</i> Lorian 1991 [µg/l]	<i>Ps. putida</i> ATCC 50026 Experiment [µg/l]	MHK ₅₀ Lorian EC ₅₀ Exp.	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853 NCCLS 1998 [µg/l]	<i>Ps. putida</i> ATCC 50026 Experiment [µg/l]	Bereich d. MHK NCCL EC ₉₀ Exp.
Amoxicillin	-	20.926	-	-	284.267	-
Benzylpenicillin	>256.000	108.638	>2,4	-	251.600	-
Ceftriaxon	-	799	-	8.000-32.000	6.259	1,3-5,1
Cefuroxim	-	389.469	-	-	>800.000	-
Chlortetracyclin	-	241	-	-	736	-
Clarithromycin	-	46.062	-	-	167.168	-
Clindamycin	-	>800.000	-	-	>800.000	-
Erythromycin	-	54.498	-	-	277.098	-
Gentamycin	-	66	-	500-2.000	168	3-12
Imipenem	-	333	-	1.000-4.000	998	1-4
Metronidazol	-	>800.000	-	-	>800.000	-
Monensin	-	>800.000	-	-	>800.000	-
Nystatin	-	-	-	-	-	-
Ofloxacin	10	265	0,04	1.000-8.000	779	1,3-10,3
Sulfamethoxazol	256.000	58.711	4,4	-	198.182	-
Tetracyclin	-	322	-	8.000-32.000	1.468	5,4-21,8
Trimethoprim	-	190.208	-	>64.000	377.680	<0,2
Vancomycin	-	40.910	-	-	230.529	-

Tab. 86: Vergleich der EC₅₀- und EC₉₀-Werte von *E. faecalis* mit Literaturwerten

Substanz	MHK ₅₀	EC ₅₀	Quotient	Bereich d. MHK	EC ₉₀	Quotient
	<i>E. faecalis</i> Lorian 1991 [µg/l]	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 Experiment [µg/l]	MHK ₅₀ Lorian EC ₅₀ Exp.	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 NCCLS 1998 [µg/l]	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 Experiment [µg/l]	Bereich d. MHK NCCL EC ₉₀ Exp.
Amoxicillin	1000	225	4,4	250/120- 1000/500	669	0,4/0,2- 1,5/0,8
Benzylpenicillin	-	821	-	-	2699	-
Ceftriaxon	64.000-128.000	14.867	4,3-8,6	-	234.056	-
Cefuroxim	15-256.000	13.828	0,001-18,6	-	125.163	-
Chlortetracyclin	-	102	-	-	312	-
Clarithromycin	8.000	143	56	-	485	-
Clindamycin	16.000-32.000	672	23,8-47,6	4.000-16.000	1.448	2,8-11
Erythromycin	1.000-4.000	1.866	0,5-2,1	1.000-4.000	6.195	0,2-0,6
Gentamycin	4.000-32.000	133	30,1-240,6	4.000-16.000	525	7,6-30,5
Imipenem	500-2.000	52	9,6-38,5	500-2.000	184	2,7-10,9
Metronidazol	-	>800.000	-	-	>800.000	-
Monensin	-	49	-	-	897	-
Nystatin	Antimykotikum	-	-	-	-	-
Ofloxacin	1.000-4.000	2.424	0,4-1,7	1.000-4.000	9.295	0,1-0,4
Sulfamethoxazol	256.000	>800.000	<0,32	-	>800.000	-
Tetracyclin	64.000	131	488,5	8.000-32.000	880	9,1-36,4
Trimethoprim	250	242	1,0	<1000	645	<1,6
Vancomycin	1.000-2.000	361	2,8-5,5	1.000-4.000	1.672	0,6-2,4

Es wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen der eingesetzten Antibiotikakonzentration und der Hemmwirkung festgestellt. Die Ergebnisse für einzelne Antibiotika und die zwei Keime *Ps. putida* und *E. faecalis* stimmen mit den Wirkungsspektren der Stoffe überein. Beim Vergleich der EC₅₀-Werte von *Ps. putida* und *E. faecalis* ist der Letztgenannte gegen die ausgewählten Antibiotika außer Ceftriaxon, Gentamycin, Ofloxacin und Sulfamethoxazol empfindlicher, wobei dies von den Wirkungsspektren der Antibiotika abhängt (Tab. 83-86). Damit ist dieser Test für die Erfassung der Risiken für die aquatische Umwelt unverzichtbar. Schließlich steht die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Gattungen und Arten im Vordergrund. Allein aus Praktikabilitätsgründen kann nur eine verschwindend geringe

Zahl von Tier- und Pflanzenarten für Biotestverfahren verwendet werden, wobei jedoch nicht immer wissenschaftliche (z. B. hohe Empfindlichkeit und/oder Stellvertreterrolle für eine Biozönose oder eine trophische Ebene), sondern oft eher wirtschaftliche und historische Gründe für die Artwahl ausschlaggebend waren. Weiterhin ist bekannt, dass einige Arten überhaupt keine Reaktionen auf einen Schadstoff oder ein Medikament zeigen, während andere massiv geschädigt werden (Beispiel Contergan-Katastrophe) (Oehlmann und Markert 1999). Ein ähnliches Beispiel haben wir bereits bei den durchgeführten Tests mit zwei unterschiedlichen Keimen. Die Effektkonzentrationen von Monensin, die eine 50% Wachstumshemmung bei *Ps. putida* verursachen, sind für die aquatische Umwelt nicht relevant. Dabei wurde das Wachstum von *E. faecalis* bei einer Konzentration von 49 µg/l Monensin schon zu 50% gehemmt.

Aus allen diesen Gründen sollte an der Weiterentwicklung des Wachstumshemmtests mit *E. faecalis* gearbeitet werden und es sollten weitere Arten entsprechend untersucht werden, um eine bessere Übersicht über die Einwirkung der Antibiotika in der aquatischen Umwelt und Reinigungsleistung der Kläranlagen zu gewinnen.

Es sollte beachtet werden, dass die Ergebnisse von Toxizitätsuntersuchungen mit Bakterien stark von den gewählten Versuchsbedingungen abhängig sind (Wagner und Kayser 1990). Bisher ist das Zusammenwirken von verschiedenen Schadstoffen (Synergismus, Antagonismus) ebenso unzureichend untersucht wie die Beeinflussung des Ergebnisses durch unterschiedliche Testbedingungen, die selbstverständlich auch eine Implikation für das Freiland haben (z. B. Temperatur-, Fotoperioden- oder Fortpflanzungszyklen) (Oehlmann und Markert 1999).

Ein Vergleich der ermittelten Ergebnisse mit Literaturdaten ist aufgrund der fehlenden Daten für *Ps. putida* kaum möglich. Im Document M7-A3 von The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 1998) sind von einigen Stoffen die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) für den Humankeim *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 zitiert und für einige Antibiotika die MHK Werte für in der Humanmedizin relevante Keime dokumentiert (Lorian 1991). Es wurde ein Quotient zwischen den Literaturdaten und den gemessenen Werten berechnet und dieser mit den Literaturwerten für jeden Stoff aufgelistet. Das gleiche wurde auch für den Keim *E. faecalis* durchgeführt, nur mit dem Unterschied, dass dieser Keim für die Medizin auch relevant ist und deswegen lagen mehrere MHK-Werte des gleichen Stammes in NCCLS (1998) für einen Vergleich zur Verfügung. In Lorian (1991) wurden auch die

50%ige Hemmeffekte auf den Keim *E. faecalis* aber ohne Angabe des Stammes aufgelistet. Diese MHK-Werte dürfen nicht streng miteinander verglichen werden, da die Keime einer Gattung unterschiedlich empfindlich sind und durch die Versuchsbedingungen unterschiedlich beeinflusst werden. Mangels verfügbarer Daten für Umweltbakterien ermöglicht der Vergleich mit den in der Humanmedizin relevanten Keimen (NCCLS 1998) aber eine erste grobe Einschätzung (Tab. 85-86).

Die Risikobewertung (PEC/PNEC-Verhältnis nach TGD 1996 und IUK, Tab. 83 und 84) ist in Kapitel 4.5.3 ausführlich diskutiert.

Amoxicillin hat eine bakterizide Wirkung, vorwiegend gegen grampositive Bakterien. Es wirkt aber auch im gramnegativen Bereich, vor allem bei gramnegativen Stäbchen verursacht es eine relativ rasch eintretende Bakterizidie, aber nicht bei medizinisch relevanten Pseudomonaden. Der Quotient zwischen EC_{50} -Wert von *Ps. putida* und *E. faecalis* liegt bei 93, was dem Wirkungsspektrum des Antibiotikums entspricht. Nach Lorian (1991) verursacht Amoxicillin eine 50%ige Hemmung (MHK_{50}) bei *Enterococcus faecalis* im Bereich 1 mg/l. Gemessen wurde 225 µg/l (EC_{50}) bei *E. faecalis* (um Faktor 4,4 tiefer). Die angewendete Methode in Lorian (1991) ist nicht beschrieben und die Stammnummer des Keimes ist nicht bekannt. In der Medizin wird der Keim *E. faecalis* Stamm-Nr. ATCC 29212 auf Empfindlichkeit gegen Chemotherapeutika nach der DIN 58940 bzw. NCCLS (Makrodilution) geprüft. Die minimale Hemmkonzentration wird in der Konzentration festgestellt, in der ein makroskopisch sichtbares Wachstum des Inokulums verhindert wird, d. h. sie entspricht ca. der EC_{90} des Wachstumshemmtests. Beim Vergleich der in NCCLS (1998) zitierten MHK-Bereiche für Qualitätskontrollen und festgestellten Wachstumshemmkonzentrationen liegen die Werte im gleichen Empfindlichkeitsbereich, obwohl jeweils eine andere Methode angewendet wurde. Da es sich bei den NCCLS-Werten um akzeptierte Bereiche für die Überprüfung der Qualität der mikrobiologischen Tests handelt, wurde dem Vergleich mit diesen MHK-Bereichen höhere Bedeutung beigelegt.

Benzylpenicillin (Penicillin G) wirkt wie Amoxicillin bakterizid, vor allem gegen grampositive Keime. Die bakteriellen β -Lactamasen verursachen die Inaktivierung des Benzylpenicillins. Der Quotient zwischen EC_{50} -Wert von *Ps. putida* und *E. faecalis* liegt bei 132, was dem Wirkungsspektrum des Antibiotikums entspricht. Es liegen keine weiteren Daten zum Vergleich vor.

Ceftriaxon aus der Gruppe Cephalosporine hat eine sehr gute Wirksamkeit gegen gramnegative Keime außer *Pseudomonas aeruginosa* und ist auch gegen β -Lactamasen stabil. Damit liegen die EC_{50} -Werte von *E. faecalis* entsprechend höher im Vergleich zu *Ps. putida*. Ceftriaxon, Ofloxacin und Sulfamethoxazol sind die einzigen Stoffe, gegen die *E. faecalis* weniger empfindlich ist. Beim Vergleich der ermittelten Hemmeffekte mit Literaturdaten (Lorian 1991, *E. faecalis* MHK_{50} =64.000-128.000 $\mu\text{g/l}$) liegen die vorliegenden Ergebnisse um den Faktor 4,3-8,6 tiefer.

Cefuroxim hat eine ähnliche Wirkung wie Ceftriaxon. Es hat eine verstärkte Wirkung gegen gramnegative Stäbchen, wirkt aber auch gegen grampositive Staphylokokken und Streptokokken. Nach Daschner (1996) ist Cefuroxim gegen Enterokokken und *Pseudomonas* unwirksam. Dies hat sich auch in den hohen EC_{50} -Werten von *Ps. putida* und *E. faecalis* widerspiegelt. Nach Lorian (1991) verursacht Cefuroxim eine 50%ige Hemmwirkung bei *E. faecalis* im Konzentrationsbereich zwischen 15 und 256.000 $\mu\text{g/l}$. Die im Wachstumshemmtest bestimmte Konzentration EC_{50} =13.828 $\mu\text{g/l}$ liegt in diesem breiten Bereich.

Chlortetracyclin und **Tetracyclin** wirken bakteriostatisch und haben ein breites Wirkungsspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Nach NCCLS (1998) liegen beim Tetracyclin die minimalen Hemmkonzentrationen von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 und *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 im Bereich zwischen 8.000 und 32.000 $\mu\text{g/l}$. Die Konzentration, bei welcher Tetracyclin eine 90%ige Hemmung des Wachstums von *Pseudomonas putida* verursacht, liegt um etwa Faktor 5,4 (EC_{90} =1.468 $\mu\text{g/l}$) und beim *E. faecalis* um Faktor 9,1 (EC_{90} =880 $\mu\text{g/l}$) tiefer. Die Hemmwirkungen von Chlortetracyclin und Tetracyclin sind bei beiden Keimen vergleichbar.

Clarithromycin wirkt bakteriostatisch wie andere Makrolide und dessen Wirkungsspektrum ist dem Erythromycin ähnlich (Schwerpunkt im grampositiven Bereich). Der Quotient zwischen EC_{50} -Werten von *Ps. putida* und *E. faecalis* liegt entsprechend der Wirkung um Faktor 322 tiefer. Für einen Vergleich der Hemmwirkung von *Ps. putida* lagen keine weiteren Daten vor. Für *E. faecalis* ist in Lorian (1991) ein um den Faktor 56 höherer EC_{50} -Wert angegeben, was mit der Anwendung eines weniger empfindlichen Stammes des Keimes *E. faecalis* zusammenhängen könnte.

Clindamycin hat ein enges bakteriostatisches Wirkungsspektrum gegen grampositive Bakterien und gramnegative Anaerobier (Bacteroidaceae) sowie einige Protozoen. Deshalb waren keine großen Wirkungen auf den getesteten gramnegativen

Keim *Ps. putida* zu erwarten. Diese Erwartung hat sich mit dem Wert $EC_{10} > 800.000$ µg/l bestätigt. Dagegen wurde bei *E. faecalis* eine starke Hemmung beobachtet ($EC_{50}=672$ µg/l). Die MHK-Werte von NCCLS (1998) sind mit den beobachteten Wachstumshemmeffekten vergleichbar im Widerspruch zu den Werten von Lorian (1991). Dies wurde entsprechend erläutert beim Amoxicillin und diese Tendenz wird beim Vergleich von allen Werten von NCCLS (1998) mit Lorian (1991) beobachtet.

Erythromycin wirkt bakteriostatisch und sein Wirkungsschwerpunkt liegt im grampositiven Bereich, jedoch werden auch gramnegative Keime und sog. atypische Keime erfasst. Der Keim *E. faecalis* ist auch gegen Erythromycin empfindlicher als *Ps. putida* (um Faktor 29). Die in Lorian (1991) und NCCLS (1998) zitierten Hemmeffekte sind in beiden Fällen mit den beobachteten Wachstumshemmwirkungen vergleichbar.

Gentamycin hat ein breites Wirkungsspektrum gegen viele gramnegative Keime, eingeschlossen *Pseudomonas aeruginosa* und grampositive Keime (Staphylokokken, nicht: Pneumokokken, Streptokokken und Enterokokken). Beide untersuchten Keime sind gegen Gentamycin sehr empfindlich (*Ps. putida* $EC_{50}=66$ µg/l; *E. faecalis* $EC_{50}=133$ µg/l). NCCLS (1998) gibt die Empfindlichkeit gegen *Ps. aeruginosa* mit dem niedrigsten Wert von 500 µg/l an. Der EC_{90} Wert aus dem Wachstumshemmtest mit *Pseudomonas putida* lag im gleichen Bereich (168 µg/l, nur Faktor 3 tiefer). Beim *E. faecalis* liegen die gemessenen EC_{90} -Werte um den Faktor 7,6 tiefer.

Imipenem hemmt die Zellwandsynthese der Bakterien und besitzt in niedrigen Konzentrationen eine starke bakterizide Wirksamkeit. Es hat ein sehr breites Wirkungsspektrum, das viele grampositive und gramnegative Bakterien, einschließlich Anaerobier umfasst. Die in den Versuchen festgestellte 90%ige Hemmwirkung gegen *Pseudomonas putida* bei 998 µg/l liegt im Vergleich zu *Ps. aeruginosa* nach NCCLS (1998) in dem gleichem Bereich (Faktor 1). Die Hemmeffekte auf *E. faecalis* sind um Faktor 2,7 tiefer.

Metronidazol wirkt ausschließlich gegen Anaerobier. Alle Aerobier sind laut Literatur resistent. Die leichte festgestellte Hemmung (*Ps. putida* $EC_{10}=342.368$ µg/l; *E. faecalis* $EC_{10}=474.306$ µg/l) könnte mit der hohen Konzentration des Stoffes und weiteren unbekanntem Einflüssen zusammenhängen. Kümmerer et al. (2000) haben bis 64 mg/l bei *Ps. putida* keine Wachstumshemmung festgestellt. Die Schwankungen in der Relation zwischen den eingesetzten Konzentrationen und den beobachteten

Hemmwirkungen könnte man durch die Instabilität des Stoffes unter Einwirkung von Licht und durch die Abnahme der Aktivität des Stoffes unter O₂-Einfluss erklären.

Monensin ist ausschließlich gegen grampositive Keime gerichtet. Dieses Wirkungsspektrum wurde auch an den Ergebnissen beobachtet. *E. faecalis* zeigte gegenüber Monensin die empfindlichste Reaktion von allen untersuchten Substanzen (EC₅₀=49 µg/l). Im Gegensatz dazu hat die Substanz das Wachstum von *Ps. putida* nicht gehemmt, sondern mit einer erkennbaren Tendenz in Abhängigkeit von der Konzentration das Wachstum sogar gefördert. Denkbar wäre, dass die Testsubstanz abgebaut wurde und somit als zusätzliche C-Quelle zur Verfügung steht.

Nystatin hat eine fungizide Wirkung auf Hefepilze. Diese Wirkung erstreckt sich sowohl auf wachsende als auch ruhende Zellen. Ferner umfasst das Wirkungsspektrum auch Schimmelpilze, dimorphe Pilze sowie - jedoch weitaus geringer - Dermatophyten. Gegen Bakterien wirkt Nystatin nicht. Daher wurde der Wachstumshemmtest mit *Pseudomonas putida* und *Enterococcus faecalis* nicht durchgeführt.

Ofloxacin wirkt nahezu gegen alle grampositiven und gramnegativen Erreger, es zeigt nur geringe Wirksamkeit gegen *Pseudomonas aeruginosa*, Enterokokken, Streptokokken und Pneumokokken. Deshalb wurden auch nur Hemmwirkungen gegen *Ps. putida* erwartet. Nach Kümmerer et al. (2000) wurde das Wachstum des Bakteriums *Pseudomonas putida* bei einer Konzentration von 10 µg/l zu 50% gehemmt (Proteinbestimmung). Die vorliegenden Ergebnisse gemessen über die optische Dichte lagen um einen Faktor von 26,5 höher. Bei *E. faecalis* wurde eine 50%ige Hemmung bei einer Konzentration von 2.424 µg/l beobachtet und beim Vergleich der EC₉₀-Werte mit NCCLS (1998) lagen die beobachteten Hemmungen ca. doppelt so hoch wie die obere Grenze (Quotient NCCLS gegen EC₉₀- Wert 0,1-0,4).

Sulfamethoxazol hat ein breites Wirkungsspektrum, das durch die Resistenzentwicklung eingeschränkt ist. Bei *Ps. putida* wurde eine EC₅₀ bei 58.711 µg/l beobachtet und bei *E. faecalis* wurde bei der Konzentration von 895.435 µg/l die Hemmwirkung von 50% sichtbar. Dieses Antibiotikum zeigt neben dem Metronidazol die zweitkleinste Hemmwirkung auf das Bakterienwachstum. Im Vergleich zu Al-Ahmad et al. (1999) (IC₅₀=256 mg/l; Proteinbestimmung) lagen die Wachstumshemmwerte von *Pseudomonas putida* um einen Faktor von 4,4 tiefer. Die gemessene 50%ige Wachstumshemmung bei *E. faecalis* lag im Gegenteil um Quotient <0,32 tiefer als die in Lorian (1991) zitierten Werte.

Trimethoprim hat ein breites antibakterielles Spektrum. Nach der Angabe in NCCLS (1998) sollten minimale Effekte auf die Hemmung des Wachstums bei *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 bei Konzentrationen $>64.000 \mu\text{g/l}$ beobachtet werden. Die EC_{90} Werte bei *Ps. putida* wurden tatsächlich bei einer höheren Konzentration von $377.700 \mu\text{g/l}$ festgestellt (um Faktor 5,9 höher). Die EC_{50} -Werte wurden bei *E. faecalis* bei $242 \mu\text{g/l}$ festgestellt. Nach Lorian (1991) liegt eine 50%ige Hemmung in dem gleichem Bereich von $250 \mu\text{g/l}$. Auch die Werte von NCCLS (1998) sind vergleichbar (um Faktor $<1,6$ höher).

Vancomycin wirkt gut im grampositiven Bereich, vor allem gegen oxallinresistenten Staphylokokken und Enterokokken, gramnegative Keime sind vollständig resistent. Jedoch wurde eine 50%ige Hemmung des Wachstums von *P. putida* bei einer Konzentration von $40.910 \mu\text{g/l}$ festgestellt. Für einen Vergleich liegen keine weiteren Daten vor. Grampositive Keime sind bei Behandlung der Patienten mit Vancomycin ab der Konzentration 32 mg/l resistent (NCCLS 1998), was für eine Resistenz auch bei dem gramnegativen Keim *Ps. putida* spricht. Bei dem Keim *E. faecalis* wurde ein EC_{90} -Wert in einer Konzentration von $1.672 \mu\text{g/l}$ festgestellt. Beim Vergleich der im NCCLS (1998) zitierten MHK-Bereiche für Qualitätskontrollen und festgestellten Wachstumshemmkonzentrationen liegen die Werte im gleichen Empfindlichkeitsbereich.

Die zu erwartenden Konzentrationen von Antibiotika im Krankenhausabwasser liegen im Bereich publizierter minimaler Hemmkonzentrationen gegenüber empfindlichen, d. h. nicht resistenten pathogenen Keimen (Lorian 1991).

In Anbetracht der vielfältigen Einflüsse der Untersuchungsbedingungen sind Schwankungen um Faktor 10 nach dem derzeitigen Kenntnisstand wahrscheinlich nicht von Relevanz und medizinische Daten könnten in der Ökotoxikologie genutzt werden.

3.4.3 Respirationshemmtest (OECD 209 : 1984)

Der Respirationshemmtest ist ein Verfahren zur Ermittlung der Toxizität einer Testsubstanz gegenüber einer Belebtschlammzönose, wobei die anaerobe Population jedoch nicht erfasst wird. Bei diesem Test wird der Verbrauch an Sauerstoff als Endpunkt verwendet. Die Respirationsrate ist ein Maß für die Schadwirkung einer Substanz auf die mikrobielle Zönose. Die meisten Mikroorganismen gewinnen die Energie, die sie für ihre Funktionen wie Wachstum, Transportvorgänge und Bewegung

benötigen, durch die Oxidation chemischer Verbindungen. Viele Organismen oxidieren chemische Verbindung unter Verwendung von Sauerstoff, sie atmen (Brock et al. 2000). Chemische Stressoren können die Bakterien in ihrem Wachstum hemmen oder die Zellen sogar abtöten, was zu einem Rückgang der lebenden Zellen bzw. zu einer Stagnation der Bakterienzahl führt und sich in einer im Vergleich zum Kontrollansatz verminderten Sauerstoffverbrauchsrate äußert.

Die höchste eingesetzte Testkonzentration lag jeweils bei 100 mg/l, da höhere Konzentrationen irrelevant in der Umwelt sind. Darüber hinaus war es notwendig für die Kurvenanpassung der EC-Ermittlung auch Daten im oberen Bereich der Hemmkurve zu haben. Bei der Durchführung des Tests nach der Norm, d. h. halbe bzw. drei Stunden Inkubationsdauer, konnte bei keiner der getesteten Substanzen eine Hemmwirkung im Bereich der EC_{50} festgestellt werden. Daraus wurde allerdings nicht geschlossen, dass Antibiotika keine schädigende Wirkung auf den Belebtschlamm haben. Die Wirkung von chemischen Substanzen generell, so auch von Antibiotika, wird in nicht unerheblichem Maß von der Expositionszeit, d. h. der Zeit, in der die Testorganismen mit der Substanz in Kontakt sind, bestimmt. Es wurde angenommen, dass die sehr kurze Kontaktzeit von 30 Minuten bzw. drei Stunden für das Fehlen der Hemmwirkung verantwortlich ist. Anschließend wurde der Test auf 24 bzw. wegen der Handhabung auf 20 Stunden verlängert. Dabei wurde eine bestimmte Menge an Nährmedium in die Testansätze zugegeben, um die Bedingungen für die Testbakterien entsprechend anzupassen.

In der folgenden Tabelle 87 sind mit Hilfe einer computerunterstützten Probit-Analyse die errechneten EC_{50} -Werte zusammengestellt. In Anbetracht der Streuung, die bei den Ergebnissen zu beobachten war, wurde das Ergebnis gemäß der Norm nur als Größenordnung angegeben. Die im Respirationshemmtest ermittelten Ergebnisse dürfen nur als Richtwerte angesehen werden, da Belebtschlamm nicht standardisierbar ist und sich stets in der Zusammensetzung und der Konzentration an Mikroorganismen unterscheidet.

Es ist generell die Frage zu stellen, ob Kurzzeittests von wenigen Minuten oder Stunden für die Prüfung von Antibiotika geeignet sind, da ihre Wirkung meist erst verzögert eintritt. Dies gilt insbesondere für Untersuchungen bei denen Mischpopulationen eingesetzt werden, da die unterschiedlichen Organismen bezüglich ihrer Empfindlichkeit und Generationszeit stark variieren. Um dennoch einen annähernd repräsentativen Querschnitt zu erhalten, ist eine Verlängerung der Kontaktzeit sinnvoll.

Tab. 87: Effektkonzentrationen von Antibiotika im Respirationshemmtest

Substanz	EC ₅₀ [mg/l]			
	0,5 h	3 h	20 h	24 h
Amoxicillin	>100	>100	>100	>100
Benzylpenicillin	>100		>100	
Ceftriaxon	>100		>100	
Cefuroxim	>100		>100	
Chlortetracyclin	>100		10-100	10-100
Clarithromycin	>100	>100	>100	10-100
Clindamycin	>100		>100	
Erythromycin	>100		10-100	
Gentamycin	>100		10-100	
Imipenem	>100	>100		1-10
Metronidazol	>100		>100	
Monensin	>100		>100	
Nystatin	>100		>100	
Ofloxacin	>100		1-10	1-10
Sulfamethoxazol	>100		>100	>100
Tetracyclin	>100	>100	1-10	
Trimethoprim	>100		>100	
Vancomycin	>100		>100	
AB-Mix	>100		1-10	

Das Risiko, die Wirkung von Antibiotika in Kurzeittests zu unterschätzen wurde von Froehner et al. (2000) dargestellt. Die Toxizität verschiedener Antibiotika gegenüber *Vibrio fischeri* erwies sich im kurzzeitigen Biolumineszenztest (30 Minuten) als gering bzw. nicht vorhanden, während sich bei einer verlängerten Testdauer (24 Stunden) deutliche Effekte zeigten. Daraus leiten die Autoren sehr starke Einschränkungen für Kurzeittests ab, wenn es darum geht, die aquatische Toxizität bestimmter Substanzen zu prüfen. Auch Backhaus et al. (1997) fanden heraus, dass die Toxizität von Antibiotika gegenüber *Vibrio fischeri* im Biolumineszenztest nur bei einer verlängerten Testdauer von 24 Stunden sichtbar wird. Thomulka und McGee (1993) wiesen im Vergleich zweier Biolumineszenztests mit *Vibrio harveyi* bei einer Testdauer von einer halben Stunde bei allen sechs untersuchten Antibiotika keine Hemmwirkung nach, wohingegen sich bei fünf Antibiotika nach fünf Stunden Effekte zeigten. Hier ist

jedoch zu bemerken, dass die Testbedingungen nicht identisch waren, weshalb die Ergebnisse nicht zwangsläufig aus den Unterschieden in der Testdauer herrühren müssen. Auch Tomlinson et al. (1966) weisen auf die Bedeutung der Zeit in Relation zu den Effekten hin. Sie untersuchten die Hemmwirkung von Streptomycin auf die Nitrifikation im Belebtschlamm. Effekte traten vor allem bei längerer Testzeit auf.

Aber auch im Zusammenhang mit dem Respirationshemmtest wurde auf die Problematik der kurzen Testdauer hingewiesen (Talinli und Tokta 1994). Zwar untersuchten die Autoren keine Antibiotika, sondern andere chemische Stressoren, dennoch bestätigen die Ergebnisse die Vermutung bezüglich der eingeschränkten Aussagekraft des Tests bei Substanzen mit verzögerter Wirkung. Die EC_{50} -Werte nach drei Stunden lagen bei dieser Studie teilweise deutlich über denen, die nach 18 Stunden ermittelt wurden.

Zwar handelt es sich bei den genannten Beispielen jeweils um unterschiedliche Tests mit verschiedenen Endpunkten und Bakterien bzw. Bakterienpopulationen, weshalb die Ergebnisse dieser Beobachtungen nicht zwangsläufig auf andere Tests zu übertragen sind. Dennoch scheint es sich eher um ein generelles Problem zu handeln. Dass Antibiotika eine verzögerte Toxizität gegenüber Bakterien besitzen, bestätigen auch die Ergebnisse aus den durchgeführten verlängerten Respirationshemmtests (s. Abb 63).

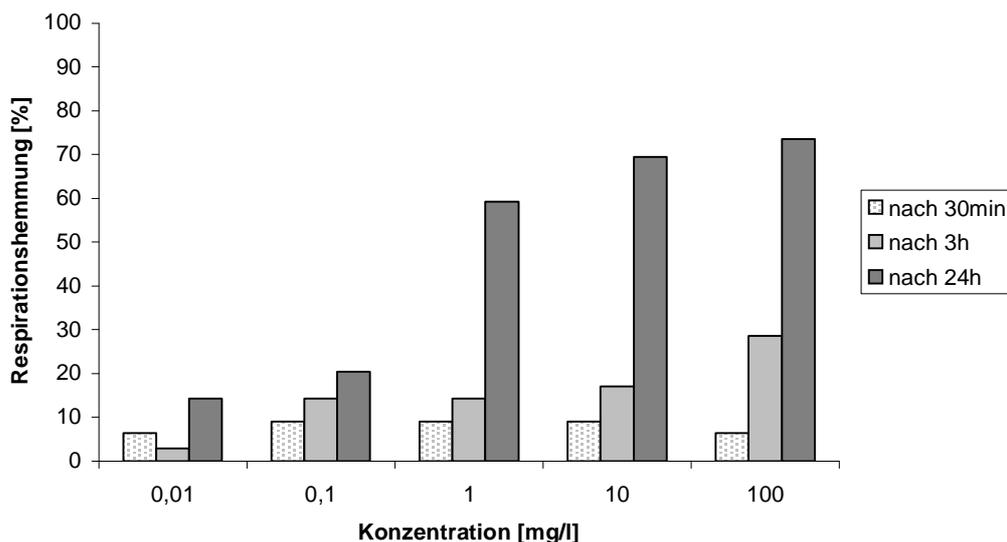


Abb. 63: Prozentuale Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Belebtschlamm durch Imipenem

Diese Problematik trifft in ganz besonderem Maße auf Antibiotika zu, die nur bakteriostatisch wirken, d. h. das Wachstum der Zellen hemmen, diese aber nicht abtöten. Die Generationszeit nur einiger weniger Bakterien liegt im Bereich von 20 Minuten oder darunter, viele Bakterien haben jedoch wesentlich längere Generationszeiten von Stunden oder gar Tagen, Effekte wären nach 30 Minuten demnach noch nicht zu sehen. Auch eine Testdauer von 3 Stunden birgt die Gefahr, dass nur ein Teil der Belebtschlammzönose erfasst wird. Um die tatsächlichen Wirkungen von Antibiotika zu bestimmen, sollte die Testdauer zumindest einen Zellzyklus der Bakterienzellen umfassen. Ansonsten können die Effekte von Substanzen, die auf der Beeinflussung biosynthetischer Prozesse beruhen, welche das Wachstum der Zellen beeinflussen, stark unterschätzt werden.

Bei der Untersuchung von Antibiotika traten Schwierigkeiten auf, z. B. keine 50%-Effekte oder Schwankungen in der Hemmung. Oft mussten die Tests wiederholt werden, weil die Validitätskriterien (zwei Kontrollansätze dürfen maximal 15% voneinander abweichen und die EC_{50} für Referenzsubstanz sollte zwischen 5 und 30 mg/l liegen) beim ersten Versuch nicht eingehalten wurden. Die Empfindlichkeit (EC_{50}) des eingesetzten Belebtschlamm gegenüber 3,5-Dichlorphenol (Referenzsubstanz) lag im unteren Bereich des Validitätskriteriums zwischen 5 und 15 mg/l und manchmal sogar unterhalb dieses Bereiches, weswegen wiederholte Testansätze nötig waren.

Deshalb wäre zu überlegen, inwiefern das hier beschriebene Verfahren zur Beurteilung von Antibiotika geeignet ist. Die Probleme bei der Durchführung lassen sich auf die schwierige Matrix Belebtschlamm zurückführen. Allerdings wird durch das Arbeiten mit Belebtschlamm eine Extrapolation auf die natürliche Situation ermöglicht. Der Respirationshemmtest darf aber keinesfalls als generell ungeeignet für die chemische Substanzen angesehen werden. Es gibt eine Reihe von Substanzen, die akut wirken, wie z. B. 3,5-Dichlorphenol, welches (als Referenzsubstanz) immer eine deutliche Hemmwirkung zeigt. Nur für Stoffe, deren Wirkung aufgrund des Wirkmechanismus erst verzögert eintritt, ist dieser Test ungeeignet, weil die Effekte zu diesem Zeitpunkt noch nicht aufgetreten sind und dadurch die Toxizität unterschätzt werden kann. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit konnte auch mit den antimikrobiellen Prüfsubstanzen eine sichtliche Veränderung der Empfindlichkeit erzielt werden. Allerdings konnten die Schwankungen durch Verlängerung der Expositionszeit nicht vollständig ausgeschaltet werden. Aus diesem Grund sollte die Reproduzierbarkeit des Tests genauer untersucht werden und eine Testvorschrift mit verlän-

gerter Inkubationszeit entwickelt werden. Vor allem bei Mischpopulationen, die bezüglich der Generationszeiten der unterschiedlichen Spezies sehr inhomogen sind, sollte die Inkubationszeit ausreichend lang sein, um einen zumindest ansatzweise repräsentativen Querschnitt zu bekommen. Gerade weil in der Realität die Exposition der Antibiotika auf die Belebtschlammzönose sehr viel länger als 30 Minuten dauert, wäre ein solcher Test sinnvoll.

Neben dem zeitlichen Aspekt ist in einigen Fällen aber auch eine Inaktivierung zumindest eines Teiles der Testsubstanz in Betracht zu ziehen, z. B. durch Empfindlichkeit der Substanz gegenüber Licht, Adsorption an Schlammpartikel oder Komplexbildung mit Ionen. So ist Metronidazol beispielsweise instabil in Gegenwart von Licht (Faktendatenbank GSBL). Die Lichtempfindlichkeit dieser Substanz wurde im Rahmen des Projekts ebenfalls im Licht- und Temperaturempfindlichkeitstest sowie von DVGW-Technologiezentrum Wasser nachgewiesen. Von einer Adsorption des Chinolons Ciprofloxacin an Belebtschlamm wurde berichtet (Hertle 1999), weshalb aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit dies auch für Ofloxacin denkbar ist. In der Literatur wurde des Weiteren von einer Komplexbildung von Tetracyclinen mit Ionen berichtet (Lunestad und Goksøyr 1990), was bei diesen Wirkstoffen für die fehlende Hemmwirkung verantwortlich sein könnte.

Bemerkenswert ist, dass der Belebtschlamm, der aus der Kläranlage in Wyhl entnommen wurde, gegenüber chemischen Stressoren recht empfindlich ist. Die EC_{50} -Werte von 3,5-Dichlorphenol liegen bei den Tests im Bereich zwischen 5 und 15 mg/l und demnach im unteren Bereich dessen, was die Norm vorgibt (5-30 mg/l). Dies könnte daran liegen, dass in die Kläranlage Wyhl keine Krankenhäuser oder Altenheime ihr Abwasser einleiten und auch keine Industriebetriebe angeschlossen sind. Somit dürfte nur eine sehr geringe Adaptation an chemische Stressoren vorliegen. Da der Belebtschlamm hinreichend empfindlich ist, sollte auch bei den Antibiotika bei angemessenen Testbedingungen mit Effekten gerechnet werden.

Im Allgemeinen schwankten die Respirationsraten der Testansätze bis zu 20% um die Blindwerte, dies dürfte aber im Bereich der üblichen Schwankungsbreite liegen. Selbst die beiden Blindwerte dürfen nach der Norm um bis zu 15% voneinander abweichen. Beim Ansatz von biologischen Tests mit Mischkulturen wird im Allgemeinen mit Schwankungen und Ungenauigkeiten von bis zu 20% gerechnet (Nusch 1995). Deshalb sind laut Norm die EC_{50} -Werte auch nicht genau, sondern nur größenordnungsmäßig anzugeben.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Tests (s. Tab. 87) im Einzelnen diskutiert: Die zu den β -Lactamen zählenden Penicilline **Amoxicillin** und **Benzylpenicillin** hemmen die bakterielle Zellwandsynthese und wirken bakterizid auf proliferierende Keime. Da sich zumindest ein Teil der Belebtschlammpopulation im Testsystem in der Wachstumsphase befindet, sollte der Wirkmechanismus greifen. Die Penicilline sind vor allem im grampositiven Bereich aktiv und erfassen damit nur einen Teil der Belebtschlammpopulation. Sie verhindern eine Quervernetzung der Bakterienzellwand, was zu einer zunehmenden Instabilität und schließlich zur Lyse der Zelle führt. Die Tatsache, dass nach Verlängerung des Testes selbst bei der höchsten eingesetzten Antibiotikumskonzentration nur eine geringe Hemmwirkung ($EC_{50} > 100$ mg/l) auf die Bakterienpopulation sichtbar war, lässt darauf schließen, dass nur eine kleine Breite der Belebtschlammpopulation, die sich gerade im Wachstum befindet, gehemmt wird. Bakterien bei denen die Prüfsubstanzen keine Wirkung zeigen, können sich ungehindert weiterentwickeln und gegenüber den empfindlichen Bakterien selektieren.

Auch die Cephalosporine **Ceftriaxon** und **Cefuroxim** zählen zu den β -Lactamen. Sie haben aber ein breiteres Wirkungsspektrum als die Penicilline. Die Wirkungsweise ist identisch mit der von Penicillinen, auch sie wirken bakterizid durch eine Hemmung der Zellwandsynthese. Wie bei den Penicillinen dürfte die geringe Hemmwirkung auf die Selektivität der Cephalosporine zurückzuführen sein, wodurch unempfindliche Keime einen Selektionsvorteil erhalten können.

Ebenfalls zu den β -Lactamen zählen die Carbapeneme. **Imipenem** hemmt die Zellwandsynthese und wirkt bereits in geringen Konzentrationen stark bakterizid. Es hat ein sehr breites Wirkungsspektrum. Dies spiegelt sich auch in dem vergleichsweise niedrigen EC_{50} -Wert von 1-10 mg/l wieder.

Das Glycopeptid-Antibiotikum **Vancomycin** hemmt, wie die β -Lactam-Antibiotika, den Aufbau der Bakterienzellwand und wirkt bakterizid. Die Vernetzung der Bakterienzellwand wird gehemmt, wodurch die Zellwand mit der Zeit instabiler wird, bis die Zelle schließlich lysiert. Die Testzeit nach der Norm (halbe bzw. drei Stunden) wäre eindeutig zu kurz, damit dieser Mechanismus zum Tragen kommt. Da Vancomycin ausschließlich grampositive Erreger erfasst, dürfte eine Hemmwirkung auch bei längerer Kontaktzeit nur bei einem Teil der Belebtschlammpopulation auftreten, was sich in höheren EC_x -Werten geäußert hat.

Die Sulfonamide **Sulfamethoxazol** und **Trimethoprim** weisen ein breites Wirkungsspektrum auf, das sowohl grampositive als auch gramnegative Keime erfasst. Allerdings ist die Wirkung bakteriostatischer Natur, d. h. die Zellen werden nicht abgetötet sondern nur in ihrem Wachstum gehemmt. Da die Generationszeit bei vielen Bakterien im Bereich von mehreren Stunden liegt, zeigen sich folgerichtig nach einer halben Stunde Kontaktzeit keine Effekte. Zudem ist der zeitliche Aspekt bei Sulfonamiden auch deshalb nicht zu vernachlässigen, weil diese Substanzen die Synthese der Folsäure hemmen, von der aber häufig noch Reserven in den Zellen oder im Medium vorhanden sind, weshalb die Effekte verzögert eintreten (Halling-Sørensen 2000). Dies könnte auch die Ursache sein, weshalb nach Verlängerung des Testes keine Effekte auftraten.

Die Tetracycline **Chlortetracyclin** und **Tetracyclin** sind Breitband-Antibiotika mit bakteriostatischer Wirkung, welche die Proteinsynthese in der Bakterienzelle hemmen. Durch die kurze Kontaktzeit von 30 Minuten ist bei bakteriostatischen Antibiotika im Respirationshemmtest nicht mit Effekten zu rechnen. Nach 20 Stunden wurden bei beiden Antibiotika deutliche Effekte beobachtet. Gegen Tetracycline haben auch beide Keime im Wachstumshemmtest empfindlich reagiert. Beide Antibiotika konnten bereits in beträchtlichen Konzentrationen im Boden nachgewiesen werden (Hamscher et al. 2002). Zur Beurteilung des Risikopotentials durch Tetracycline sollte zusätzlich eine potentielle abiotische Inaktivierung der Substanzen berücksichtigt werden (s. Kapitel 4.3.1.2 und 4.3.6).

Das zu den Lincosamiden zählende **Clindamycin** hemmt die Proteinsynthese empfindlicher Bakterien und wirkt in Abhängigkeit von Konzentration und Empfindlichkeit der Bakterien bakteriostatisch oder bakterizid. Auch hier spielt, wie bei den Sulfonamiden und Tetracyclinen der zeitliche Aspekt eine Rolle, da von den Proteinen noch Reserven in den Zellen vorhanden sein können, weshalb Effekte verzögert zu erwarten sind.

Die beiden Antibiotika **Clarithromycin** und **Erythromycin** gehören zur Gruppe der Makrolide und wirken bakteriostatisch durch die Hemmung der ribosomalen bakteriellen Proteinsynthese. Dieser Mechanismus kommt erst nach längerer Inkubationszeit zum Tragen, wie dies am Beispiel der anderen Antibiotika mit dem gleichen Wirkmechanismus bereits erläutert wurde. Bei Erythromycin trat nach 20 h eine Hemmwirkung von 50% im Konzentrationsbereich von 10-100 mg/l auf.

Gentamycin gehört zur Gruppe der Aminoglykoside, die auf irreversible Weise die Proteinsynthese hemmen. Gentamycin ist bekannt für seine schnelle bakterizide Wirkung, die auch in der Ruhephase der Zellen eintritt. Nach 20 Stunden der Inkubation wurde ein EC_{50} -Bereich von 10-100 mg/l errechnet. Im Hinblick einer angenommenen Kläranlagenzulaufkonzentration von 0,058 µg/l sowie die schnelle Wirkungsweise des Antibiotikums kann eine Beeinträchtigung der biologischen Reinigungsleistung in Kläranlagen nicht ausgeschlossen werden. Auffällig ist außerdem die hohe Empfindlichkeit der im Wachstumshemmtest untersuchten Keime gegenüber Gentamycin.

Das zu den Nitroimidazolen zählende **Metronidazol** hemmt die Nucleinsäuresynthese anaerober Bakterien und hat auf diese eine starke bakterizide Wirkung. Die Aktivität nimmt unter Lichteinfluss ab. Da Metronidazol nur gegen Anaerobier wirkt, zeigte sich im Respirationshemmtest, der nur die aeroben Bakterien erfasst, erwartungsgemäß keine Hemmwirkung.

Ofloxacin gehört zur Gruppe der Fluorchinolone. Es interagiert mit der bakteriellen DNA-Gyrase und wirkt bakterizid. Ofloxacin hat ein breites Wirkungsspektrum. Der verlängerte Respirationshemmtest zeigte erwartungsgemäß Effekte des Antibiotikums auf die Bakterienatmung, genauso wie auch im Wachstumshemmtest beide Keime empfindlich gegenüber diesem Antibiotikum reagiert haben.

Monensin ist ein Veterinärantibiotikum und wirkt ausschließlich gegen grampositive Keime. Es sind für diese Substanz kaum weiterführende Informationen vorhanden. Es wurden eher kleine Effekte erwartet, da gramnegative Bakterien dadurch selektieren können. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen diese Vermutung.

Nystatin ist ein Antimykotikum, d. h. es wirkt gegen Pilze, und gehört zur Gruppe der Polyene. Es verändert die Permeabilität der Zytoplasmamembran von Pilzen, gegen Bakterien ist es unwirksam. Da Pilze im Vergleich zu Bakterien eine eher untergeordnete Rolle im Belebtschlamm spielen, zeigt Nystatin, erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Respirationsrate des Belebtschlammes.

In dem **Antibiotika-Mix** Ansatz wurden die Anteile der Antibiotika anhand der Bilanzierung für die BRD 1998 (Kümmerer und Henninger 2003) prozentuell berechnet, wodurch eine realistische Antibiotikazusammensetzung im Zulauf von Kläranlagen simuliert werden sollte. Obwohl die Antibiotika, bei denen Effekte beobachtet wurden, nur kleine jährliche Verbrauchsraten aufweisen und entsprechend nur in kleinen Mengen in dem Antibiotika-Mix Ansatz vertreten waren, wurden in diesem Test die

größten Hemmeffekte beobachtet, wie es bei den Einzelstoffen nur bei Ofloxacin und Tetracyclin der Fall war. Da die Antibiotika in Gemischen zu den Kläranlagen eingeleitet werden, sollte man von einer Beeinflussung der Belebtschlammpopulation ausgehen.

Es ist wichtig noch anzumerken, dass bei allen Antibiotika nach Verlängerung des Testes auf 20 Stunden im EC_{10} -Bereich Effekte beobachtet wurden. Da aber in diesem Test sehr große Schwankungen beobachtet wurden und die in dem Test beobachteten Hemmungen nur ein schmales Spektrum besaßen (z. B. Hemmung von 20-50%), wurden die EC_{10} -Werte oft mit der Probit-Analyse nur simuliert. Zusätzlich berechnet die Probit-Analyse im EC_{10} - und EC_{90} -Bereich immer fehlerhafte Ergebnisse (Unterschätzung bzw. Überschätzung der Hemmung, s. Kapitel 5.4.2), weshalb diese Effekte in der Tabelle 32 absichtlich nicht präsentiert wurden. Bei vielen Stoffen wurden sogar nach 3 Stunden Effektkonzentrationen von 10% ermittelt.

Die beobachtete 50%ige Hemmung der Antibiotika auf die Bakterienrespiration stimmt sehr gut mit der Wirksamkeit der gleichen Antibiotika auf das Wachstum von beiden Keimen im Wachstumshemmtest überein.

Der Kurzzeit-Respirationshemmtest hat sich für Antibiotika als ungeeignet erwiesen. Nach einer halbstündigen bzw. dreistündigen Testzeit lassen sich keine Aussagen über die Effekte dieser Substanzen auf die Umwelt machen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei Anwendung von Akuttesten die Gefahr besteht, Effekte von Substanzen mit verzögerter Toxizität zu übersehen.

3.4.4 Nitrifikationshemmtest (DIN EN ISO 9509 : 1995)

Die Nitrifikation ist ein wichtiger Prozess in der Abwasserreinigung. Früher wurde dem Stickstoffgehalt im Ablauf von Kläranlagen keine Bedeutung zugemessen, da der BSB_5 -Ablaufwert als allgemeiner Maßstab der Reinigungsleistung betrachtet wurde. Im normalen häuslichen Abwasser sind aber ca. 30-50 mg/l Stickstoff in reduzierter Form, d. h. als Ammonium, Harnstoff oder in anderen organischen Verbindungen vorhanden. Bei der mikrobiologischen Umsetzung dieser Stoffe können zahlreiche Störungen und Schäden, wie z. B. Beeinträchtigung der Reinigungsleistung in Kläranlagen durch pH-Absenkung oder Eutrophierung in Gewässern, auftreten. Bei der Abwasserbehandlung werden daher heutzutage eine weitgehende Oxidation der reduzierten Stickstoffverbindungen sowie eine integrierte Denitrifikation zur Eliminierung des Stickstoffs gesetzlich gefordert (Mudrack und Kunst 1994). Der Nitrifikati-

onshemmtest mit Belebtschlamm nach EN ISO 9509 : 1995 untersucht die potentielle Auswirkung von Prüfsubstanzen auf die Nitrifikation. Unter aeroben Bedingungen wird Ammonium über Nitrit zu Nitrat oxidiert. Verantwortlich für die Nitrifikation ist die Bakteriengruppe der Nitrifikanten. Diese lässt sich einteilen in die ammoniumoxidierenden *Nitrosomonas* und die nitritoxidierenden *Nitrobacter*. Nitrifikanten sind gramnegative, obligat aerobe respiratorische Organismen, die im Boden und in wässriger Umgebung leben (Singleton 1995). Sie sind chemolithotroph, d. h. sie benötigen keine organischen Stoffe zum Wachstum. Ihr Energiegewinn durch Oxidation des anorganischen Ammoniums ist sehr gering gegenüber dem heterotropher Organismen. Nitrifikanten besitzen daher sehr lange Generationszeiten, die zudem stark temperaturabhängig sind (bis ca. 83 h bei 10°C). Sie gelten als besonders empfindlich gegenüber chemischen Stressoren. Da die Anzahl der Organismengruppen gering ist, kann ein Schadstoffeintrag zum kompletten Verlust ihrer Funktion in der Abwasserreinigung führen (Frühling et al. 2000). Eine Störung der Nitrifikation kann den Abbau des Ammoniums verhindern, wodurch es zu einem Anstieg der Ammoniumkonzentration kommt.

Um die Effekte verschiedener Antibiotika auf nitrifizierende Bakterien und damit die möglichen negativen Wirkungen auf die Abwasserreinigung zu ermitteln, wurde für einige Stoffe der Nitrifikationshemmtest nach EN ISO 9509 : 1995 durchgeführt. Alle Antibiotika wurden in Konzentrationen von 5 bis 1000 mg/l getestet. Bei keinem der Tests konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der eingesetzten Antibiotikakonzentration und der Hemmwirkung festgestellt werden, es traten sehr große Schwankungen auf. Zwar ist teilweise ein Trend erkennbar, ob die Substanz auf die Nitrifikation eher hemmend oder fördernd wirkt (Tab. 88). Selbst die qualitativen Aussagen sind nicht in allen Fällen plausibel, was im Folgenden ausführlich diskutiert wird.

Der Test war jeweils valide wie die mitgeführten Kontrollen zeigten. Bei den meisten Versuchen fand sich mindestens ein Ausreißer, der dem Trend zuwiderlief. Auf Grund der großen Schwankungen in den Messergebnissen lassen sich aus keinem der durchgeführten Tests verlässliche EC_{50} -Werte ableiten. Die Ergebnisse wurden einer Probit-Analyse unterzogen, sofern dies möglich war, d. h. sofern zumindest drei Hemmwerte positiv waren. Die ermittelten $EC_{10,50,90}$ -Werte erwiesen sich als sehr unplausibel, wobei vor allem die EC_{90} -Werte fernab jeglicher Realität lagen (Hemmkonzentrationen im Bereich von 1 kg/l). Die Testergebnisse sind demnach nicht ver-

wendbar für eine Risikoabschätzung, obwohl der Test bezüglich der von der Norm geforderten Kontrollwerte valide war. Die spezifischen Nitrifikationsraten lagen, nachdem der Belebtschlamm nach anfänglichen Problemen von einer anderen Kläranlage bezogen wurde und die Inkubationszeit auf drei Stunden verkürzt wurde, immer im Bereich zwischen 2 und 6,5 mg N/(g*h). Im Referenzansatz zeigte sich eine deutliche Hemmung, in den Blindansätzen wurde Ammonium zu Nitrit und Nitrat umgewandelt.

Für die nachfolgend aufgeführten Antibiotika wurde der dreistündige Nitrifikationshemmtest durchgeführt. Teilweise lassen sich die ermittelten Ergebnisse bzw. Trends bei den einzelnen Substanzen erklären, teilweise laufen sie den zu erwartenden Resultaten aber zuwider.

Tab. 88: Wirkung der Antibiotika auf die Nitrifikation nach 3 h der Inkubation

Antibiotikum	Trend 3 h Inkubation	Trend:
Amoxicillin	↑	↑ = fördert die Nitrifikation
Benzylpenicillin	↑	↓ = hemmt die Nitrifikation
Cefuroxim	→	→ = kein Trend erkennbar
Metronidazol	↓	
Monensin	↓	
Sulfamethoxazol	↑	
Tetracyclin	↓	
Trimethoprim	↓	
Vancomycin	↓	

Amoxicillin und **Benzylpenicillin**, die beide bakterizid wirken, scheinen die Nitrifikation eher zu fördern, nur die höchste Konzentration von 1 g/l bei Amoxicillin zeigte eine geringe Hemmwirkung. Die Förderung der Nitrifikation könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Stoffe vor allem gegen grampositive Keime wirken und damit die Konkurrenzverhältnisse zu Gunsten der gramnegativen Nitrifikanten verschieben könnten. Da beide Verbindungen in ihrer Molekülstruktur Aminogruppen enthalten, ist zudem eine Verfälschung durch die Auswertung mittels Fotometrie nicht ausgeschlossen.

Gomez et al. (1996) untersuchten die Wirkung von Amoxicillin auf die Nitrifikation in einem Nitrifikationshemmtest, der nicht der DIN entspricht. Er fand keine Hemmung auf die nitrifizierenden Bakterien.

Bei dem bakterizid wirkenden **Cefuroxim** lässt sich kein Trend feststellen. Die Werte der verschiedenen Antibiotika-Ansätze schwankten um den Blindwert. Die Hemmwirkung von Cefuroxim auf Nitrifikanten dürfte vergleichsweise gering sein, da diese Substanz vor allem gegen grampositive Keime wirkt.

Nicht erklärbar ist der Trend bei **Metronidazol**, welches in hohen Konzentrationen leichte Hemmwirkungen zeigte. Dieses Antibiotikum, das nur gegen Anaerobier wirkt, dürfte die aeroben Nitrifikanten nicht hemmen, wenngleich auch die Substanz stark bakterizid und mutagen wirkt und im Kurzzeit-Test erfassbar wäre.

Gleiches gilt für **Monensin**. Auch in diesem Versuch wurde in hohen Konzentrationen eine tendenzielle Hemmwirkung festgestellt, obwohl das im Widerspruch zum Wirkungsspektrum steht. Monensin, das ausschließlich gegen grampositive Keime wirkt, dürfte auf die nitrifizierenden Bakterien keine Hemmwirkung ausüben. Zudem erwies sich diese Substanz als extrem schlecht wasserlöslich, weshalb die Wirkung auf Bakterien in der wässrigen Testmatrix ohnehin eingeschränkt sein dürfte. Somit bleibt die Ursache für die Hemmwirkung ungeklärt.

Sulfamethoxazol förderte die Nitrifikation tendenziell. Das Antibiotikum weist ein breites Wirkungsspektrum auf, das sowohl grampositive als auch gramnegative Keime umfasst. Allerdings ist die Wirkung bakteriostatischer Natur, weshalb die Nitrifikanten mit ihrer relativ langen Generationszeit von mehreren Stunden in diesem Akut-Test (Testdauer 3 h) nicht erfasst werden dürften. Da andere Bakterien teilweise weitaus kürzere Generationszeiten haben, zum Teil im Bereich von 20 Minuten, ist es denkbar, dass die Konkurrenzverhältnisse zu Gunsten der Nitrifikanten verschoben wurden, was letztlich zu einem verstärkten Wachstum der Nitrifikanten geführt haben könnte. Eine Hemmwirkung von Sulfamethoxazol auf nitrifizierende Bakterien im Kurzzeit-Test ist auch deshalb nicht zu erwarten, weil es die Folsäuresynthese hemmt und die Wirkung durch vorhandene Folsäure-Reserven erst verzögert nach einigen Generationen eintritt. Die Resultate stehen auch in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Halling-Sørensen (2000), der Sulfadiazin untersuchte, welches ebenfalls zur Gruppe der Sulfonamide gehört und ein ähnliches Wirkungsspektrum aufweist. Auch in dieser Untersuchung wurde eine nitrifikationsfördernde Wirkung des

Sulfonamids nachgewiesen. Akuttests zum Nachweis einer Hemmwirkung auf Nitrifikanten sind demnach für diese Substanzen nicht geeignet.

Tetracyclin wirkte hemmend auf die Nitrifikanten. Da die Substanz nur das Wachstum der Bakterien hemmt, sie aber nicht abtötet, dürften jedoch kaum Effekte auf die Nitrifikanten zu sehen sein.

Trimethoprim zeigte eine relativ deutliche Hemmwirkung, was zwar im Einklang mit dessen Wirkungsspektrum steht, welches die meisten Aerobier erfasst, aber im Widerspruch zur Wirkungsweise des Antibiotikums, das bakteriostatisch wirkt. Zudem hemmt Trimethoprim die Folsäuresynthese, die Wirkung tritt verzögert ein und dürfte daher in einem Akut-Test nicht erfasst werden.

Nicht erklärbar sind die Ergebnisse des Tests mit **Vancomycin**. Obwohl das bakterizid wirkende Antibiotikum nicht gegen gramnegative Keime wirkt, waren die Nitrifikationsraten in allen Ansätzen mit Antibiotikum geringer als im Blindansatz. Da die spezifische Nitrifikationsrate bei 8,57 lag und damit über dem von der DIN-Norm geforderten Wert, ist der Test nicht valide. Bei allen in der ersten Runde durchgeführten Tests wurde deshalb die Inkubationszeit von 4 auf 3 Stunden verkürzt.

Da dennoch keine verlässlichen Ergebnisse ermittelt werden konnten, scheint der Nitrifikationshemmtest nach EN ISO 9509 : 1995 für Antibiotika nicht geeignet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Resultaten von Halling-Sørensen (2000), der mit dem gleichen Test ebenfalls keine quantitativen Aussagen bezüglich der Wirkung von Antibiotika auf die Nitrifikation treffen konnte.

Es wurde untersucht, ob sich die unstimmgigen Ergebnisse u.a. auf die fotometrische Bestimmung von Nitrat, Nitrit und Ammonium zurückführen lassen. Die Bestimmung der Stickstoffverbindungen wurde, in Abweichung von der DIN-Norm, mit einem Schnelltest von Merck (Spectroquant[®]) durchgeführt. Dem Nachweis der Stickstoffverbindungen, sowohl mittels Spectroquant[®] als auch nach DIN, liegen Farbreaktionen zu Grunde, die fotometrisch ausgewertet werden und quantitative Ergebnisse liefern.

Das im Testansatz vorliegende Nitrat reagiert in konzentrierter Schwefelsäure mit Nitrospectral zu einer tiefrot gefärbten Nitroverbindung. Da die meisten untersuchten Antibiotika mindestens eine Aminogruppe oder eine aromatische Gruppe enthalten, welche ebenfalls mit Nitrospectral reagieren könnten, sind Verfälschungen der Ergebnisse nicht auszuschließen. Ähnliches gilt für die Bestimmung des Nitrits. Nitrit reagiert mit Sulfanilsäure zu 4-Diazobenzolsäure, welches anschließend mit N-

[Naphthyl-(1)]-ethylen-diammoniumdichlorid zu einem violetten Farbstoff kondensiert. Bei dieser Bestimmung sind Verfälschungen durch Antibiotika ebenfalls nicht auszuschließen. Messfehler sind auch bei der Bestimmung von Ammonium denkbar. Nach der Alkalisierung reagiert Ammoniak mit Hypochlorid zu Monochloramin, welches mit Thymol ein blaues Indophenol bildet. Die Reaktion kann auch ablaufen, wenn die Testsubstanz eine aromatische Aminogruppe enthält.

Der Einfluss von Antibiotika auf die Farbreaktion wurde in einem Test untersucht: Zwei Antibiotikallösungen in unterschiedlicher Konzentration, sowie eine Standardlösung mit Nitrat, Nitrit bzw. Ammonium und eine Mischung aus beiden Lösungen (Antibiotikum und Stickstoffverbindung) wurden jeweils mittels Spectroquant[®] vorbereitet und anschließend fotometrisch gemessen. Für den Test wurden folgende Antibiotika ausgewählt: Cefuroxim, das auf Grund seiner Struktur eine Beeinflussung der Farbreaktion erwarten lässt, und Monensin, das gegenüber Verfälschungen eher unempfindlich sein sollte.

Es zeigte sich, dass bei der Mischlösung (Stickstoffverbindung + Antibiotikum) die Messwerte von Nitrat und Nitrit erhöht sind. Beim Ammonium hingegen tritt der umgekehrte Fall ein. Die Messwerte der Antibiotika-Ammonium-Mischung liegen unter denen der reinen Ammonium-Lösung. Bemerkenswert ist zudem, dass die erhöhten Extinktionswerte bei der Mischlösung deutlich höhere Werte für die reine Antibiotikumslösung erwarten lassen würden als die tatsächlich gemessenen. Aus den Ergebnissen lässt sich folgern, dass die fotometrische Bestimmung von Nitrat, Nitrit und Ammonium problematisch ist, sofern Antibiotika in der Lösung vorhanden sind. Da auch die Auswertung nach dem DIN-Verfahren fotometrisch erfolgt und Messfehler somit nicht ausgeschlossen sind, scheint die Norm für die Bestimmung der Nitrifikationshemmung durch Antibiotika in Belebtschlamm problematisch zu sein.

Da Messfehler somit nicht ausgeschlossen werden können, erfolgte die weitere Messung der Stickstoffkonzentrationen mittels Ionenchromatografie. Bei der Ionenchromatografie werden die Stickstoffionen aufgrund unterschiedlich großer Affinität zum Tauschermaterial mit den Ionen einer mit Austauschharzen beladenen Säule ausgetauscht. Dadurch wird gewährleistet, dass bei der Konzentrationsbestimmung ausschließlich die als Nitrat und Nitrit vorliegenden Ionen erfasst werden.

Ein weiteres Problem des Tests nach DIN EN ISO muss in der sehr kurzen Inkubationszeit gesehen werden. Da die Nitrifikanten eine vergleichsweise lange Generationszeit von mehreren Stunden haben, scheint ein Akut-Test mit einer Inkubationszeit

von wenigen Stunden nur bedingt geeignet. Vor allem die Effekte der Antibiotika, die nur bakteriostatisch wirken, d. h. nur das Wachstum der Zellen hemmen, diese aber nicht abtöten, könnten in einem Akut-Test unterschätzt werden. Dies wurde von Tomlinson et al. (1966) eindrucksvoll nachgewiesen. Er fand heraus, dass Effekte auf die Nitrifikation in Langzeittests (5 Tage) schon in Konzentrationen auftraten, die um eine Größenordnung unter den Effektkonzentrationen der Kurzzeittests lagen, und unterstrich damit die Gefahr, durch die Ergebnisse der Kurzzeittests die Effekte von Substanzen zu unterschätzen. Dies dürfte insbesondere auch deshalb von Bedeutung sein, weil in der Umwelt nicht die akuten Expositionen eine Rolle spielen sondern vor allem die chronischen.

Auch aus dem Repirationshemmtest ist bekannt, dass sich Kurzzeittests als ungeeignet für die Untersuchung von Antibiotika erweisen (s.o.). Aus diesem Grund wurde der Nitrifikationshemmtest auf 24 h verlängert und mit weiteren vier Substanzen durchgeführt. Durch die verlängerte Inkubationszeit soll berücksichtigt werden, dass Hemmeffekte aufgrund der spezifischen Wirkung von Antibiotika meist erst in der Folgegeneration auftreten. Gemäß der Norm soll der Belebtschlamm innerhalb von 24 h verwendet werden, weshalb der Test nur auf 24 h verlängert wurde (s. Tab. 89).

Tab. 89: Wirkung der Antibiotika auf die Nitrifikation nach 4 bzw. 24 h der Inkubation

Antibiotikum	Trend 4 h Inkubation	Trend 24 h Inkubation
Cefuroxim	↑	→
Chlortetracyclin	↑	↑
Gentamycin	↓	↓
Trimethoprim	↓	↑

Obgleich im Nitrifikationshemmtest mit 4 h Inkubationsdauer die spezifische Nitrifikationsrate oberhalb des geforderten Bereichs lag, ist der Test bezüglich der Gültigkeit als valide zu betrachten. Anhand des qualitativen Ammoniumtests konnte nach Abschluss der Bebrütungsdauer eine ausreichende Ammoniumkonzentration gemessen werden. Ferner konnte im Referenzansatz keine Zunahme an oxidierten Stickstoffverbindungen ermittelt werden. Jedoch erwiesen sich die Ergebnisse im Test mit Antibiotika häufig als unplausibel. Die Bestimmung der Stickstoffkonzentration mittels Ionenchromatografie erlaubte zwar eine bessere Korrelation zwischen Antibiotika-

Konzentration und Hemmeffekten, dennoch erscheinen die Ergebnisse trotz Verlängerung der Inkubationszeit fragwürdig. Aufgrund der unplausiblen Resultate sowie der häufig beobachteten Nitrifikationsförderung wurden keine Effektkonzentrationen bestimmt. Es wurde lediglich festgelegt, ob die Substanz eine fördernde oder hemmende Wirkung auf die Nitrifikation besitzt. Für eine Risikoabschätzung sind die Testergebnisse nicht verwendbar.

Auffällig war eine häufige Förderung der Nitrifikation in den Testansätzen. Die Belebtschlammzusammensetzung kann durch Antibiotika verändert werden. Vor allem Antibiotika, die selektiv gegen bestimmte Bakterien wirken, erfassen nicht die gesamte Belebtschlammpopulation und können somit die Biozönose verändern. Dadurch könnten unempfindlichere Bakterien einen Selektionsvorteil erhalten, was zu einer Veränderung der Schlammaktivität führen könnte (Halling-Sørensen 2000). Die Hemmung einiger Bakterien könnte sich deshalb evtl. positiv auf das Wachstum der Nitrifikanten ausgeübt haben. Die Vermutung, dass Mischpopulationen einen wesentlichen Einfluss auf die Testergebnisse haben, lässt sich durch Untersuchungen von Halling-Sørensen (2000) stützen. Dieser führte Nitrifikationshemmtests mit Belebtschlamm (EN ISO 9509 : 1995), als auch mit Reinkulturen von *Nitrosomonas europaea* mit unterschiedlichen Antibiotika durch. Die Auswertung erfolgte in beiden Fällen fotometrisch. Während bei der Verwendung von Belebtschlamm auf Grund sehr großer Vertrauensbereiche keine EC_{50} -Werte ermittelt werden konnten, führten die Versuche mit den Reinkulturen zu quantitativen Ergebnissen. Ein weiterer Hinweis auf die Unzulänglichkeit des Nitrifikationshemmtests nach DIN EN ISO ist die Tatsache, dass teils widersprüchliche Ergebnisse bei Untersuchungen mit Rein- und Mischkulturen gefunden wurden. Während beispielsweise Olaquinox im Hemmtest mit Mischpopulation (Belebtschlamm) die Nitrifikation förderte, wurde die Nitrifikationsrate beim Test mit der Reinkultur deutlich gehemmt, wie es auf Grund des Wirkungsspektrums des Stoffes zu erwarten ist.

Im Allgemeinen sind bei den biologischen Tests stärkere Abweichungen zu beobachten als beispielsweise bei rein chemischen. Bei einer Laboruntersuchung zur Hemmung der Nitrifikation durch spezielle Inhaltsstoffe industrieller und gewerblicher Abwässer stellten Wagner und Kayser (1990) zum Teil stark unterschiedliches Verhalten von Parallelproben, die z. B. Tenside oder Desinfektionsmittel enthielten, fest. Zudem wurde bei den Untersuchungen eine geringere Hemmwirkung der verschie-

denen Testsubstanzen festgestellt, wenn nitrifizierender Belebtschlamm anstatt von Reinkulturen oder angereicherten Zuchtkulturen eingesetzt wurde.

Im Nitrifikationshemmtest mit **Cefuroxim** trat bereits nach 4 h eine geringe konzentrationsabhängige Förderung der Nitrifikation ein. Nach 24 h Inkubationszeit konnten keine Effekte gemessen werden. Cefuroxim ist ein Breitbandantibiotikum das sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Keime wirkt. Die gramnegativen Nitrifikanten konnten somit erfasst werden. Der bakterizide Wirkungsmechanismus von Cefuroxim beruht auf der Hemmung der Zellwandsynthese, was zu einer Lyse der Zellen in der Folgegeneration führt. Die Förderung der Nitrifikation nach 4 h Inkubationszeit lässt sich möglicherweise auf die lange Generationszeit der Nitrifikanten zurückführen. Da die Wirkung des Antibiotikums erst in der Folgegeneration eintrat, wurden zuerst heterotrophe Keime mit kurzen Generationszeiten im Wachstum gehemmt. Die Nitrifikanten besaßen somit einen Selektionsvorteil. Da aber nach 24 h keine Hemmwirkung ersichtlich war, sollte geklärt werden, ob Cefuroxim gegenüber Nitrifikanten wirksam ist.

Bei **Chlortetracyclin** wurde nach 4 h Inkubationszeit eine konzentrationsunabhängige Förderung der Nitrifikation gemessen. Auch hier kann man von einer primären Hemmung der heterotrophen Mikroorganismen ausgehen. Allerdings erscheint es unplausibel, dass die Förderung unabhängig von der Antibiotika-Konzentration auftrat. Im 24 h Test konnte vor allem bei den Ansätzen mit 50 bzw. 100 mg/l Chlortetracyclin eine deutliche Förderung der Nitrifikation festgestellt werden. Dabei sollte die abiotische Elimination des Antibiotikums bzw. seiner Wirkung nicht außer Acht gelassen werden. Nach Hirsch et al. (1999) ist bekannt, dass die antimikrobielle Aktivität von Chlortetracyclin durch Komplexbildung mit Calcium- und Magnesiumionen sowie durch Adsorption an Schlamm herabgesetzt wird. Inwiefern diese Reduktion konzentrationsabhängig ist, bliebe zu klären. Geht man davon aus, dass die Inaktivierung durch Adsorption nur bis zur bestimmten Sättigung auftritt, könnte dies eine Erklärung für die erhöhte Förderung in den Ansätzen mit 50 mg/l und 100 mg/l sein.

Gentamycin gehört zur Gruppe der Aminoglycoside, die eine irreversible Hemmung der Proteinsynthese hervorrufen. Das Wirkungsspektrum von Gentamycin umfasst vor allem gramnegative Stäbchen. Im Test konnte nach beiden Inkubationszeiten eine Hemmung der Nitrifikation festgestellt werden. Nach 4 h nahm die Hemmung der Nitrifikation mit zunehmender Konzentration ab. Dieses Ergebnis erweist sich trotz der schnellen bakteriziden Wirkung als äußerst unplausibel. Nach 24 h konnte

jedoch eine ansteigende Hemmung mit zunehmender Konzentration festgestellt werden.

Im Test mit **Trimethoprim** stellte sich nach 4 h Inkubation eine Hemmung der Nitrifikation ein. Trimethoprim ist ein Breitbandantibiotikum mit bakteriostatischer Wirkung. Nach 24 h Inkubation waren in den Ansätzen mit niedrigen Konzentrationen keine Effekte ersichtlich. In den Ansätzen mit 50 und 100 mg/l konnte eine Förderung der Nitrifikation festgestellt werden. Bei Trimethoprim handelt es sich um ein bakteriostatisch wirksames Antibiotikum. Die Keime werden also ausschließlich in ihrem Wachstum gehemmt. Da im Testverlauf kein neues Antibiotikum zugeführt wurde, besteht die Möglichkeit, dass sich die Keime innerhalb der Inkubationszeit erholt haben und erneut wirksam wurden. Diese Annahme berücksichtigt einzig die Gruppe der Nitrifikanten. Bei der Verlängerung des Tests wurde ausschließlich ammoniumsulfathaltige Nährlösung zugegeben, die von den heterotrophen Mikroorganismen nicht zur Energiegewinnung genutzt werden kann. Daraus ergibt sich ein weiterer Grund, weshalb sich Kurzzeittests für Antibiotika als ungeeignet erweisen. Bei bakteriostatisch wirksamen Antibiotika besteht somit die Gefahr, die Toxizität der Substanz zu unterschätzen. In Anbetracht der Wirkungsweise von Trimethoprim sowie der langen Generationszeiten der Nitrifikanten, erweist sich eine Nitrifikationshemmung nach 4 h Inkubation als unplausibel.

Da auch nach der Modifikation des Testes (Testverlängerung auf 24 h und Auswertung mit Hilfe der Ionenchromatografie) keine verwertbaren Ergebnisse erzielt wurden, obwohl alle Validitätskriterien des Nitrifikationshemmtests eingehalten wurden, wurde nach einer weiteren Möglichkeit der Auswertung gesucht. Bei der Firma Vermicon AG wurde der NitriVIT-Test bezogen und nach dem Testablauf (4 bzw. 24 h) die Proben mit speziellen Gensonden (*in-situ*-Hybridisierung) für Ammoniumoxidierer (rote Fluoreszenz) und Nitritoxidierer (grüne Fluoreszenz) markiert, um die Hemmeffekte der untersuchten Antibiotika Gentamycin und Ofloxacin quantitativ anhand der markierten Bakterien bewerten zu können.

In der Abbildung 64 sind die markierten Nitrifikanten, wie sie in Kläranlagen vorkommen, abgebildet.

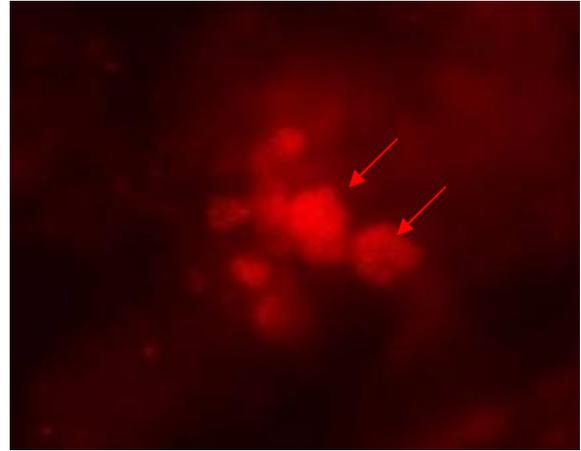
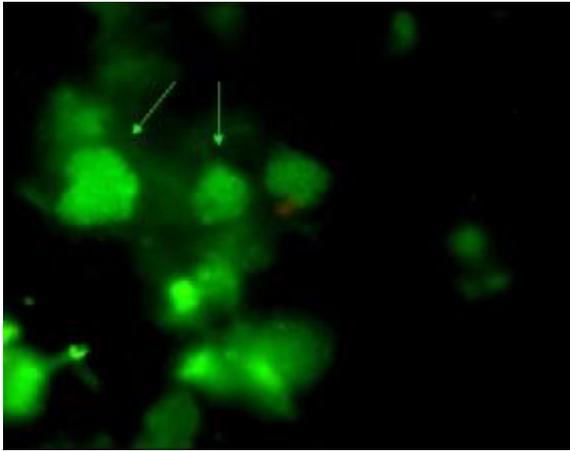


Abb. 64: Nitritoxidierer (grüne Fluoreszenz) und Ammoniumoxidierer (rote Fluoreszenz)

In den weiteren zwei Abbildungen sind zwei Aufnahmen von dem Ansatz mit der niedrigsten und höchsten Antibiotikumskonzentration nach 24 h. Ähnliche Aufnahmen wurden auch für die anderen Antibiotikakonzentrationen einschließlich der Kontrolle gemacht.

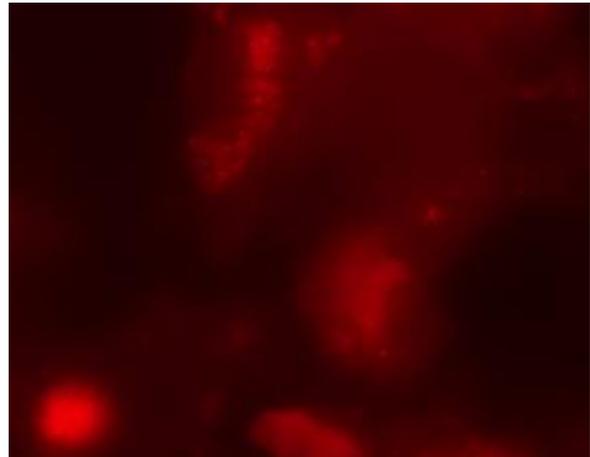
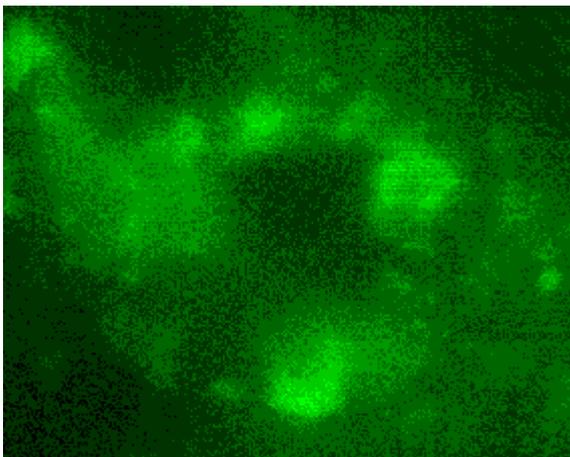


Abb. 65: Grüne und rote Fluoreszenz der Testansätze mit 0,5 mg/l Gentamycin

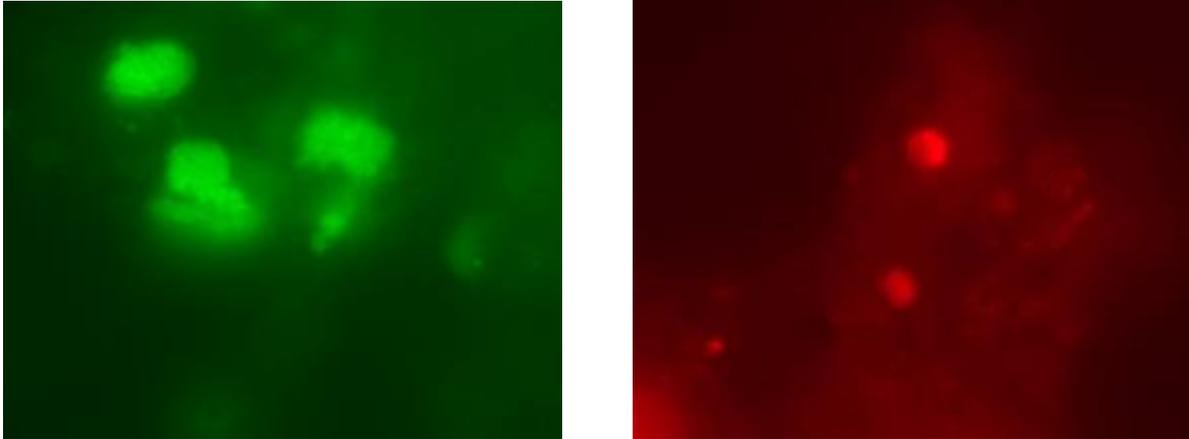


Abb. 66: Grüne und rote Fluoreszenz der Testansätze mit 50 mg/l Gentamycin

Die Ergebnisse des Nitrivit-Tests erlauben eine Identifizierung, Visualisierung sowie Quantifizierung der Ergebnisse.

Bei der Quantifizierung der Ergebnisse wurden 20 willkürliche Gesichtsfelder mit Hilfe des VIT-Schlüssels klassifiziert und einer Wertigkeit zugeordnet.

Hierbei waren deutlich niedrigere Zellzahlen in den Referenzansätzen (Wertigkeit 1 bzw. 2) gegenüber den Kontrollansätzen (Wertigkeit 4) ersichtlich. Auch die Ansätze mit Prüfsubstanz wiesen eine geringere Zellzahl auf, als die Kontrollansätze. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung lag nur bedingt vor. Die Nitrit- und Ammoniumoxidierer lagen bei beiden Versuchen in den Gruppen 2 und 3, wobei nicht immer innerhalb einer Konzentrationsreihe eine andere Wertigkeit zugeordnet werden konnte. Häufig lagen Ansätze unterschiedlicher Konzentration in einer Gruppe, wobei eine konzentrationsabhängige Tendenz innerhalb dieser Gruppe erkennbar war (s. Protokoll Anlagendatei 1.6). Abb. 65 und 66 zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Konzentration und Hemmwirkung. Daraus lässt sich schließen, dass die beiden Testsubstanzen Ofloxacin und Gentamycin eine konzentrationsabhängige Hemmung der Nitrifikation auslösen.

3.4.5 Anaerober Hemmtest

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden erste Versuche mit 1:10 verdünntem Faulschlamm (entsprechend etwa 3,6 g TS/l) und Amoxicillin sowie Tetracyclin als Prüfsubstanzen angesetzt, deren Ergebnisse in Tabelle 8 nur summarisch dokumentiert sind.

Anschließend wurden insgesamt 6 Haupttests mit 15 Antibiotika durchgeführt, bei denen die Inokulumkonzentration abweichend von der ISO/DIS 13641 auf 1 g TS/l

festgelegt wurde. Dies entspricht der unteren Inokulumkonzentration, die für die Bestimmung der anaeroben Abbaubarkeit nach EN ISO 11734 vorgesehen ist. Zudem kann das Ergebnis bei einer Inokulumkonzentration von 1 g TS/l sowohl in mg/l als in mg/g TS angegeben werden (EC_{50} 1 mg/g TS entspricht EC_{50} 1 mg/l, da bei 1 mg Prüfsubstanz/g TS und einer Schlammkonzentration von 1 g TS/l genau 1 mg Prüfsubstanz/l vorgelegt sind).

Am Beispiel von Imipenem kann die Auswertung dokumentiert werden. In Abbildung 67 ist die Faulgasproduktion über die Zeit in Abhängigkeit von der Imipenemkonzentration dargestellt.

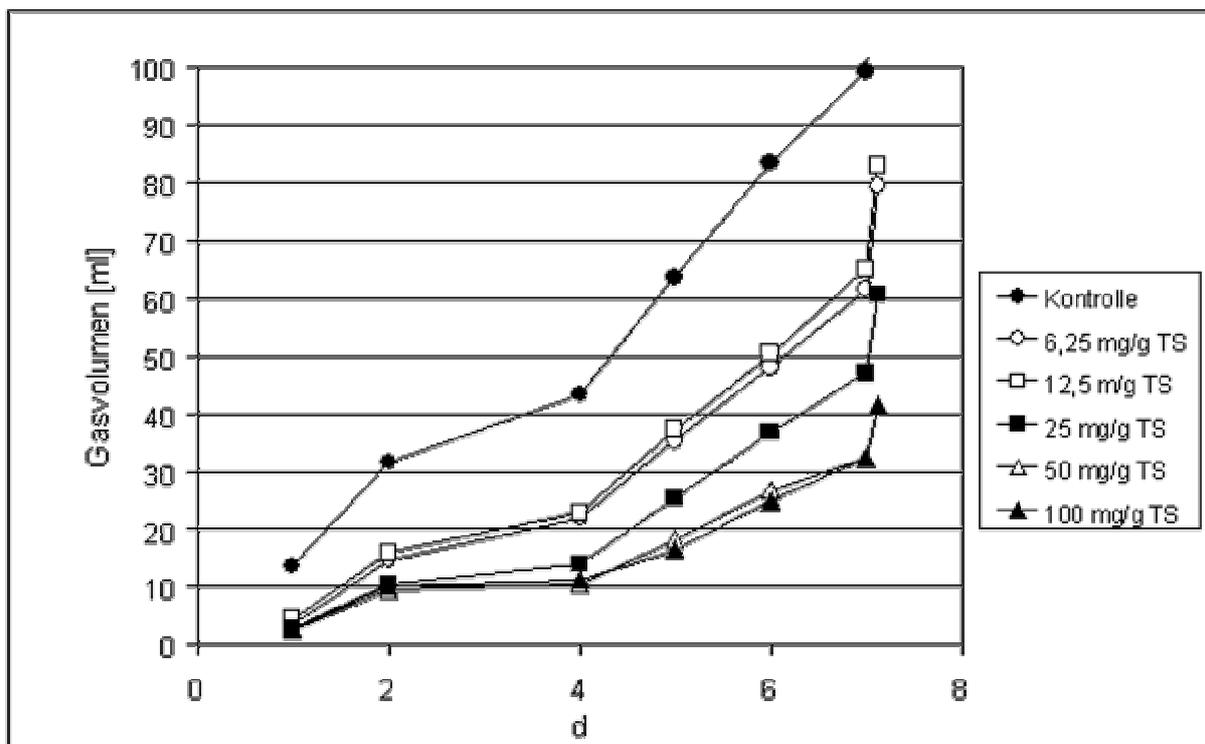


Abb. 67: Anaerobe Hemmung Imipenem (kumulative Faulgasentwicklung)

Aus diesen Daten kann zu jedem Messzeitpunkt die prozentuale Hemmung der Faulgasentwicklung in Bezug auf die Kontrollansätze berechnet werden. In Tabelle 90 ist die daraus folgende Auswertung der Probitanalyse nach Versuchsende wiedergegeben. Aus der linearen Regressionsgerade nach log-Probit Transformation der Daten errechnen sich die EC -Werte (EC_{10} Imipenem = 0,7 mg/g TS; EC_{50} = 24 mg/g TS).

Eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung wie Imipenem zeigen Ceftriaxon, Clindamycin, Chlortetracyclin, Gentamycin, Ofloxacin und Tetracyclin, deren EC_{50} -Werte zwischen 35 und 282 mg/g TS liegen (vgl. Tab. 92). Oftmals wurden jedoch, wie das Beispiel Metronidazol zeigt, sehr flache Dosis-Wirkungsbeziehungen gefunden (vgl. Tab. 91).

Metronidazol, das auch gegen Anaerobier therapeutisch eingesetzt wird, zeigte im gesamten getesteten Konzentrationsbereich von 6 bis 100 mg/g TS eine starke Hemmwirkung gegen den Faulschlamm (65% - 83%). Die sich errechnenden EC_{50} und EC_{10} Werte von 0,69 mg/g TS bzw. 0,001 mg/g TS mussten jedoch weit über den getesteten Konzentrationsbereich hinaus extrapoliert werden und sind demzufolge ungenau. Ein ähnliches Verhalten zeigt Monensin. Andere Antibiotika wie Amoxicillin, Benzylpenicillin, Cefuroxim, Erythromycin, Nystatin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim zeigen bis 100 mg/g TS Prüfkonzentration keine oder nur geringe Hemmwirkungen.

Zugleich wird deutlich, dass die anaerobe Hemmwirkung auch von der Inkubationsdauer abhängig ist. Der EC_{50} von Imipenem nimmt mit der Inkubationsdauer kontinuierlich zu, während die von Tetracyclin und der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol tendenziell abnehmen (vgl. Abb. 68).

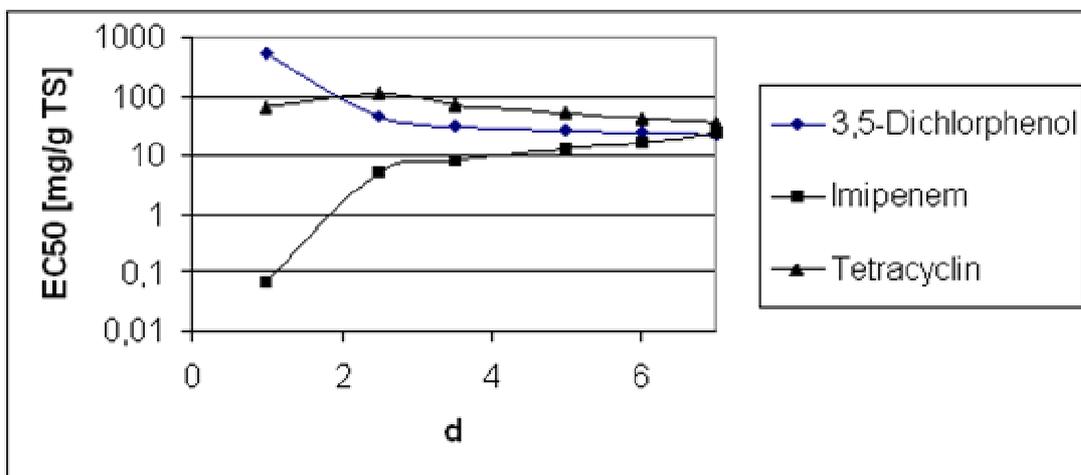


Abb. 68: EC_{50} anaerobe Hemmwirkung und Inkubationsdauer

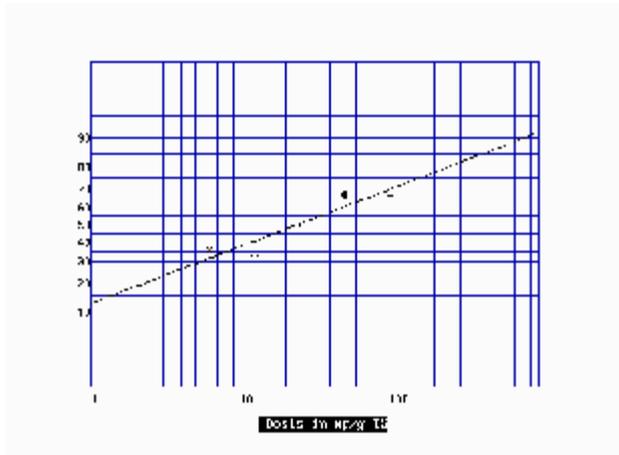
Mit der Referenzsubstanz Dichlorphenol wurden EC_{50} -Werte von 3,1 bis 22,0 mg/g TS bestimmt. In einem weiteren Versuch war der EC_{50} nicht auswertbar, lag jedoch über 25 mg/g TS. Die Reproduzierbarkeit des Versuches ist demnach für Dichlorphenol nur bedingt gegeben. Validitätskriterien wurden bisher nicht festgelegt (Evans und Painter 2000).

Die Ergebnisse der anaeroben Hemmtests ließen erwarten, dass ein Großteil der Antibiotika auf ihre anaerobe Abbaubarkeit nach EN ISO 11734 hin untersucht werden kann.

Tab. 90: Probitauswertung anaerobe Hemmung Imipenem nach 7 d (Versuch vom 15.03.01)

Nr.	Dosis [mg/g TS]	Log(Dosis)	Reaktion [%]	Probit
1	6.25	0.80	35.64	4.63
2	12.50	1.10	32.78	4.55
3	25.00	1.40	50.94	5.02
4	50.00	1.70	66.62	5.43
5	100.00	2.00	66.45	5.42

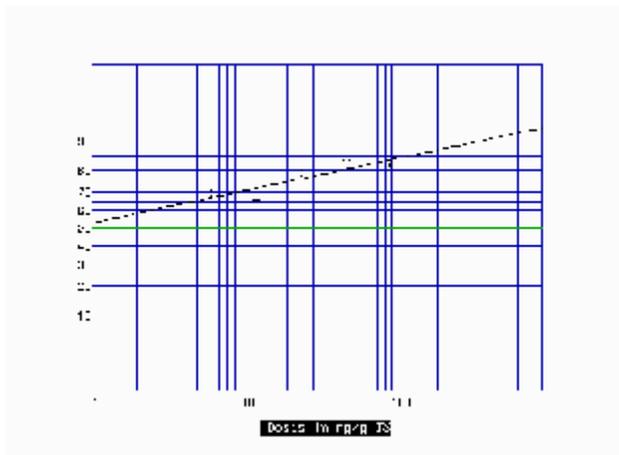
Korrelationskoeffizient: 0.93
 Steigung: 0.82
 Y-Achsenabschnitt in Probit: 3.87
 EC₁₀ 0.65 mg/g TS
 EC₅₀ 24.12 mg/g TS
 EC₉₀ > 100 mg/g TS



Tab. 91: Probitauswertung anaerobe Hemmung Metronidazol 7 d (Versuch vom 3.11.00)

Nr.	Dosis [mg/g TS]	Log(Dosis)	Reaktion [%]	Probit
1	6.25	0.80	68.96	5.49
2	12.50	1.10	65.48	5.40
3	25.00	1.40	78.32	5.78
4	50.00	1.70	83.38	5.97
5	100.00	2.00	81.34	5.89

Korrelationskoeffizient: 0.86
 Steigung: 0.45
 Y-Achsenabschnitt in Probit: 5.07
 EC₁₀ 0.001 mg/g TS
 EC₅₀ 0.69 mg/g TS
 EC₉₀ > 100 mg/g TS



Tab. 92: Anaerobe Hemmwirkung von Antibiotika in Anlehnung an ISO/DIS 13641

Substanz	EC₁₀ [mg/g TS]	EC₅₀ [mg/g TS]	EC₉₀ [mg/g TS]	Bemerkungen Versuch vom
Amoxicillin	2,6	84,8	>100	Vorversuch mit höherer Schlammkonz. um 3,6 g TS/l *) 19.10.00 13.12.00
	22,7	>100	-	
	14,3	>100	-	
Benzylpenicillin	32,1	> 100	-	19.10.00
Ceftriaxon	6,0	>100	-	15.03.01
Cefuroxim	14,9	>100	-	13.12.00 (Im Vorversuch EC ₁₀ 39,8 mg/g TS)
Chlortetracyclin	4,0	41,6	> 100	19.10.00
Clindamycin	2,7	>100	-	15.03.01
Erythromycin	Bei 6-100 mg/g TS 27-39% Hemmung			13.12.00 Keine Dosis-Wirkungs-Beziehung 16.11.00
	54,8	> 100	-	
Gentamycin	3,4	88,0	> 100	16.11.00
Imipenem	0,7	24,1	>100	15.03.01
Metronidazol	0,001	0,69	> 100	3.11.00 (flache Dosis-Wirkungsbeziehung, Extrapolation ungenau)
Monensin	Bei 25-100 mg/g TS 77% Hemmung			13.12.00 (keine Dosis-Wirkungs-Beziehung) 16.11.00 (Screening)
	bei 100 mg/g $\hat{=}$ 84,1 % Hemmung			
Nystatin	>100	>100	>100	3.11.00 (keine Hemmwirkung bis 100 mg/g)
Ofloxacin	4,9	39,5	> 100	23.08.00
Sulfamethoxazol	>100	>100	>100	23.08.00 (keine Hemmwirkung bis 100 mg/g)
Tetracyclin HCl	1,8	35,0	> 100	3.11.00 Vorversuch mit höherer Schlammkonz. um 3,6 g TS/l
		27,7		
Trimethoprim	>100	>100	>100	19.10.00 (keine Hemmwirkung bis 100 mg/g)

Schlammkonzentration: 1 g TS/l; Substrat: 2,5 g/l Hefeextrakt; Versuchszeit: 7d;

wenn berechneter EC₅₀ bzw. EC₉₀ > Testkonzentration (100 mg/g TS) $\hat{=}$ Angabe > 100 mg /g TS.

3.5 MODELLIERUNG UND RISIKOBEWERTUNG

3.5.1 Vergleich der statistischen Methoden für die EC_x -Berechnung

Die Standardmethode zur Bestimmung von EC_x -Werten ist nicht nur im Fall des Wachstumshemmtests die lineare Probitregression. Da die Probitregression auf sehr spezifischen Annahmen beruht, die in der Praxis nicht immer gegeben sind, wurden ihr flexibleren Funktionen gegenübergestellt, die mit Hilfe von nichtlinearer Regression an die Daten angepasst wurden.

Die geschätzten EC_x -Werte sind mit Hilfe des Histogrammes veranschaulicht. Die „wahren“ EC_x -Werte aus der Simulationsstudie sind als rote senkrechte Linie eingezeichnet.

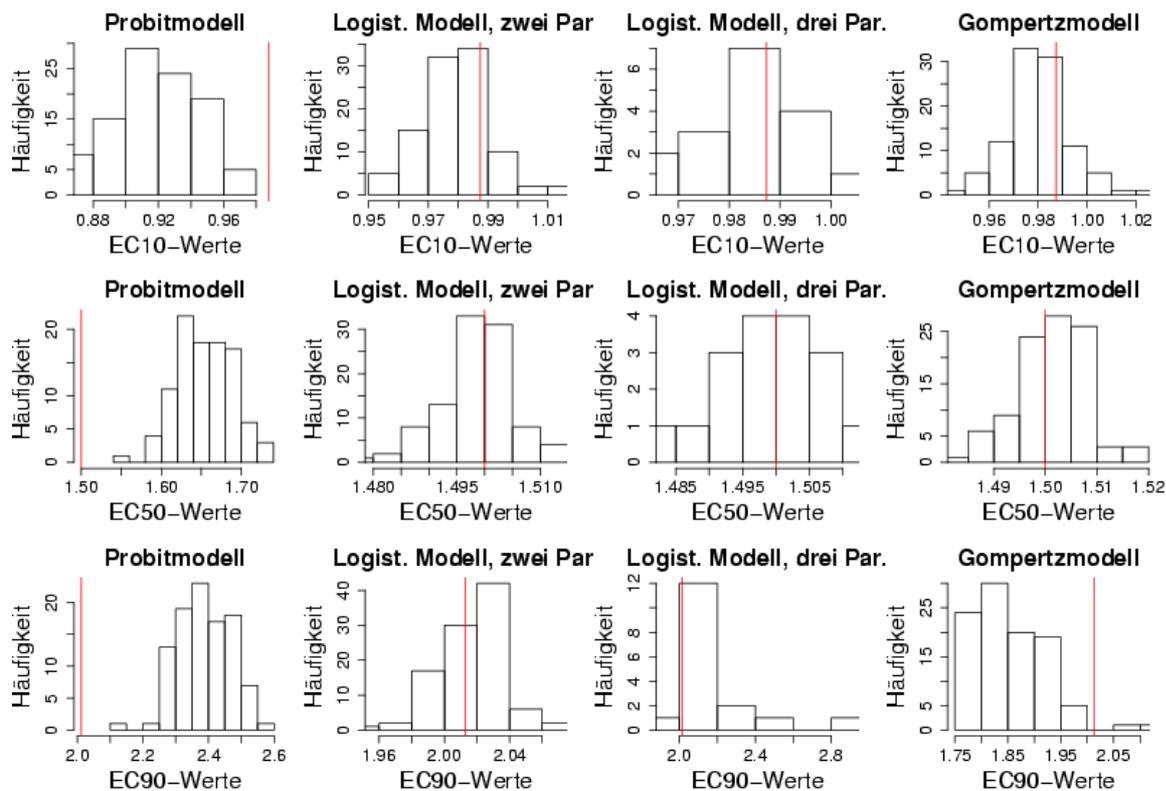


Abb. 69: Daten aus einer Normalverteilung simuliert, Annahme – beobachtete Werte nur im unteren Bereich bis 0,6

Die Abb. 69 stellt die Schätzungen aus den simulierten Daten dar, bei denen Punkte nur im unteren Bereich bis knapp über 50% der Wachstumshemmung beobachtet wurden. Die Probitanalyse liefert hier Schätzungen, die nie den wahren Wert erfassen. Dabei werden die EC_{50} und EC_{90} immer als zu hoch geschätzt. Damit würde man das Risiko unterschätzen, dass mit der Substanz verbunden ist.

Der Abb. 70 liegt der Idealfall zugrunde. Die Datenpunkte zeigen eine vollständige sigmoidale Form, die durch Normalverteilung approximiert werden kann. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie den gesamten Bereich 0-100% der Wachstumshemmung abdecken. Trotzdem wurden auch hier die EC₁₀- und EC₉₀-Werte zu niedrig beziehungsweise zu hoch eingeschätzt.

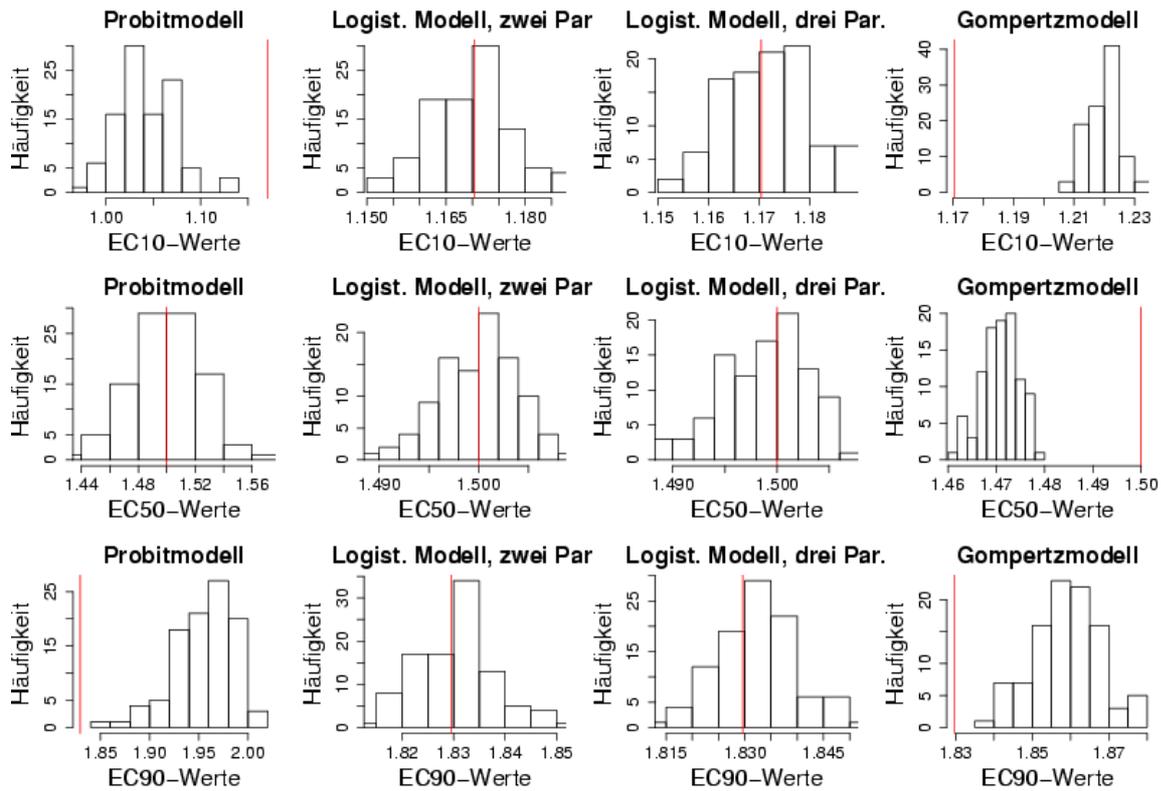


Abb. 70: Daten aus einer zweiparametrischen logistischen Verteilung simuliert, Annahme – beobachtete Werte idealerweise gleichmäßig verteilt

Die Simulationen haben deutlich gezeigt, dass das Probitmodell nur für Berechnung des EC₅₀-Wertes von einer symmetrischen Datenverteilung geeignet ist. In allen anderen Fällen werden die Werte unter- bzw. überschätzt. Eine nichtlineare Regression ermöglicht eine bessere Repräsentation als das Probitmodell. Die logistische Regression mit zwei Parametern liefert unabhängig von der Datenverteilung sehr gute Ergebnisse. Eine Vorhersage der Ergebnisse mit logistischer Regression mit drei Parametern ist noch besser, aber nur wenn sich der dritte Parameter für die obere Schranke schätzen lässt (Gleißner et al. eingereicht).

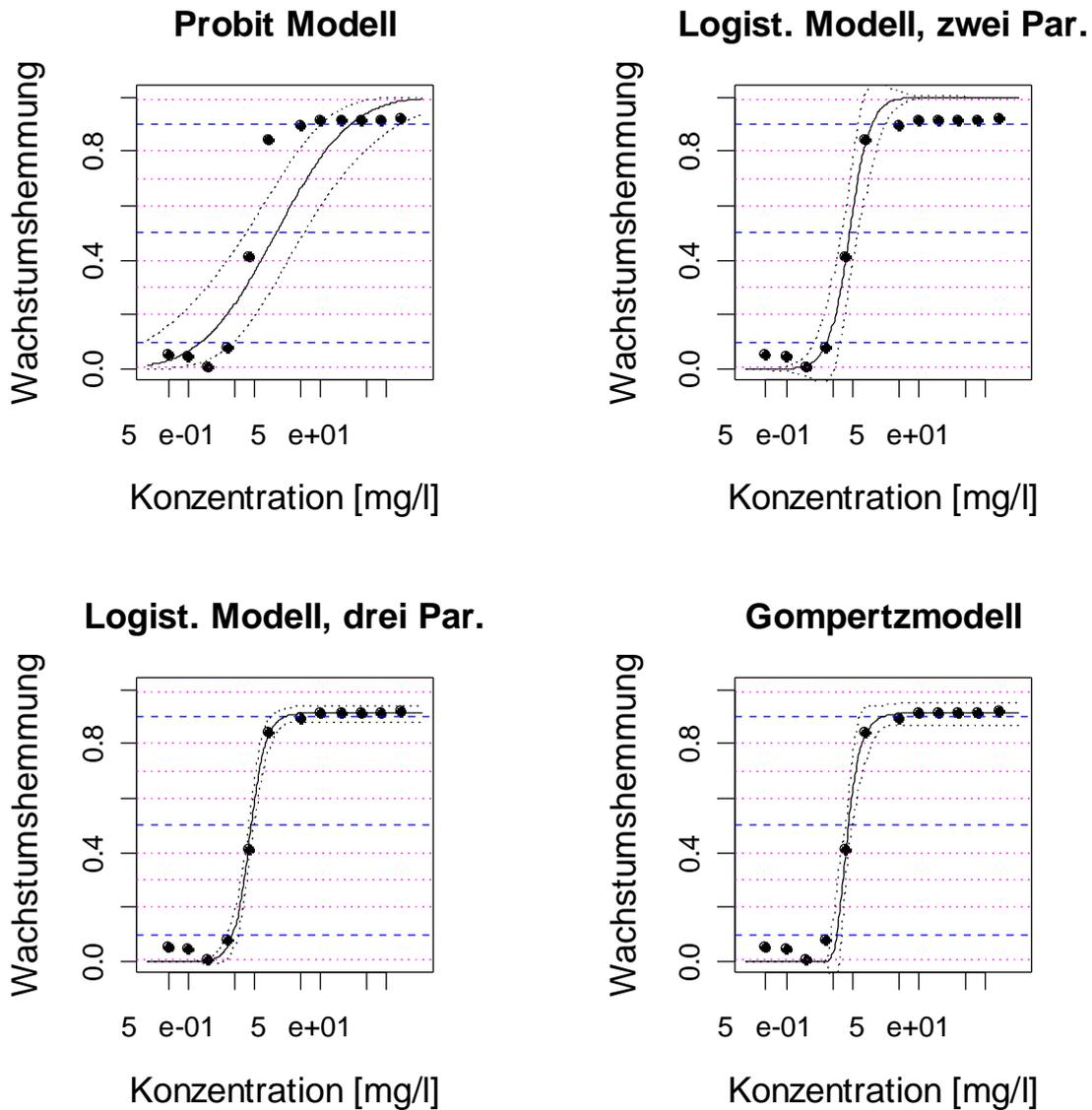


Abb. 71: Probitmodell, logistisches Modell mit zwei und drei Parametern sowie Gompertzmodell mit Konfidenzintervallen für Amoxicillin von Wachstumshemmtest mit *Ps. putida*

Tab. 93: Mit verschiedenen Modellen berechnete EC_x -Werte für Amoxicillin (WHT, *Ps. putida*, ATCC 50026); PEC/PNEC-Quotient mit EC_{50} -Wert berechnet

Verfahren	EC_{10} [µg/l]	EC_{50} [µg/l]	EC_{90} [µg/l]	PEC ^(*) [µg/l]	PEC/PNEC (TGD, 1996)	PEC/PNEC (IUK)
Probitmodell	1.540	20.926	284.267	2,571	0,001	0,123
Logist. Modell, 2 Par.	4.161	9.097	19.884	2,571	0,003	0,283
Logist. Modell, 3 Par.	4.627	8.832	28.601	2,571	0,003	0,291
Gompertzmodell	5.793	8.712	29.655	2,571	0,003	0,295

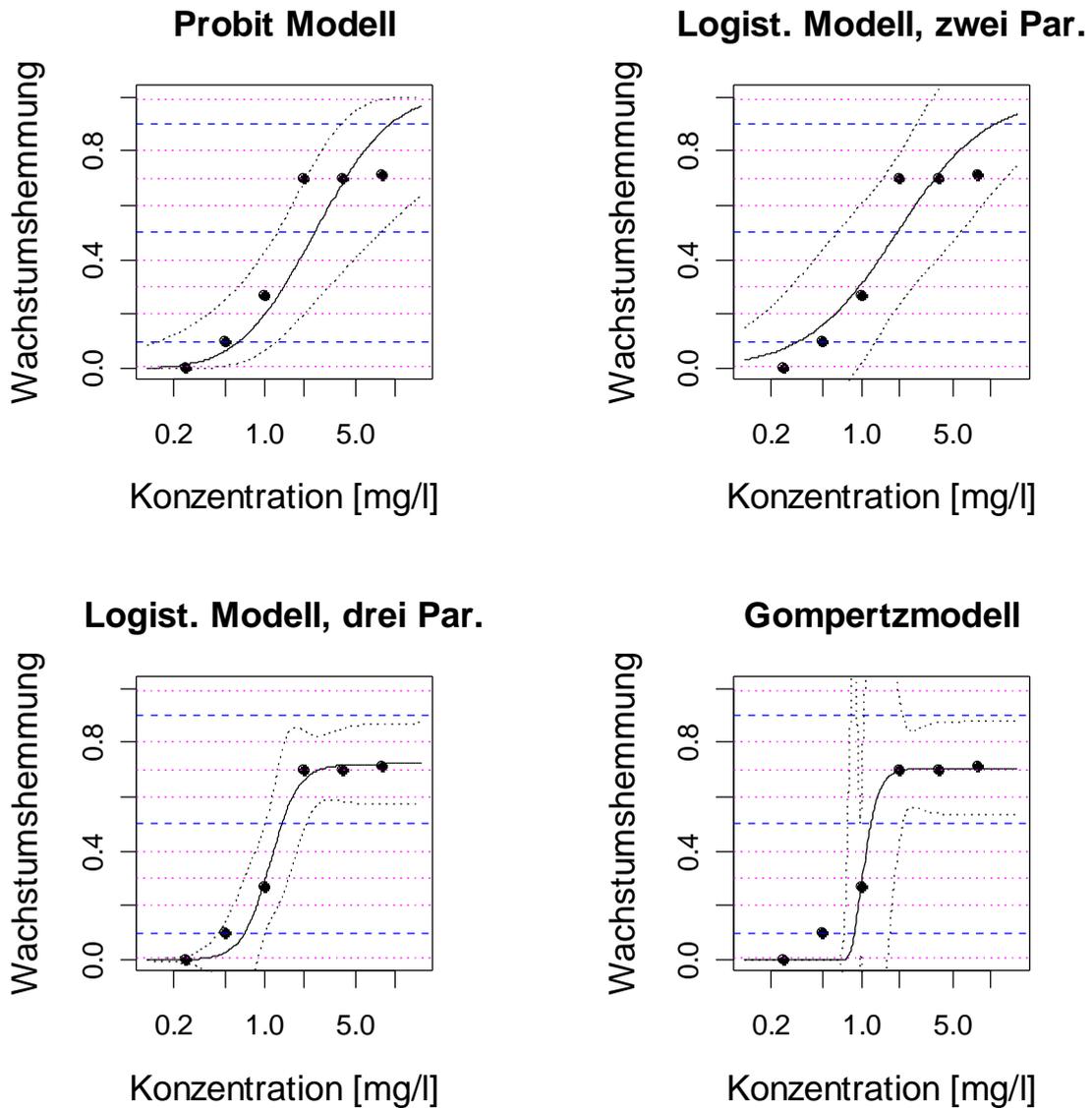


Abb. 72: Probitmodell, logistisches Modell mit zwei und drei Parametern sowie Gompertzmodell mit Konfidenzintervallen für Ofloxacin von Wachstumshemmtest mit *E. faecalis*

Tab. 94: Mit verschiedenen Modellen berechnete EC_x -Werte für Ofloxacin (WHT mit *E. faecalis* (ATCC 50026)); PEC/PNEC-Quotient mit EC_{50} -Wert berechnet

Verfahren	EC_{10} [µg/l]	EC_{50} [µg/l]	EC_{90} [µg/l]	PEC*) [µg/l]	PEC/PNEC (IUK)
Probitmodell	632	2.424	9.295	0,110	0,045
Logist. Modell, 2 Par.	329	1.888	10.844	0,110	0,058
Logist. Modell, 3 Par.	702	1.354	n.n.	0,110	0,081
Gompertzmodell	893	1.182	n.n.	0,110	0,093

Um zu veranschaulichen, inwieweit sich die EC_x Werte bei der Anwendung der vier Verfahren in der Praxis unterscheiden, ist als Beispiel für jeden Keim jeweils ein Antibiotikum mit allen Verfahren präsentiert (s. Abb. 71 und 72). Es wurde eine symmetrische Datenverteilung verwendet, wofür das Probitmodell geeignet ist.

Aus diesen Beispielen kann man ersehen, dass die verschiedenen Verfahren unterschiedliche EC_x Werte und Konfidenzintervalle angeben. Eine Ursache dafür ist, dass die Nichtlineare Regression wesentlich flexibler ist, also meistens näher an den Daten liegt und somit auch engere Konfidenzbänder erzeugt. Die gewählten Modelle geben aber auch ein unterschiedliches Aussehen der Funktion vor.

An dieser Stelle sollte hervorgehoben werden, dass das Ziel der toxikologischen Tests ist, das Risiko der untersuchten Substanz auf die Umwelt einzuschätzen. Werden die EC_x Werte zu hoch eingeschätzt, wird davon abgeleitet, dass die prozentuelle Hemmung x bei einer höheren Konzentration eintritt. In diesem Fall sind die Wirkung der Substanz und damit verbundene Risiken für die aquatische Umwelt unterschätzt.

3.5.2 Modellierung

3.5.2.1 ERGEBNISSE DER MODELLIERUNG

Tab. 95: Geschätzte Umweltkonzentrationen im Kläranlagenablauf, mit den Modellen EUSES und EMEA sowie (wenn vorhanden) analytische Messwerte.

Substanz	Kläranlagenabfluss		
	EUSES [µg/l]	EMEA [µg/l]	Messwerte ^{a)} [µg/l]
Amoxicillin (550 t/a) CAS 26787-78-0	16	17	-
Benzylpenicillin (30,7 t/a) CAS 61-33-6	1	1,1	-
Ceftriaxon (17,3 t/a) CAS 73384-59-5	0,39	0,39	-
Cefuroxim (45,1 t/a) CAS 55268-75-2	1,7	1,7	-
Chlortetracyclin (50 t/a *) CAS 57-62-5	0,61	0,55	-
Clarithromycin (2,7 t/a) CAS 81103-11-9	0,094	0,1	0,028 – 0,177
Clindamycin (19,7 t/a) CAS 18323-44-9	0,28	0,26	0,035 – 0,053
Erythromycin (114 t/a) CAS 114-07-8	0,79	0,65	0,180 – 0,440 ^{b)}
Gentamycin (1,1 t/a) CAS 1403-66-3	0,041	0,042	-
Imipenem (8,8 t/a) CAS 64221-86-9	0,23	0,23	-
Metronidazol (35,8 t/a) CAS 443-48-1	0,56	0,54	-
Monensin (50 t/a *) CAS 17090-79-8	1	1,8	-
Nystatin (17,5 t/a) CAS 1400-61-9	0,64	0,67	-
Ofloxacin (26,9 t/a) CAS 83380-47-6	0,8	0,82	0,04 – 0,094
Sulfamethoxazol (245 t/a) CAS 723-46-6	8,1	7,2	0,208 – 1,1
Tetracyclin (0,053 t/a) CAS 60-54-8	0,0014	0,0014	-
Trimethoprim (43,6 t/a) CAS 738-70-5	1,1	1,2	0,017 – 0,34
Vancomycin (6,9 t/a) CAS 1404-90-6	0,23	0,24	-

a) Daten aus dem Kläranlagenablauf von drei Kläranlagen. Bereich der Mittelwerte.

b) Werte für Dehydrato-Erythromycin A.

*) Keine Daten zur Produktionsmenge verfügbar, daher wurde eine willkürliche Menge von 50 t / Jahr angenommen.

Tab. 96: Geschätzte Umweltkonzentrationen in Oberflächengewässern mit den Modellen EUSES, TOXSWA und EMEA sowie (wenn vorhanden) analytische Messwerte.

Substanz	Oberflächenwasser			
	EUSES (Anfangskonz.) [µg/l]	TOXSWA (TWA 21 d) [µg/l]	EMEA (Anfangskonz.) [µg/l]	Messwerte [µg/l]
Amoxicillin (550 t/a) CAS 26787-78-0	1,6	0,65	1,7	-
Benzylpenicillin (30,7 t/a) CAS 61-33-6	0,1	0,041	0,11	-
Ceftriaxon (17,3 t/a) CAS 73384-59-5	0,039	0,016	0,039	-
Cefuroxim (45,1 t/a) CAS 55268-75-2	0,17	0,066	0,17	-
Chlortetracyclin (50 t/a *) CAS 57-62-5	0,061	0,024	0,055	-
Clarithromycin (2,7 t/a) CAS 81103-11-9	0,0094	0,0037	0,010	-
Clindamycin (19,7 t/a) CAS 18323-44-9	0,028	0,011	0,026	-
Erythromycin (114 t/a) CAS 114-07-8	0,079	0,031	0,065	-
Gentamycin (1,1 t/a) CAS 1403-66-3	0,0041	0,0016	0,0042	-
Imipenem (8,8 t/a) CAS 64221-86-9	0,023	0,0092	0,023	-
Metronidazol (35,8 t/a) CAS 443-48-1	0,056	0,0224	0,054	-
Monensin (50 t/a *) CAS 17090-79-8	0,10	0,013	0,18	-
Nystatin (17,5 t/a) CAS 1400-61-9	0,064	0,026	0,0665	-
Ofloxacin (26,9 t/a) CAS 83380-47-6	0,08	0,032	0,082	-
Sulfamethoxazol (245 t/a) CAS 723-46-6	0,81	0,33	0,72	-
Tetracyclin (0,053 t/a) CAS 60-54-8	0,00014	$5,55 \cdot 10^{-5}$	0,00014	-
Trimethoprim (43,6 t/a) CAS 738-70-5	0,11	0,046	0,12	-
Vancomycin (6,9 t/a) CAS 1404-90-6	0,023	0,0091	0,024	-

*) Keine Daten zur Produktionsmenge verfügbar, daher wurde eine willkürliche Menge von 50 t / Jahr angenommen.

Tab. 97: Geschätzte Umweltkonzentrationen im Sediment mit den Modellen EUSES, TOXSWA und EMEA sowie (wenn vorhanden) analytische Messwerte.

Substanz	Sediment			
	EUSES (Anfangskonz.) [µg/kg TG]	TOXSWA (t = 200 d) [µg/kg TG]	EMEA (Anfangskonz.) [µg/kg TG]	Messwerte [µg/kg TG]
Amoxicillin (550 t/a) CAS 26787-78-0	3,1	7,6	3,7	-
Benzylpenicillin (30,7 t/a) CAS 61-33-6	0,36	1,1	0,38	-
Ceftriaxon (17,3 t/a) CAS 73384-59-5	0,061	0,16	0,08	-
Cefuroxim (45,1 t/a) CAS 55268-75-2	0,28	0,71	0,36	-
Chlortetracyclin (50 t/a *) CAS 57-62-5	0,096	0,25	0,12	-
Clarithromycin (2,7 t/a) CAS 81103-11-9	0,30	1,4	0,37	-
Clindamycin (19,7 t/a) CAS 18323-44-9	0,15	0,57	0,14	-
Erythromycin (114 t/a) CAS 114-07-8	2,0	7,9	1,9	-
Gentamycin (1,1 t/a) CAS 1403-66-3	0,0064	0,016	0,0086	-
Imipenem (8,8 t/a) CAS 64221-86-9	0,036	0,093	0,048	-
Metronidazol (35,8 t/a) CAS 443-48-1	0,091	0,23	0,11	-
Monensin (50 t/a *) CAS 17090-79-8	304	86	1140	-
Nystatin (17,5 t/a) CAS 1400-61-9	0,10	0,26	0,14	-
Ofloxacin (26,9 t/a) CAS 83380-47-6	0,13	0,33	0,17	-
Sulfamethoxazol (245 t/a) CAS 723-46-6	1,5	3,8	1,6	-
Tetracyclin (0,053 t/a) CAS 60-54-8	0,00022	0,00056	0,00029	-
Trimethoprim (43,6 t/a) CAS 738-70-5	0,22	0,56	0,26	-
Vancomycin (6,9 t/a) CAS 1404-90-6	0,036	0,093	0,048	-

*) Keine Daten zur Produktionsmenge verfügbar, daher wurde eine willkürliche Menge von 50 t / Jahr angenommen.

3.5.2.2 DISKUSSION FÜR DIE STOFFE IM EINZELNEN

Alle untersuchten Antibiotika wurden im Closed Bottle Test während 28 Tage nicht abgebaut und somit sind alle als "biologisch nicht leicht abbaubar" einzustufen (s.

Tab. 55). Auch wenn einige Stoffe unter anderen Versuchsbedingungen eine gewisse Abbaubarkeit zeigen, so ist doch dieses Ergebnis, im Sinne eines "worst-case" maßgeblich.

Auf die Ausscheidungsraten, die für alle Stoffe in Tabelle 41 angegeben sind, und die in den beiden Modellen EUSES und EMEA berücksichtigt werden, wird im Folgenden nicht mehr eingegangen.

Alle Angaben zu Stoffdaten sind dem Anhang (Stoffdossiers) entnommen.

Amoxicillin

Amoxicillin hat pK_s -Werte von 2,4 / 7,4 / 9,6, daher wird es teilweise in dissoziierter Form vorliegen. Die Wasserlöslichkeit ist hoch und der $\log P_{OW}$ ist sehr niedrig, wodurch sich eine geringe Adsorption an organischen Kohlenstoff ergibt. Dies führt dazu, dass der Stoff in Kläranlagen kaum zurückgehalten wird (99,9% geht in den Kläranlagenabfluss). Über andere Adsorptionsformen kann keine Aussage gemacht werden.

Amoxicillin wird als Antibiotikum sowohl beim Menschen als auch bei Tieren eingesetzt. Die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von 125 t in Deutschland (550 t in der EU) bezieht sich jedoch nur auf den Humanbereich.

Für Amoxicillin wurde ein inhärenter Bioabbau nachgewiesen, so dass die errechneten Konzentrationen im Oberflächenwasser noch mal um den Faktor 0,5 kleiner ausfallen könnten.

Benzylpenicillin

Benzylpenicillin liegt als dissoziiertes Natriumsalz vor (pK_s 2,1 – 2,8). Nach Berechnungen mit EPIWIN ist der $\log P_{OW}$ deutlich niedriger als bei der ungeladenen Form. Über andere Adsorptionsformen kann keine Aussage gemacht werden.

Problematisch ist die Angabe "wenig löslich" (Merck-Index 1996) für die ungeladene Form von Benzylpenicillin, die mit dem geringen $\log P_{OW}$ von 1,83 nicht korrespondiert. EPIWIN errechnet eine Wasserlöslichkeit von 210 mg/l. Die Verwendung einer höheren Wasserlöslichkeit führt zu einem etwas höheren PEC in Oberflächenwasser. Erwartungsgemäß ist der relative Anteil an Substanz, der in das Sediment geht, etwas höher als z. B. bei Amoxicillin mit einem noch deutlich niedrigerem $\log P_{OW}$.

Benzylpenicillin wird als Antibiotikum sowohl beim Menschen als auch bei Tieren eingesetzt. Die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von knapp 7 t in Deutschland (30,7 t in der EU) bezieht sich jedoch nur auf den Humanbereich. Für Benzylpenicillin wurde ein inhärenter Bioabbau nachgewiesen, so dass die errechneten Konzentrationen im Oberflächenwasser noch mal um den Faktor 0,5 kleiner ausfallen könnten.

Ceftriaxon

Ceftriaxon liegt als dissoziiertes Dinatriumsalz vor ($pK_s \sim 3/ 3,2/ 4,1$). Das bedeutet, dass die ungeladene Form der Substanz, für die hier die Modellierung vorgenommen wurde, in der Umwelt gar nicht vorkommt. Über die physikalisch-chemischen Daten und die Adsorptionseigenschaften des Dinatriumsalzes liegen keine Angaben vor.

Ceftriaxon ist gut wasserlöslich mit einem sehr niedrigen $\log P_{OW}$ und zeigt daher die hierfür typische Verteilung in der Wasser- bzw. Sedimentphase.

Ceftriaxon wird als Antibiotikum nur in der Humanmedizin eingesetzt. Das Vorkommen in der Umwelt kann daher auf die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von knapp 4 t in Deutschland (17,3 t in der EU) bezogen werden.

Cefuroxim

Cefuroxim liegt als dissoziiertes Natriumsalz vor ($pK_s 2,5$). Das bedeutet, dass die ungeladene Form der Substanz, für die hier die Modellierung vorgenommen wurde, in der Umwelt gar nicht vorkommt. Über die physikalisch-chemischen Daten und die Adsorptionseigenschaften des Natriumsalzes liegen keine Angaben vor.

Cefuroxim ist gut wasserlöslich mit einem niedrigen $\log P_{OW}$ und zeigt daher die hierfür typische Verteilung in der Wasser- bzw. Sedimentphase.

Cefuroxim wird als Antibiotikum nur in der Humanmedizin eingesetzt. Das Vorkommen in der Umwelt kann daher auf die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von etwas über 10 t in Deutschland (45,1 t in der EU) bezogen werden.

Chlortetracyclin

Chlortetracyclin liegt als Hydrochlorid vor, mit einer breiten Spanne für den pK_s (3,3/ 7,4/ 9,3).

Problematisch ist die Angabe "schlecht wasserlöslich" (Dietrich et al. 1998) für Chlortetracyclin, die mit dem geringen $\log P_{OW}$ von 0,62 nicht korrespondiert. EPIWIN errechnet eine Wasserlöslichkeit von 618 mg/l. Die Verwendung einer höheren Wasserlöslichkeit führt zu einem etwas höheren PEC in Oberflächenwasser.

Chlortetracyclin wird als Antibiotikum sowohl beim Menschen als auch bei Tieren und in der Aquakultur eingesetzt. Es lagen keine Angaben zur Verbrauchsmenge vor, so dass eine willkürliche Menge von 50 t für die EU zugrunde gelegt wurde.

Clarithromycin

Clarithromycin hat einen pK_s von 8,8, so dass zumindest ein Teil dissoziiert vorliegen wird.

Aufgrund des hohen $\log P_{OW}$ von 3,2 für die undissoziierte Form und der geringen Wasserlöslichkeit zeigt sich erwartungsgemäß eine hohe Verlagerung in das Sediment.

Clarithromycin wird als Antibiotikum nur in der Humanmedizin eingesetzt. Das Vorkommen in der Umwelt kann daher auf die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von 0,6 t in Deutschland (2,7 t in der EU) bezogen werden. Die berechneten Werte (0,094 und 0,1 $\mu\text{g/l}$) sind denen, die in Kläranlagenabläufen gefunden wurden (0,028 – 0,177) durchaus vergleichbar.

Clindamycin

Clindamycin hat einen pK_s von 7,6, so dass zumindest ein Teil dissoziiert vorliegen wird.

Der $\log P_{OW}$ von 2,2 ist mäßig hoch und die Wasserlöslichkeit gut (0,03 g/l). Dennoch zeigt sich eine ausgeprägte Tendenz zur Verlagerung in das Sediment.

Clindamycin wird als Antibiotikum sowohl beim Menschen als auch bei Tieren eingesetzt. Die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von knapp 4,5 t in Deutschland (19,7 t in der EU) bezieht sich jedoch nur auf den Humanbereich. Die berechneten Werte (0,28 und 0,26 $\mu\text{g/l}$) liegen deutlich über denen, die in Kläranlagenabläufen gefunden wurden (0,035 – 0,053).

Erythromycin

Erythromycin hat einen pK_s von 8,9, so dass zumindest ein Teil dissoziiert vorliegen wird. Darüber hinaus muss eine erhebliche Metabolisierung im menschlichen Körper

angenommen werden und eher wird der Metabolit Dehydrato-Erythromycin in der Umwelt zu finden sein. Dieser Metabolit wurde auch im Kläranlagenablauf nachgewiesen und zwar in Konzentrationen, die etwa halb so hoch waren, wie die berechneten für die Ausgangssubstanz.

Die Angabe einer Wasserlöslichkeit von "ca. 2 mg/ml" (= 2 g/l) oder auch nur 2 mg/l erscheinen angesichts des $\log P_{OW}$ von 3,06 etwas hoch. EPIWIN errechnet eine Wasserlöslichkeit von 0,52 mg/l, die auch hier verwendet wird.

Aufgrund des hohen $\log P_{OW}$ und der geringen Wasserlöslichkeit zeigt sich erwartungsgemäß eine hohe Verlagerung in das Sediment.

Erythromycin wird als Antibiotikum sowohl beim Menschen als auch bei Tieren und in der Aquakultur eingesetzt. Die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von knapp 26 t in Deutschland (114 t in der EU) bezieht sich jedoch nur auf den Humanbereich.

Gentamycin

Gentamycin liegt als Sulfat vor (es liegen keine Angaben zum pK_s vor). Für die Berechnung wurde daher die Gesamtmenge zugrunde gelegt.

Gentamycin ist gut wasserlöslich mit einem sehr niedrigen $\log P_{OW}$ und zeigt daher die hierfür typische Verteilung in der Wasser- bzw. Sedimentphase.

Gentamycin wird als Antibiotikum sowohl beim Menschen als auch bei Tieren eingesetzt. Die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von 252 kg in Deutschland (1,1 t in der EU) bezieht sich jedoch nur auf den Humanbereich.

Imipenem

Imipenem hat pK_s -Werte von ca. 3,2 / ca. 9,9. In der Analytik zeigte sich, dass Imipenem instabil ist, daher ist die Berechnung auf der Basis der gesamten Stoffmenge fragwürdig.

Imipenem ist gut wasserlöslich mit einem sehr niedrigen $\log P_{OW}$ (<-1) und zeigt daher die hierfür typische Verteilung in der Wasser- bzw. Sedimentphase.

Imipenem wird als Antibiotikum nur in der Humanmedizin eingesetzt. Das Vorkommen in der Umwelt kann daher auf die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von etwas knapp 2 t in Deutschland (8,8 t in der EU) bezogen werden.

Metronidazol

Metronidazol besitzt einen pK_s von 2,4, jedoch liegen keine Angaben darüber vor, in welcher Form die Substanz vorliegt. Daher wird die Berechnung für die gesamte Stoffmenge (unter Berücksichtigung der Ausscheidungsrate) vorgenommen.

Die Angaben zur Wasserlöslichkeit von Metronidazol sind uneinheitlich, jedoch ist aufgrund des sehr niedrigen $\log P_{OW}$ (-0,02) mit einer guten Wasserlöslichkeit zu rechnen.

Metronidazol wird als Antibiotikum nur in der Humanmedizin eingesetzt. Das Vorkommen in der Umwelt kann daher auf die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von etwas über 8 t in Deutschland (35,8 t in der EU) bezogen werden.

Monensin

Monensin liegt als Natriumsalz vor und mit einem pK_s von 6,6 ist auch eine gewisse Dissoziation zu erwarten. Problematisch ist dies für die Abschätzung des Vorkommens der ungeladenen Form, weil Monensin einen sehr hohen $\log P_{OW}$ (5,43) und eine geringe Wasserlöslichkeit (<0,1 mg/l) besitzt, was für das Salz nicht zutreffen muss.

Es lagen keine Angaben zur Verbrauchsmenge von Monensin vor, so dass eine willkürliche Menge von 50 t für die EU zugrunde gelegt wurde.

Der Anwendungsbereich für Monensin ist die Veterinärmedizin. Ob Monensin auch in der Humanmedizin eingesetzt wird, ist unklar.

Nystatin

Nystatin ist neutral (es liegen keine Angaben zum pK_s vor). Berechnungen des $\log P_{OW}$ kommen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen: -2,59 (nach Howard und Meylan 1995); 7,08 nach EPIWIN. Auch die Wasserlöslichkeit wird sehr unterschiedlich angegeben: "praktisch unlöslich" bis 4 mg/ml (Merck 1996); 0,04 mg/l nach EPIWIN. Für die Berechnungen wurde ein $\log P_{OW}$ von -1 und eine Wasserlöslichkeit von 1 g/l angenommen.

Nystatin wird als Antimykotikum sowohl beim Menschen als auch bei Tieren und in der Aquakultur eingesetzt. Die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von knapp 4 t in Deutschland (17,5 t in der EU) bezieht sich jedoch nur auf den Humanbereich.

Ofloxacin

Ofloxacin ist neutral (es liegen keine Angaben zum pK_s vor), daher kann die Berechnung für die gesamte Stoffmenge vorgenommen werden.

Problematisch ist die Angabe "wenig löslich" (Simon und Stille 1993), die mit dem geringen $\log P_{OW}$ von -0,39 nicht korrespondiert. Für diese Substanz liegt keine errechnete Wasserlöslichkeit aus EPIWIN vor; daher wird ein Wert von 1 g/l angenommen. Die Verwendung einer höheren Wasserlöslichkeit führt zu einem etwas höheren PEC in Oberflächenwasser.

Ofloxacin wird als Antibiotikum nur in der Humanmedizin eingesetzt. Das Vorkommen in der Umwelt kann daher auf die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von 6,1 t in Deutschland (26,9 t in der EU) bezogen werden. Die berechneten Werte (0,8 und 0,82 $\mu\text{g/l}$) liegen deutlich über denen, die in Kläranlagenabläufen gefunden wurden (0,04 - 0,094).

Sulfamethoxazol

Sulfamethoxazol besitzt einen pK_s von 5,6. Es liegen jedoch keine Angaben darüber vor, in welcher Form die Substanz vorliegt. Daher wird die Berechnung für die gesamte Stoffmenge vorgenommen.

Die Angabe "sehr schwer wasserlöslich" für Sulfamethoxazol korrespondiert nicht mit dem niedrigen $\log P_{OW}$ von 0,89. EPIWIN errechnet eine Wasserlöslichkeit von 3,9 g/l und gibt als experimentellen Wert 0,610 g/l (bei 37°C) an. Dieser Wert wird hier verwendet.

Sulfamethoxazol wird als Antibiotikum sowohl beim Menschen als auch bei Tieren eingesetzt. Die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von über 48 t in Deutschland (245 t in der EU) bezieht sich jedoch nur auf den Humanbereich. Die berechneten Werte (8,1 und 7,2 $\mu\text{g/l}$) liegen deutlich über denen, die in Kläranlagenabläufen gefunden wurden (0,21 - 1,1).

Tetracyclin

Tetracyclin besitzt einen pK_s von 8,3 / 10,2. Es liegen jedoch keine Angaben darüber vor, in welcher Form die Substanz vorliegt. Daher kann die Berechnung für die gesamte Stoffmenge vorgenommen werden.

Die Angabe "sehr schwer wasserlöslich" für Tetracyclin korrespondiert nicht mit dem niedrigen $\log P_{OW}$ von -1. EPIWIN errechnet 3,9 g/l und gibt als experimentellen Wert 0,231 g/l (bei 25°C) an. Dieser Wert wird hier verwendet.

Tetracyclin wird als Antibiotikum sowohl beim Menschen als auch bei Tieren eingesetzt. Die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von über 12 kg in Deutschland (0,05 t in der EU) bezieht sich jedoch nur auf den Humanbereich.

Trimethoprim

Trimethoprim liegt als Naphthoat vor (pK_s 6,6 / 7,2).

Die Angabe "wasserunlöslich" (BIG, zitiert in GSBL, UBA) und "gering wasserlöslich" (Sigma-Aldrich 1999) für Trimethoprim korrespondiert nicht mit dem niedrigen experimentellem $\log P_{OW}$ von 0,91 (für das ungeladene Molekül). EPIWIN errechnet eine Wasserlöslichkeit von 2,3 g/l und gibt als experimentellen Wert 0,4 g/l (bei 25°C) an. Dieser Wert wird hier verwendet.

Trimethoprim wird als Antibiotikum sowohl beim Menschen als auch bei Tieren und in der Aquakultur eingesetzt. Die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von knapp 10 t in Deutschland (43,6 t in der EU) bezieht sich jedoch nur auf den Humanbereich.

Vancomycin

Vancomycin liegt als Hydrochlorid vor. Da keine weiteren Angaben zum pK_s vorliegen, wird die Berechnung für die gesamte Stoffmenge vorgenommen.

Der $\log P_{OW}$ wurde von EPIWIN mit -0,84 errechnet, entsprechend hoch ist die Wasserlöslichkeit (100 g/l).

Vancomycin wird als Antibiotikum nur in der Humanmedizin eingesetzt. Das Vorkommen in der Umwelt kann daher auf die für die Berechnung zugrunde gelegte Verbrauchsmenge von 1,6 t in Deutschland (6,9 t in der EU) bezogen werden.

3.5.3 Risikoanalyse auf Basis der Ergebnisse des Wachstumshemmtests

Die Ergebnisse aus dem Wachstumshemmtest wurden einer Probit-Analyse unterzogen, um die EC_{10} -, EC_{50} - und EC_{90} -Werte zu ermitteln. Bei der Einschätzung der Wirkschwellen der Antibiotika gegenüber *Pseudomonas putida* und *Enterococcus faecalis* wurde nur in wenigen Fällen auf Anhieb eine für die Probit-Auswertung verwendbare Dosis-Wirkungs-Kurve erreicht. Die Wachstumshemmtests wurden daher

meistens mit einem Antibiotikum mehrmals in unterschiedlichen, sich jedoch überlappenden Konzentrationsbereichen durchgeführt, um eine für die Probit-Auswertung geeignete Wachstumshemmkurve zu bekommen. Dabei hat sich die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bestätigt. In diesen Fällen wurden alle positiven Werte von mehreren Tests einer gemeinsamen Probit-Analyse unterzogen, um die Aussagekraft der EC-Werte zu verbessern. Es wurden im Fall einer guten Datenqualität durch eine gemeinsame Auswertung aller Ergebnisse die Vertrauensbereiche enger und dadurch die Qualität der Ergebnisse ($EC_{10,50,90}$) geprüft. Dies zeigte sich daran, dass die Vertrauensbereiche kleiner wurden und nicht mehr überlappten. Die größte im Wachstumshemmtest eingesetzte Konzentration von 800 mg/l wurde aufgrund der Bilanzierung der zu erwartenden Antibiotikakonzentrationen im Abwasser festgelegt. Darüber hinaus war es notwendig für die Kurvenanpassung der EC-Ermittlung auch Daten im oberen Bereich der Hemmkurve zu haben.

Die Wachstumshemmungen wurden für eine Abschätzung des Risikos für die aquatische Umwelt herangezogen. Im Sinne juristischer und politischer Notwendigkeit (EC Commission Regulation No. 1488/94) haben sich Wissenschaft, Behörden und Industrie daher zunächst auf ein vorzugsweise pragmatisches Vorgehen geeinigt, welches in Teilbereichen wissenschaftlich plausibel und nachvollziehbar ist (TGD 1996). Grundsatz der Bewertung ist demnach der Vergleich der Umweltkonzentrationen mit intrinsischen gefährlichen Stoffeigenschaften; d. h. der geschätzte Wert für die (externe) Exposition (PEC = Predicted Environmental Concentration) wird dividiert durch einen mittels Toxizitätstests unter Verwendung von (Un)sicherheitsfaktoren bezeichneten Grenzwert der Konzentration (PNEC = Predicted No Effect Concentration), bei der mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit keine Schädigung von Organismen, Populationen oder Ökosystemen zu erwarten ist (Oehlmann und Markert 1999). Die Bewertung der Gefährlichkeit eines Stoffs für die Gesamtheit der in einer Lebensgemeinschaft vorkommenden Organismen ist aufgrund der wenigen verfügbaren Toxizitätsdaten nur schwer möglich. Weitere Probleme sind die Speziesunterschiede in der Empfindlichkeit, die Verschiedenheit von akuten und chronischen Wirkungen, sowie die Unterschiede zwischen der Empfindlichkeit einer Laborspezies und derjenigen von ganzen Lebensgemeinschaften (Extrapolation auf die natürliche Situation). Um diese Unsicherheiten in der Wirkungsanalyse und der Risikobeurteilung miteinzubeziehen, werden Extrapolationsfaktoren verwendet. Dies gilt insbesondere für die praktische Handhabung der Schwierigkeiten, die im Zusammenhang mit der Ermitt-

lung sog. „unschädlicher“ Konzentration für die Umwelt stehen, welche ausgehend von Laborbefunden erfolgen sollen ($PNEC_{\text{micro-organism}}$). Die $PNEC_{\text{micro-organism}}$ ergibt sich aus dem Verhältnis der Wirkkonzentration (EC_{10} bzw. EC_{50}) und des Extrapolationsfaktors. Die Höhe des anzuwendenden Extrapolationsfaktors ist abhängig von der Quantität und Qualität der vorhandenen ökotoxikologischen Daten. Für die ermittelten akuten EC_{10} - bzw. EC_{50} -Werte für *Ps. putida* wurde in dem TGD (1996) ein Faktor von 1 (EC_{10}) bzw. 10 (EC_{50}) empfohlen. Als PEC Wert wurde die Bilanzierung der in Oberflächengewässern erwarteten Konzentrationen der Antibiotika für die gesamte BRD verwendet (Kümmerer und Henninger 2003).

Der Risikoquotient wird durch die Division der PEC durch die $PNEC_{\text{micro-organism}}$ berechnet (siehe Tabelle 83 und 84). Ist der resultierende Wert unter 1, so besteht ein nur geringes Risiko, bei einem Wert größer 1 ein deutliches Risiko. Es versteht sich von selbst, dass derartige Verfahren nur eine ungefähre Abschätzung des Risikos erlauben.

Die europäische Kommission (TGD 1996) ist bei dem Ansatz der Extrapolationsfaktoren davon ausgegangen, dass die Nitrifikation als letzter Schritt der Reinigung in den Kläranlagen stattfindet und deswegen dürften die nitrifizierenden Bakterien mit organischen Schadstoffen des Abwassers kaum im Kontakt treten. Die Zusammensetzung des Abwassers bei dieser letzten Reinigungsstufe entspricht eher dem Ablauf der Kläranlage. Nach Wagner und Kayser (1990) sind die nitrifizierenden Bakterien jedoch gegenüber den Umwelteinflüssen empfindlicher als die Belebtschlamm-bakterien, die von der Verwertung organischer Materie leben (heterotrophe Bakterien). Nitrifikanten haben sowohl eine weit langsamere Wachstumsgeschwindigkeit als auch eine viel geringere Artendiversität als heterotrophe Bakterien. Beides sind Effekte, die eine nachhaltige Schädigung der betreffenden Teilbiozönose durch störende Milieubedingungen begünstigen und sollten bei der Risikoanalyse mit berücksichtigt werden. Warum der gleiche niedrige Extrapolationsfaktor nach TGD auch für *Ps. putida* berücksichtigt wird, ist nicht klar. Der Umweltkeim *Ps. putida* ist überall im Abwasser verbreitet und damit auch den großen Schadstoffkonzentrationen des Zulaufs der Kläranlage ausgesetzt. Mit den Eigenschaften (siehe Kapitel 4.4.2.1) ähnelt dieser Keim eher den Belebtschlamm-bakterien. Außerdem ist für die Nitrifikation eine ganze Gruppe von Mikroorganismen der Familie *Nitrobacteraceae* verantwortlich und damit können bei der Risikoabschätzung mehr die Speziesunterschiede berücksichtigt werden. In dem Wachstumshemmtest wird nur eine Reinkultur angesetzt. Es

wurde daher noch eine zweite Risikoabschätzung durchgeführt, wo für die ermittelten akuten EC_{10} bzw. EC_{50} Werte für *Ps. putida* ein Faktor von 100 (EC_{10}) bzw. 1000 (EC_{50}) angewendet wird (siehe Tabelle 83). Der gleichen Risikoanalyse wurden auch die Ergebnisse von *E. faecalis* unterzogen, da für diese Spezies kein spezieller Vorschlag für einen Sicherheitsfaktor der Risikoabschätzung existiert.

Die berechneten Quotienten liegen bei der zweiten Risikoabschätzung (EC_{50} -Werte mit Extrapolationsfaktor 1000 behandelt) für *Ps. putida* alle knapp unter 1 und damit ist bei den ausgewählten Antibiotika von einem ökotoxikologischen Gefährdungspotential auszugehen. Bei *E. faecalis* liegen die berechneten Quotienten um 1. Beim Amoxicillin mit einem PEC/PNEC-Quotient von 11,4 werden schon negative Einflüsse auf den Keim *E. faecalis* erwartet. Außerdem wurden die PEC-Werte von einer Bilanzierung für den Humanbereich übernommen und beinhalten keine Einträge aus dem veterinären Bereich, was z. B. im Falle des Tetracyclins, Chlortetracyclins und Monensins eine große Zunahme der Menge in der Umwelt bedeuten würde (Hamscher et al. 2002; bis 198,7 µg Tetracyclin / kg Boden; 4,6-7,3 µg Chlortetracyclin / kg Boden). Die Antibiotika sind nach dem jetzigen Erfahrungsstand sehr schlecht oder überhaupt nicht abbaubar, was zu einer Aufkonzentrierung des Stoffes in der Umwelt führen könnte. Des Weiteren sind noch Weiterentwicklungen und Verbesserungen in der Risikoanalyse nötig. Sie betreffen unter anderem das Einbeziehen von chronischen Toxizitätsbereichen statt nur EC_{50} -Werte. Außerdem würde das Einbeziehen der Bioverfügbarkeit und verstärkte Berücksichtigung der Bioakkumulation bei der Wirkungsanalyse (PNEC-Werte) die Aussagekraft der Risikoanalyse wesentlich verbessern.

3.5.4 Risikobewertung

Es bestehen erhebliche Datenlücken, sowohl was das Verhalten der ausgewählten Wirkstoffe in der Umwelt, vor allem aber, was die von der Exposition ausgehenden Effekte angeht.

Eine Abschätzung des Risikos, welches durch den Einsatz und durch das Vorkommen der Wirkstoffe in der Umwelt ausgeht, konnte auf der Basis der sehr heterogenen Daten aus der Literatur nicht getroffen werden. Vor allem fehlten chronische Tests zu den Wirkungen von Antibiotika in der Umwelt, denn gerade chronische Effekte spielen in der Umwelt eine wichtige Rolle.

Es hat sich gezeigt, dass teilweise sehr unterschiedliche und z. T. widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur dokumentiert sind. Vermutlich ist dies in den meisten Fällen auf unterschiedliche Testbedingungen und Bewertungsmaßstäbe zurückzuführen. Teilweise werden keine Randbedingungen angegeben. Solche Informationen sind im Rahmen einer Risikoabschätzung wertlos.

Einerseits unterstreicht dies die Notwendigkeit einer weitest möglichen Standardisierung der Testmethoden, um vergleichbare Ergebnisse erhalten. Andererseits hat die wesentlich größere Empfindlichkeit des Keimes *E. faecalis* im Wachstumshemmtest gezeigt, dass Ergebnisse aus einem Test mit einem bestimmten Bakterium nicht auf andere Bakterien oder sogar Organismen übertragbar sind. Gleichzeitig zeigen die Untersuchungen auch die Grenzen der Übertragbarkeit von Labortests auf die Umweltbedingungen auf. Die Effekte der jeweiligen Substanz sind von den jeweiligen Test- bzw. Umweltbedingungen abhängig. Des Weiteren wird die Unterschätzung der Effektkonzentrationen bei Berechnung mit Probitmodell, unzureichende Begründung des Sicherheitsfaktors für *Ps. putida* oder vollständig fehlende Angaben für *E. faecalis* in TGD nicht berücksichtigt. Aufgrund der Vielzahl und Komplexität der Einflüsse ist es schwer, das Verhalten von Antibiotika vollständig abzuschätzen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wurden aber zumindest einige Risikofelder des jeweiligen Antibiotikums aufgezeigt, wie z. B. die Adsorption des Ofloxacin an den Belebtschlamm und damit verbundene Anreicherung der Substanz in der Umwelt oder die Stabilität des Trimethoprim und Sulfamethoxazols sowie eine unzureichende Testdauer bei dem Respirationshemmtest usw.

Im kommunalen Abwasser sind für einige Substanzen Konzentrationen zu erwarten, die die Reinigungsleistung der biologischen Reinigungsstufe kommunaler Kläranlagen beeinträchtigen können. Selbst wenn die Wirksubstanzen zum großen Teil durch Adsorption bei der Abwasserreinigung eliminiert würden, sind für einige Substanzen wie Ciprofloxacin oder Benzylpenicillin (Penicillin G) Effekte auf Bakterien im Oberflächenwasser nicht auszuschließen (Wiethan et al. 2000). Da im Oberflächenwasser die Bakteriendichte relativ niedrig ist, ist somit eine Reduzierung der Selbstreinigungskräfte von Oberflächengewässern und eine negative Beeinträchtigung aquatischer Lebensgemeinschaften wahrscheinlich. Im Fall der Oberflächengewässer ist zu berücksichtigen, dass auch ein Eintrag von über die Gülle in die Umwelt eingebrachten Wirkstoffen durch Abspülung von Bodenoberflächen nach Regenereignissen möglich ist und zu einer Erhöhung der Gesamtkonzentration an Antibiotika füh-

ren kann. Ein Durchbruch ins Grundwasser wurde erstmal von Hirsch et al. (1999) (Nachweis von Sulfamethoxazol und Sulfamethazin) und Sacher et al. (2001) bestätigt (Beprobung von 105 Grundwasserquellen in Baden-Württemberg, nachgewiesene Antibiotika: Sulfadiazin, Sulfadimidin, Sulfamethoxazol, Ronidazol, Dapson, Roxithromycin, Dehydr.-Erythromycin).

Aus allen diesen Gründen lassen sich folgende Forderungen ableiten:

1. dem Vorsorgeprinzip folgend, den Einsatz von Wirkstoffen auf wesentliche und therapeutisch sinnvolle Bereiche einschränken, auch aus Resistenzgründen,
2. Verbesserung der Datenlage über das Verhalten solcher Stoffe (Lebensweg) und
3. stärkere Einbeziehung der Berücksichtigung der Umwelteigenschaften von Antibiotika bei dem Zulassungsverfahren bzw. bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe.

Die gewonnenen Ergebnisse über Antibiotika im Detail sind im Anhang in Stoffdossiers übersichtlich dokumentiert. Dabei wurde versucht, die jeweiligen Risikofelder der Antibiotika hervorzuheben.

4 BEWERTUNG

Eintrag und Nachweis von Antibiotika in der aquatischen Umwelt

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Forschungsvorhabens zusammenfassend bewertet. Details finden sich in Kapitel 4. Die Ergebnisse der Analytik befinden sich in Kapitel 3.

Bilanzierung und Umweltkonzentrationen der Antibiotika in Kenzingen

- Es werden lokal (Kenzingen) und bundesweit nahezu einheitlich v.a. Penicilline, Sulfonamide, Makrolide und Cephalosporine verordnet.
- Der Verbrauch in Kenzingen (pro Person ca. 2,6 g/a) ist geringer als bundesweit (ca. 5,1 g/a und Person). Dies deutet auf Reduktionspotentiale hin.
- Es wurden 12 Antibiotika im Zulauf, Ablauf, Belebtschlamm und Überschussschlamm der Kläranlage Kenzingen nachgewiesen. Auffällig war, dass keine Penicilline im Zulauf nachgewiesen werden konnten.
- Die bilanzierten Werte stimmen größenordnungsmäßig mit den gemessenen Werten überein. Bilanzierungen können daher die Messprogramme z. T. ersetzen oder zumindest ergänzen.

Analytik

- Es wurden geeignete Analysen- und Extraktionsmethoden zur quantitativen Bestimmung unterschiedlicher Antibiotika in wässriger Phase entwickelt und validiert. Bestimmung von 14 der 18 Substanzen möglich (außer: Ceftriaxon, Gentamycin, Imipenem und Monensin). Diese Antibiotika sind so instabil, dass sie unter üblichen Laborbedingungen nicht oder nicht quantitativ analysiert werden können.
- Für feste Matrices wurde ein operationell definiertes Extraktionsverfahren angewendet. Mit dieser halbquantitativen Methode können die Substanzen nicht vollständig extrahiert werden und für β -Lactame eignet sie sich überhaupt nicht.
- Mit Hilfe der stoffspezifischen Analytik der ausgewählten Wirkstoffe kann allerdings nur die Primärelimination eines Wirkstoffs z. B. in einem Abbautest oder in einer realen Kläranlage verfolgt werden. Es kann nicht unterschieden werden, ob eine Zielsubstanz lediglich durch Primärabbau, Sorption oder Metabolisierung eliminiert wird oder ob ein vollständiger Abbau stattgefunden hat.

Um diese Unterscheidung treffen zu können, wurde im Projektverbund der Abbau von drei ausgewählten Verbindungen anhand von ^{14}C -markierten Substanzen im Modellkläranlagenversuch verfolgt (s. u.).

- Die Untersuchungen im niedrigen Konzentrationsbereich ($\mu\text{g/l}$) haben gezeigt, dass für eine ganze Reihe von Antibiotika der abiotische Abbau und/oder Adsorption an Klärschlamm wichtige Eliminationsmechanismen darstellen.

Verhalten, Abbau und Eliminierung von Antibiotika

Closed Bottle Test (OECD 301 D)

- Alle 18 untersuchten Substanzen erwiesen sich als nicht *leicht biologisch* („*not readily biodegradable*“) *abbaubar*. Eine höhere Abbaubarkeit um 13 bis 27% wurde bei Benzylpenicillin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim mit leicht abbaubaren Natriumacetat beobachtet.
- Abiotische Elimination (Bestimmung von 10 Substanzen in mg/l Konzentrationsbereich mittels HPLC): Benzylpenicillin und Chlortetracyclin wurden vollständig eliminiert, Sulfamethoxazol und Trimethoprim erwiesen sich als stabil, die restlichen 6 untersuchten Antibiotika wurden teilweise eliminiert.

Kombinationstest

- Der im Rahmen des Projektes etablierte Kombinationstest auf Basis des Zahn-Wellens-Tests (OECD 302 B) und des Sturm-Tests (CO_2 -Entwicklungstest, OECD 301 B) ist ein geeignetes Testsystem zur Bestimmung der inhärenten Endabbaubarkeit und Elimination von Substanzen.
- Mit diesem Versuchsdesign lassen sich auch bei Belebtschlammkonzentrationen von 200 mg TS/l die Mineralisierung zu Kohlendioxid sowie der über Adsorption eliminierte Anteil anhand IC/DOC-Analytik parallel bestimmen.
- Von den 16 getesteten Antibiotika erwies sich ausschließlich Benzylpenicillin, das einzige untersuchte natürliche Penicillin, als vollständig mineralisierbar. Ansonsten wurde lediglich bei Amoxicillin sowie (mit Einschränkung) bei Imipenem (38,3 bzw. 23,6%) eine gewisse inhärente Abbaubarkeit bestimmt.
- Trotz der hohen Prüfkonzentration von 100 mg TOC/l war der Abbau in den Hemmkontrollen durch kein Antibiotikum vollständig unterbunden. Bei Gentamycin, Imipenem, Tetracyclin und Vancomycin ist jedoch eine Beeinflussung der biologischen Abbaubarkeit durch eine Hemmung des Inokulums nicht auszuschließen. Die in den Hauptversuchen erreichte Reduzierung der CO_2 -

Entwicklung in den Blindwertansätzen sowie die sehr gute Reproduzierbarkeit in den Parallelansätzen lässt noch etwas Spielraum für eine Reduktion der Prüfkonzentration erkennen. Anhand der DOC-Elimination kann erwartet werden, dass ein Großteil (37-100%) der Substanzmengen von Chlortetracyclin, Gentamycin, Nystatin und Ofloxacin adsorptiv gebunden und mit dem Überschussschlamm eliminiert werden.

Anaerobe Abbaubarkeit

- Bei den neun untersuchten Testsubstanzen konnte kein nennenswerter anaerober Abbau festgestellt werden.
- Bei diesem Test ist eine gewisse Mindestkonzentration der Testsubstanz (100 mg/l) für die Faulgasbestimmung nötig.
- Hemmwirkungen durch die eingesetzten Antibiotika wurden im niedrigen Konzentrationsbereich nicht beobachtet. Somit gibt es aus den hier durchgeführten Untersuchungen keine Hinweise, dass die in den Kläranlagen auftretenden Spurenkonzentrationen zu einer Beeinträchtigung der Reinigungsleistung führen können.
- Unter den Versuchsbedingungen der EN ISO 11734 z. T. zeigen deutliche Hemmwirkungen in den mitgeführten Hemmkontrollen, dass eine negative Beeinflussung des anaeroben Abbaus vermutet werden kann. Durch eine Reduzierung der Prüfkonzentration könnten die Hemmungen zwar reduziert werden, allerdings würde dann der Anteil der Blindwerte an den eigentlichen Messungen erhöht und die Auswertung über die Differenzbildung ungenauer. Die Testansätze und Adsorptionskontrollen von Nystatin, Gentamycin und Monensin zeigen, bedingt durch Adsorptionseffekte, eine DOC-Elimination über 50%. Demgegenüber werden Ofloxacin bzw. Chlortetracyclin zu lediglich 10-40% eliminiert, während für Vancomycin praktisch keine Elimination beobachtet wurde.

Kläranlagensimulationstest

Elimination der Testsubstanz

- Es konnte keine Beeinflussung der Reinigungsleistung (DOC-Elimination) durch Antibiotika festgestellt werden.
- Unterschiedlicher (Primär-) Eliminierungsgrad der Antibiotika war erkennbar (stoffspezifische Analytik).

Populationsdynamik

- Vorteile der FISH-Methodik sind neben der in-situ Analyse, die Möglichkeit Bakteriengruppen bzw. –klassen mit spezifischen Gensonden zu untersuchen, wodurch eine bessere Differenzierung gegeben ist. Zudem lassen sich die Anteile der differenzierten Gattungen auf die Gesamtpopulation beziehen. Bei der chemotaxonomischen Untersuchung mit Chinonen und Polyaminen als Biomarker werden ausschließlich prozentuelle Veränderungen innerhalb einer Markergruppe (z. B. Ubi-, Menachinone, Polyamine) detektiert.
- Es ist fraglich, ob bei den zum Teil sehr geringen Veränderungen (1-2%) in der FISH Untersuchung bereits von einem Einfluss des Antibiotikums ausgegangen werden kann, oder ob es sich dabei um die natürliche Streubreite biologischer Untersuchungen handelt. Weiter wurden bei der Untersuchung mit Gensonden eine sehr geringe Anzahl Proben pro Messreihe (n = 3) untersucht. Alle Veränderungen in der Zusammensetzung der Population beziehen sich auf die Kontrollkläranlage. Da keine parallel betriebenen Kontrollanlagen untersucht wurden, ist unklar ob innerhalb dieser Abweichungen vorhanden waren, wodurch ein Einfluss des Antibiotikums weiter ausgeschlossen werden könnte.

a) *Chemotaxonomie*

- Populationsdynamiken waren vorhanden, die allerdings keinen signifikanten Einfluss durch Antibiotika erkennen lassen.

Stat. Auswertung

- Einfache statistische Auswertung ergibt teilweise Einflüsse der Antibiotika auf die Bakterienzusammensetzung. Versuche mit zwei Kontrollanlagen deuten aber darauf hin, dass sich die Bakterienpopulationen unabhängig von der Zugabe von Testsubstanzen unterschiedlich entwickeln. Der Einfluss von Antibiotika ist also fragwürdig.

b) *FISH*

- Es wurden bestimmte für Antibiotika sensitive Bakteriengruppen ermittelt und quantifiziert. Über den Versuchszeitraum wurde aber niemals eine der Bakterienhauptgruppen gänzlich aus der Bakterienzönose eliminiert.
- Die FISH Untersuchung deutet teilweise Populationsdynamiken durch die Zugabe von Antibiotikum auf. Das Antibiotikum, welches die deutlichsten Effekte bewirkte, war Metronidazol (wirkt gegen Anaerobier). Da sich alle Populati-

onsdynamiken auf eine parallel betriebene Kontrollanlage beziehen und keine zwei parallel betriebenen Kontrollanlagen mit FISH untersucht wurden, ist keine klare Aussage bezüglich des Einflusses der Antibiotika möglich. Die Biomarkeranalyse sowie die darauf basierende statistische Auswertung zeigen keinen signifikanten Einfluss durch die Testsubstanz. Dies wird vor allem durch den parallelen Betrieb zweier Kontrollkläranlagen deutlich. Ob ein tatsächlicher Einfluss durch Antibiotikum gegeben ist, ist schwer einzuschätzen, da potentielle Effekte bei der Biomarkeranalyse leicht überdeckt werden können.

Kläranslagensimulationstest mit radioaktiv markierten Substanzen

- Die Laborkläranlage erwies sich in der modifizierten Form (geschlossenes System) als gut geeignet für die Durchführung von Abbauprüfungen mit radioaktiv (^{14}C -)markierten Testsubstanzen im niedrigen Konzentrationsbereich.
- Der Betrieb mit radioaktiv markierten Substanzen ermöglicht es, unterschiedliches Verhalten von Antibiotika in Kläranlagen zu erkennen, z. B. Adsorption, Akkumulation, Mineralisierung.
- Die Ergebnisse mit Benzylpenicillin zeigen eine Mineralisation von ca. 25%, wobei fast 60% der zudosierten Radioaktivität die Anlage wieder über den Ablauf verließen. Eine Differenzierung zwischen der Prüfsubstanz Benzylpenicillin und eventuellen Abbauprodukten wurde nicht vorgenommen.
- Bei Ceftriaxon wurden 0,4% und bei Trimethoprim 0,02% zu $^{14}\text{CO}_2$ mineralisiert. Demnach würde nahezu die gesamte Testsubstanz in die Oberflächengewässer gelangen. Für Trimethoprim konnte dies durch eine stoffspezifische Analytik der Ablaufproben gezeigt werden. Metabolite wurden nicht nachgewiesen.
- Die stark ansteigenden Radioaktivitäten im Belebtschlamm (vor allem bei Benzylpenicillin) lassen die Frage aufheben, ob ansteigende Antibiotikakonzentrationen im Belebtschlamm die Ursache für die Anreicherung von antibiotika-resistenten pathogenen Mikroorganismen in Kläranlagen sind.

Licht- und Temperaturempfindlichkeitstest, Adsorption

- Es wurde die Foto- und Thermostabilität 10 unterschiedlicher Substanzen in einem einfachen Testsystem überprüft. Die Antibiotika Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Vancomycin erwiesen sich als vollständig stabil. Generell lie-

gen die Halbwertszeiten bei den Substanzen zu hoch (>11 d), um mit einem foto- bzw. thermolytischen Abbau in Kläranlagen rechnen zu können.

Insgesamt ist festzustellen, dass bis auf einige Ausnahmen (z. B. Benzylpenicillin) die untersuchten Wirkstoffe einem biologischen Abbau in den benutzten Testsystemen nicht zugänglich sind.

Wirkung von Antibiotika auf Bakterien

Closed Bottle Test (KBE und Toxizitätskontrolle)

- Eine Toxizität lag nach der Testvorschrift bei keiner der untersuchten Substanz vor.
- Ein signifikanter Hinweis auf Toxizität (Abweichung um mind. einer log-Stufe bei der Gesamtkeimzahlbestimmung) wurde im Bereich mg/l bei Cefuroxim und Imipenem beobachtet sowie bei Ceftriaxon, Chlortetracyclin, Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin, Gentamycin, Metronidazol, Monensin, Nystatin und Trimethoprim in beiden Konzentrationen (µg/l und mg/l).

Wachstumshemmtest

- Es wurde Wachstumshemmung durch 17 Antibiotika (Ausnahme Nystatin - Antimykotikum) gemäß dem Wachstumshemmtest EN ISO 10712 : 1995 mit dem gramnegativen Keim *Ps. putida* bestimmt und nach Modifikation des Wachstumshemmtests mit dem grampositiven Keim *E. faecalis* durchgeführt.
- Die Modifikation zeigte, dass eine Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen Gattungen und Arten nicht möglich ist. Generell erwies sich der Keim *E. faecalis* gegenüber den 18 Antibiotika empfindlicher als der Keim *Ps. putida*, ausgenommen bei Ceftriaxon und Sulfamethoxazol. Dies stimmt mit den Wirkungsspektren der Antibiotika überein.

Respirationshemmtest

- Eine Modifikation des Testsystems ist notwendig. Durch die Verlängerung der Inkubationsdauer ergaben sich teilweise deutlich niedrigere Effektkonzentrationen (1-10 bzw. 10-100 mg/l statt >100 mg/l). Nicht alle Antibiotika zeigten einen Effekt.

Nitrifikationshemmtest

- Eine Modifikation des Tests ist erforderlich. Die Auswertung sollte nach dem DIN-Verfahren fotometrisch erfolgen, wobei es bei Antibiotika zur Verfälschung der Farbreaktion kommt. Deswegen wurde die Messung der Stick-

stoffkonzentrationen erst mittels Ionenchromatografie ohne positive Ergebnisse durchgeführt. Anschließend durch Verlängerung der Inkubationsdauer sowie Bestimmung mittels FISH, war eine bessere Korrelation der Dosis-Wirkungsbeziehung erkennbar.

Anaerober Hemmtest

- Der Entwurf der ISO-Prüfvorschrift 13641 zur Bestimmung der anaeroben Hemmwirkung weist noch Mängel auf. Die vorgeschlagenen Anpassungen bezüglich der Schlammkonzentration scheinen geeignet, einen direkten Bezug zum anaeroben Abbautest herzustellen und die anaerobe Hemmwirkung zu beschreiben. Dennoch war die Reproduzierbarkeit der EC_{50} -Werte für die Referenzsubstanz 3,4-Dichlophenol noch unbefriedigend. Die Ergebnisse der anaeroben Hemmtests ließen erwarten, dass ein Großteil der Antibiotika auf ihre anaerobe Abbaubarkeit nach EN ISO 11734 hin untersucht werden kann. Es zeigte sich jedoch, dass bei einigen Antibiotika deutliche Effekte in den Hemmkontrollen zu beobachten waren, die teilweise nicht in den anaeroben Hemmtests vorhergesagt wurden.
- Bei der Prüfung von 15 Testsubstanzen ($c = \max. 100 \text{ mg/g TS}$) zeigten Ceftriaxon, Clindamycin, Chlortetracyclin, Gentamycin, Imipenem, Ofloxacin und Tetracyclin eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung. Metronidazol und Monepsin zeigten entsprechend ihrem Wirkspektrum starke Hemmwirkung gegenüber Faulschlamm. Die übrigen Substanzen (Amoxicillin, Benzylpenicillin, Cefuroxim, Erythromycin, Nystatin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim) zeigen bis 100 mg/g TS Prüfkonzentration keine oder nur geringe Hemmwirkungen.

Es zeigte sich also, dass die vorhandenen, standardisierten Tests zur Prüfung der Hemmwirkung von Antibiotika auf Belebtschlamm meist nicht unverändert benutzt werden können. Die durchgeführten und vorgeschlagenen Modifikationen verbesserten die Situation deutlich.

Modellierung und Risikobewertung

Statistische Methoden für die EC_x -Berechnung

- Mit dem Vergleich der vier mathematischen Auswertungsverfahren (Probitmodell, Logistische Regression mit zwei bzw. drei Parametern und Gompertzmodell) für die EC_x -Berechnung wurde veranschaulicht, dass das Probitmodell

das Umweltrisiko einer Substanz unterschätzen kann und nur für die Berechnung des EC_{50} -Wertes bei einer symmetrischen Datenverteilung geeignet ist. In allen anderen Fällen werden die Werte unter- oder überschätzt. Die Logistische Regression mit zwei bzw. drei Parametern wäre ein besserer Ansatz für die EC_x -Bestimmung.

Modellierung

- Bemerkenswert ist zunächst die gute Übereinstimmung der Kläranlagenabfluss-, Oberflächenwasser- und Sedimentkonzentrationen der beiden Modelle EUSES und EMEA. Die errechneten Konzentrationen für Substanzen mit hohen Produktionsmengen (z. B. Amoxicillin 550 t/a; Sulfamethoxazol 245 t/a) liegen in Oberflächengewässern im Bereich von einigen hundert ng/l bis einigen $\mu\text{g/l}$. Diese Substanzen erreichen auch einige $\mu\text{g/kg}$ TS im Sediment. Um eine Zehnerpotenz höher liegen die Sedimentkonzentrationen bei Stoffen mit hoher Affinität zu organischem Material (z. B. Monensin), wobei die Konzentrationen in der Wasserphase unter 1 $\mu\text{g/l}$ liegen (angenommene Produktionsmenge hier 50 t/a). Teilweise kam es zu Modellierungsproblemen aufgrund der Datenbasis (z. B. unterschiedliches Umweltverhalten von ionisierter und nicht ionisierter Substanz).
- Beide Modelle haben das gleiche Ausgangsproblem, nämlich die Produktions- bzw. Verbrauchsmenge [t/a] in den Kläranlageneintrag [g/l] umzurechnen. Obwohl hierfür verschiedene Rechenwege gegangen wurden, unterscheidet sich die Komplexität bei den beiden Modellen doch nicht sehr. EUSES hat bei der Simulation der Kläranlage eine deutlich höhere Komplexität (Verwendung des Moduls SimpleTreat), was sich jedoch nicht auswirkt. Eine Sensitivitätsanalyse bei EUSES zeigt, dass sich das Modell bei Veränderungen der wichtigen Parameter linear verhält. Hiervon ausgenommen ist die Wasserlöslichkeit, deren Einfluss jedoch insgesamt gering bleibt.
- 13 der 18 untersuchten Stoffe (außer: Benzylpenicillin, Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin und Monensin) besitzen gute Wasserlöslichkeit und nur 4 einen $\log P_{ow}$ (kalkuliert) deutlich über +1 (Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin und Monensin), was bedeutet, dass diese Substanzen nur geringe Tendenz besitzen sich ins Sediment zu verlagern und somit Adsorption als Eliminierungspfad aus der Wasserphase von untergeordneter Bedeutung ist.

- Ein Vergleich mit analytischen Messdaten aus dem Vorhaben ist für einige Stoffe im Kläranlagenabfluss möglich. Es zeigt sich, dass die berechneten Werte (hier nur für EUSES und EMEA) um bis zum Faktor 10 höher liegen. Aus der Sicht der Risikoabschätzung ist dies akzeptabel, da die Berechnung stets eine "worst-case" darstellen soll.
- Insgesamt ergeben sich bei der Modellierung in Bezug auf die Qualität der Produktionsdaten, der Unsicherheit im Umgang mit verschiedenen Formen der Substanzen und die Einschränkungen bei der Abschätzung der Adsorptionseigenschaften, neben weiteren Faktoren, so große Unsicherheiten, dass diese Modelle für eine realitätsgerechte Modellierung des Umweltverhaltens nicht geeignet erscheinen. Die Modelle sind zu generell, als dass sie die spezielle Situation der Kläranlagenpassage genau erfassen würden. Andererseits verarbeiten die Modelle die Grunddaten ausreichend genug, um geschätzte Umweltkonzentrationen (predicted environmental concentrations, PECs) zu berechnen, die in einer Risikoabschätzung verwendet werden können.

Identifizierte Risikofelder (Risikobewertung)

- Es hat sich gezeigt, dass ein Großteil der Antibiotika sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen in den Tests nicht biologisch abgebaut wurde. Teilweise kann mit einer photochemischen oder hydrolytischen bzw. thermolytischen Inaktivierung, wie beispielsweise bei den β -Lactamen gerechnet werden. Dies gilt jedoch nur für die Minderheit der untersuchten Stoffe. Einige Stoffe, wie Fluorchinolone und Makrolide neigen stark zur Adsorption.
- Insgesamt lässt sich festhalten, dass die üblicherweise verwendeten standardisierten Tests zur Prüfung des Abbaus von Antibiotika in Kläranlagen, wie auch die zur Erfassung der Auswirkungen von Antibiotika auf Bakterien in der Umwelt nicht ohne weiteres direkt verwendet werden können. Vielmehr sind Modifikationen notwendig, wie z. B. Ergänzung des Wachstumshemmtests mit einem grampositivem Bakterium, Verlängerung des Respirationshemmtests von einer halben auf 24 Stunden. Beim Nitrifikationshemmtest konnten die Ursachen für die unzureichende Validität der Testergebnisse noch nicht endgültig geklärt werden. Hier wäre ebenso weiterer Forschungsbedarf zu formulieren.
- Die Wirkttests lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die die eine einzelne Spezies oder Stamm an Bakterien verwenden (Wachstumshemmtest) und

diejenigen, die ein komplexes Inokulum verwenden. Im Fall der letzteren kann aufgrund der unterschiedlichen Wirkspektren und Aktivitätsschwellen der einzelnen Stoffe sowie gegebenenfalls dem Vorhandensein resistenter Bakterien das Testergebnis sehr stark beeinflusst und verfälscht werden. Andererseits werden mit den Tests mit Einzelspezies eben nur die Wirkungen auf diese einzelne Spezies erfasst, was bei Bakterien insofern kritisch ist, als etwa 90% der Bakterien in der Umwelt unbekannt sind im Sinne von kultivierbar und genau beschrieben. Daher ist zu empfehlen, dass stets beide Typen von Tests angewendet werden bei der Untersuchung von antibakteriellen Substanzen. Dabei sind jeweils das Wirkspektrum der Substanz und seine physikalisch-chemische sowie biologische Stabilität in Betracht zu ziehen.

- Aufgrund der komplexen chemischen Struktur der Antibiotika und ihrer im Allgemeinen hohen Polarität und Grundwasserlöslichkeit sind sie schwierig zu analysieren. Zu dem neigen einige Stoffe zur Adsorption, was ihre Handhabbarkeit sowohl bei Tests als auch für die Analytik in niedrigen Konzentrationen erschwert. Dies zeigte sich vor allem bei dem Ansetzen von Tests in realistischen Konzentrationen, d. h. im Konzentrationsbereich $\mu\text{g/l}$ sowie in der Bestimmung der Substanzen aus Belebtschlamm. Im letzteren Fall ist insbesondere unklar, in welchem Umfang die Wirkstoffe nach Sorption noch aktiv bzw. remobilisierbar sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Antibiotika gehören zu den wichtigsten Wirkstoffgruppen, die in der Medizin Anwendung finden. Obwohl die Arzneimittelwirkstoffe beginnend mit den 70er Jahren und dann hauptsächlich in den 90er Jahren als persistente, d. h. stabile und zum Teil wirksame Verbindungen in der Umwelt erkannt wurden, liegen zur ökotoxikologischen Bewertung von Antibiotika wie auch anderen Arzneimitteln kaum Daten vor.

Es wurde daher aufbauend auf ersten Vorarbeiten zunächst eine exakte Bilanzierung der Verbrauchsdaten von Antibiotika in der Kleinstadt Kenzingen durchgeführt, um die Eliminationsraten genauer zu beleuchten. Diese Daten wurden mit gemessenen Zulauf-, Ablauf-, Belebtschlamm- und Überschussschlammkonzentrationen der Kläranlage Kenzingen verifiziert. Hierfür wurden geeignete Methoden zur Bestimmung von Antibiotika in Umweltmatrices entwickelt und validiert. Damit konnte die Abbauleistung einer mit Antibiotika durchschnittlich belasteten kommunalen Kläranlage festgestellt werden. Die biologische Abbaubarkeit und Elimination von 18 Antibiotika, die repräsentativ aus den wichtigsten Antibiotikagruppen der Human- und Veterinärmedizin ausgewählt wurden, wurde mit verschiedenen z. T. standardisierten Testsystemen (Closed Bottle Test, Primärelimination im CBT, Kläranlagensimulationstest mit und ohne radioaktiv markierten Substanzen, Licht- und Temperaturempfindlichkeit, Adsorption, inhärente sowie anaerobe Abbaubarkeit) im Labormaßstab untersucht. Potenzielle Populationsdynamiken aufgrund von Exposition mit Antibiotika wurden mittels Biomarkeranalyse untersucht und statistisch ausgewertet. Begleitend hierzu wurden FISH-Untersuchungen durchgeführt, um detaillierte Aussagen über die Zusammensetzung der Bakterienpopulation im Belebtschlamm zu erzielen. Die Toxizität der Wirkstoffe gegen aquatische Bakterien wurde mit unterschiedlichen Methoden wie Bestimmung der koloniebildenden Einheiten, Wachstumshemmtest mit *Ps. putida* und *E. faecalis*, Respirationshemmtest, Nitrifikationshemmtest und anaerober Hemmtest erfasst. Zudem wurde das von der EU vorgegebene Auswertungsverfahren für EC_{x-} Bestimmung (Probitmodell) mit drei unterschiedlichen Methoden verglichen. Des Weiteren wurden die im Technical Guidance Documents vorgeschlagenen Sicherheitsfaktoren kritisch hinterfragt und auf die Situation für die $PNEC_{\text{micro-organism}}$ Berechnung angepasst. Anschließend wurde eine PEC/PNEC-Risikoanalyse durchgeführt sowie eine Umweltrisikoaabschätzung mittels computerunterstützter Modellierung.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Durch die Kombination von Bilanzierung und Analytik konnten verlässliche Daten über den Verbrauch und Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt erhalten werden.
- Für alle 18 in diesem Projekt zu bearbeitenden Stoffe wurden Referenzverbindungen für die Entwicklung spurenanalytischer Methoden beschafft. Die durchgeführten Arbeiten zeigen, dass sich grundsätzlich alle Zielverbindungen mit Hilfe der massenspektrometrischen Detektion nach Elektrospray-Ionisierung im Positiv-Ionen-Modus und Stoßfragmentierung (ESI-MS-MS-Technik, MRM (Multiple Reaction Monitoring)) erfassen lassen.
- Es wurden drei Fest-Flüssig-Extraktionsverfahren erarbeitet, mit denen in Kombination mit sieben verschiedenen HPLC-ESI-MS-MS-Methoden strukturell sehr unterschiedliche Antibiotika-Wirkstoffe aus der wässrigen Phase quantitativ bestimmt werden können.
- Im Rahmen der internen Qualitätssicherung wurden die erarbeiteten Methoden einer Grundvalidierung unterworfen und es wurden ergänzende Matrixuntersuchungen durchgeführt. Da sich ein Großteil der Wirkstoffe mit einer bewusst unselektiv gewählten Extraktionsmethode erfassen lässt, ergab sich für die getesteten Verbindungen eine große Bandbreite für die Wiederfindungsraten. Dieser Nachteil wurde in Kauf genommen, da die Empfindlichkeit der Messung für umweltrelevante Konzentrationen im ng/l-Bereich ausreicht und aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Extraktion quantitative Messungen möglich sind.
- Als Maßnahmen zur Minimierung und Kompensation von Matrixeffekten wurden die analysierten Abwasserproben sowie die Testansätze mit der Kalibriermatrix Trinkwasser verdünnt und die Konzentrationsbestimmungen erfolgten anhand einer externen Kalibrierung über das Gesamtverfahren aus einer analog den Messproben verdünnten Matrix. Im Falle einiger realer Kläranlagenproben wurde das Standardadditionsverfahren angewendet.
- In einem bundesweiten Arzneimittel-Ringversuch im Juni 2000 erhielt das TZW-Labor für alle sieben Wirkstoffe aus der Gruppe der Antibiotika-Wirkstoffe, die in vier verschiedenen Matrices zu bestimmen waren die Bewertung "bestanden". Darunter befanden sich auch ein kommunaler Kläranlagenablauf sowie ein aufgestockter kommunaler Kläranlagenablauf. Dieses Ergeb-

nis unterstreicht die Anwendbarkeit der erarbeiteten Methodik auf reale Proben, insbesondere auch Abwasserproben.

- Für feste Matrices, insbesondere für Klärschlämme wurde ein operationell definiertes Extraktionsverfahren angewendet. Es zeigte sich, dass eine Reihe von Wirkstoffen partiell an Klärschlamm adsorbieren. Eine Massenbilanz ist allerdings aufgrund dieses Verfahrens nicht möglich, da es sich um ein Konventionsverfahren handelt, mit dem der unter den Bedingungen der Extraktion auslaugbare Anteil des Wirkstoffs, jedoch nicht notwendigerweise der Gesamtgehalt erfasst wird. Am Beispiel der Stoffklasse der Fluorchinolone konnte kürzlich gezeigt werden, dass unter drastischeren Extraktionsbedingungen, z. B. durch Erhöhung der Säurestärke des Extraktionsmittels, erheblich größere Gehalte an adsorbierten Antibiotika-Wirkstoffen ermittelt werden können. Solche drastischeren Bedingungen sind allerdings nur auf wenige, chemisch sehr stabile Wirkstoffe anwendbar, womit der analytischen Methodenentwicklung hier enge Grenzen gesetzt sind.
- Von den untersuchten Antibiotika / Antimykotika erwiesen sich alle als nicht leicht biologisch abbaubar (CBT). Die im kommunalen Abwasser zu erwartenden Konzentrationen sind bei einzelnen Wirkstoffen im Bereich der MHK_{50} für empfindliche pathogene Bakterien. Eine Beeinträchtigung der biologischen Abwasserreinigung ist daher nicht auszuschließen. Durch den Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt ist ein Beitrag zur zunehmend beobachteten Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika möglich. Zur endgültigen Beantwortung dieser Fragen sind jedoch weitere umfangreiche Untersuchungen notwendig.
- Im Rahmen des Verbundvorhabens wurde ein Kombinationsabbautest auf Basis des Sturm-Tests (OECD 301 B) und des Zahn-Wellens-Tests (OECD 302 B) optimiert. Insgesamt wurden 16 Antibiotika getestet. Benzylpenicillin erwies sich als vollständig mineralisierbar. Ansonsten wurde lediglich für Amoxicillin nach einer lag-Phase von 14 Tagen ein gewisser Abbau bestimmt (bis 60%). Tetracyclin-HCl zeigte im Kombinationstest eine für Abbauprozesse typische DOC-Eliminationskurve, die jedoch nicht durch die CO_2 -Entwicklung erklärt werden konnte. Diese Substanz würde bei alleiniger Betrachtung der DOC-Elimination fälschlicherweise als biologisch abbaubar eingestuft werden. Umgekehrt nimmt die DOC-Elimination von Nystatin aufgrund der Hydrolyse

ab. Bei einigen Antibiotika (u.a. Gentamycin-Sulfat) wurden in parallelen Kontrollen Hemmeffekte bestimmt, die den biologischen Abbau negativ beeinflussen können. Die übrigen Antibiotika sind als nicht inhärent abbaubar einzustufen.

- Insgesamt 15 Antibiotika wurden auf ihre anaerobe Hemmwirkung untersucht. Hierzu wurde, ausgehend vom Methodenentwurf ISO/DIS 1361, die Gasentwicklung beim anaeroben Abbau von Hefeextrakt über 7 Tage in Anwesenheit einer Konzentrationsreihe der Antibiotika (bis zu 100 mg/g TS) bestimmt. Als Inokulum diente Faulschlamm der Kläranlage Wyhl (1 g TS/l). Eine klare Dosis-Wirkungsbeziehung zeigten Ceftriaxon, Clindamycin, Chlortetracyclin, Gentamycin, Imipenem, Ofloxacin und Tetracyclin, deren EC50-Werte zwischen 24 und 282 mg/g TS lagen. Oftmals wurden jedoch sehr flache Dosis-Wirkungsbeziehungen gefunden. Metronidazol und Monensin zeigten im gesamten getesteten Konzentrationsbereich von 6 bis 100 mg/g TS eine starke Hemmwirkung gegen den Faulschlamm (65-83%). Andere Antibiotika wie Amoxicillin, Benzylpenicillin, Cefuroxim, Erythromycin, Nystatin, Sulfamethoxazol und Trimethoprim zeigten bis 100 mg/g TS Prüfkonzentration keine oder nur geringe Hemmwirkungen.
- Bei 9 Antibiotika wurde die anaerobe Abbaubarkeit nach EN ISO 11734 bestimmt. Die Faulschlammkonzentration wurde wiederum auf 1 g TS/l, die Antibiotikakonzentration auf 100 mg C/l festgelegt. Zusätzlich wurden Hemm- und Adsorptionskontrollen angesetzt und neben der Gasentwicklung auch die DOC-Elimination bestimmt. Innerhalb des Versuchszeitraumes von rd. 60 Tagen wurde keines der untersuchten Antibiotika anaerob nennenswert abgebaut. Lediglich Benzylpenicillin zeigte nach einer lag-Phase von 40 Tagen eine gewisse Abbaubarkeit, die jedoch in ein Plateau von rd. 20% Abbau mündete. Die Referenzsubstanz Natriumbenzoat wurde hingegen in allen drei Versuchen vollständig abgebaut. Mit Ausnahme von Sulfamethoxazol und Nystatin zeigen alle Antibiotika eine deutliche Hemmwirkung auf das Inokulum, so dass in den Hemmkontrollen von Chlortetracyclin und Monensin negative Abbauraten bestimmt wurden. Auch in den Hemmkontrollen von Amoxicillin und Benzylpenicillin fand der Abbau erst nach einer deutlichen lag-Phase von rd. 40 Tagen statt, so dass eine Hemmwirkung für die Anfangsphase nicht ausgeschlossen werden kann. Die Referenzsubstanz Natriumbenzoat wurde

in allen Versuchen zu über 80%, bezogen auf das Faulgasvolumen und zu über 90% bezogen auf die DOC-Elimination abgebaut. Die DOC-Werte bestätigen im Wesentlichen die Faulgasmessungen. Zudem wurde anhand der DOC-Messungen gezeigt, dass sowohl in den Testansätzen als auch in den Adsorptionskontrollen von Nystatin, Gentamycin und Monensin über 50% des TOC adsorptiv eliminiert wurden. Demgegenüber wurden Ofloxacin bzw. Chlortetracyclin zu lediglich 10-40% und Vancomycin praktisch nicht eliminiert.

- Der anhand 11 unterschiedlicher Antibiotika durchgeführte Kläranlagensimulationsversuch zeigte keine negative Beeinträchtigung der biologischen Reinigungsleistung (DOC-Eliminierung) durch Zudosierung der Testsubstanz. Die im Rahmen des Modellkläranlagenversuches durchgeführten chemotaxonomischen Untersuchungen (Polyamine und Chinone als Biomarker) ließen ebenfalls keinen Einfluss der zudosierten Antibiotika auf Populationsdynamiken erkennen. Die begleitende stoffspezifische Analytik zeigte, dass die einzelnen Antibiotika teilweise unterschiedliches Umweltverhalten aufweisen.
- Die Auswertung der chemotaxonomischen Daten ergab zwar Einflüsse der Antibiotika auf die Veränderung dieser Variablen. Allerdings deuten die Ergebnisse aus den Versuchen mit mehr als einer Kontrolle darauf hin, dass die Bakterienpopulationen in Versuchskläranlagen sich nach der Einfahrphase unabhängig von der Zugabe von Testsubstanzen unterschiedlich entwickeln. Diese Beobachtung macht die gefundenen Einflüsse der Antibiotika sehr fragwürdig, da sich nicht sagen lässt, ob die beobachteten Veränderungen auf den Wirkstoff zurückgehen oder ihre Ursache in der generell großen Dynamik der Entwicklung in einer komplexen biologischen Matrix zu finden sind. Die Einzelauswertungen haben gezeigt, dass zwar gewisse Variablen einen Zusammenhang zur Behandlung mit Antibiotika zeigen, aber nur in einzelnen Versuchen und nicht notwendigerweise auf Kombinationen von Variablen, die für die Bakteriengruppe stehen, die durch das jeweilige Antibiotikum betroffen sein sollten. Dies wirft die Frage auf, ob Chemotaxonomie tatsächlich in der Lage ist, Aussagen über die Veränderung einer Mischpopulation von Bakterien zu machen.
- Im Rahmen der FISH-Untersuchungen konnten zum ersten Mal die Auswirkungen der verschiedenen Antibiotika auf Belebtschlammzönosen in situ untersucht werden. Das Antibiotikum, welches die deutlichsten Populationsdy-

namiken bewirkte, war Metronidazol. Unter Metronidazol-Einfluss konnten für 4 Bakterienhauptgruppen Auswirkungen beobachtet werden (negativer Einfluss auf die Alpha-Subklasse, stabilisierende Wirkung auf die Planctomyceten und positiver Einfluss auf das *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylum sowie die gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt). In den meisten anderen Ansätzen konnten meist nur für 2 Populationen Verschiebungen beobachtet werden. Die geringsten Effekte waren unter Vancomycin- und Chlortetracyclin-Einfluss zu beobachten. In beiden Fällen konnten lediglich für 2 Bakteriengruppen bzw. für eine Bakteriengruppe stärkere Trends als in der jeweiligen Kontrollanlage beobachtet werden. Gegenläufige Trends konnten nicht analysiert werden. In 3 von 9 Antibiotika Ansätzen konnte ein ähnlicher Verlauf bestimmter Bakteriengruppen beobachtet werden. In den Ansätzen Gentamycin, Erythromycin und Metronidazol wurde jeweils die Alpha-Subklasse unter Antibiotika-Einfluss quantitativ reduziert, während in allen 3 Ansätzen es zu einer deutlichen Vermehrung der Bakterien des *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylums kam. Ob hier ein kausaler Zusammenhang bestand, also durch die Hemmung der Alpha-Subklasse nun zur Verfügung stehende Substrate von den Bakterien des *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylums verwertet werden konnten oder ob allein dadurch, dass die Alpha-Subklasse quantitativ reduziert wurde, sich Vorteile für die Gruppe des *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylums ergeben haben, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Die Bakterienhauptgruppen, die am häufigsten von einer positiven bzw. negativen Beeinflussung betroffen waren, waren die gram-negativen Gruppen der Alpha-Subklasse und das *Cytophaga-Flexibacter*-Subphylum. In 2 von 9 Ansätzen (Amoxicillin und Cefuroxim) konnte ein negativer Effekt auf die gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt analysiert werden, in einem Fall (Metronidazol) konnte ein positiver Effekt für diese Gruppe gemessen werden. Weniger häufig waren die Bakterien der gram-positiven TM7-Gruppe (nur in der Tetracyclin-Anlage) und die Planctomyceten (nur in der Metronidazol-Anlage) durch ein Antibiotikum beeinflusst. Für die Gamma-Subklasse konnten nur in 2 Ansätzen (Amoxicillin und Vancomycin) ein gleichgerichteter, aber stärkerer Trend als in der jeweiligen Kontrollanlage gemessen werden. Für die Beta-Subklasse, die in allen Versuchsansätzen die dominierende Bakteriengruppe war, konnte niemals ein deutlicher Effekt nachgewiesen werden.

- In Anlehnung an die Prüfrichtlinie OECD 303 A (OECD 1981) wurde der Abbau von ¹⁴C-markierten Antibiotika (Benzylpenicillin, Trimethoprim, Ceftriaxon) bei umweltrelevanten, niedrigen Konzentrationen in einer Laborkläranlage geprüft. Da die handelsüblichen Anlagen nicht für den Betrieb mit radioaktiven Substanzen vorgesehen sind, mussten zahlreiche Modifikationen vorgenommen werden. Während der radioaktiven Testphase wurden nach einem festgelegten Plan aus allen Komponenten der Anlage Proben entnommen und mittels LSC analysiert. Die ¹⁴C-Bilanzierung erfolgte an fünf Messpunkten während der dreiwöchigen Testphase. Nach Ablauf der Testphase wurden 24,8% des Benzylpenicillin zu ¹⁴CO₂ abgebaut, während Trimethoprim (0%) und Ceftriaxon (0,4%) nicht mineralisiert wurden. Folglich verließen ca. 60-90% der Radioaktivität die Laborkläranlage über den Ablauf. Geht man davon aus, dass die gemessene Radioaktivität im Ablauf als unveränderte Testsubstanz vorliegt, so könnten ca. 60-90% der Antibiotika die Kläranlagen passieren und in die Oberflächengewässer gelangen. Die Wiederfindungsrate lag in allen drei Versuchen über 94%. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Anteile an Testsubstanz im Belebtschlamm verbleiben und somit die Antibiotika-Konzentrationen im Belebtschlamm über eine längere Zeit stark ansteigen können.
- Die Substanzen Sulfamethoxazol, Trimethoprim und Vancomycin erwiesen sich als foto- und thermostabil ($t_{1/2} > 1$ Jahr). Die Halbwertszeiten bei 15°C und Dunkelheit (Belebungsbecken einer Kläranlage) bewegten sich bei Amoxicillin, Benzylpenicillin, Ceftriaxon, Cefuroxim, Chlortetracyclin, Metronidazol und Tetracyclin zwischen $t_{1/2} = 132$ d (Amoxicillin) und 11 d (Ceftriaxon). Bei Metronidazol und Tetracyclin wurde zusätzlich eine Lichtempfindlichkeit festgestellt, dies spielt allerdings im Abwasser und Kläranlagen aufgrund der Lichtundurchlässigkeit des Mediums nur eine untergeordnete Rolle. Eine Halbwertszeit von mehreren Tagen ist in Kläranlagen als kritisch zu betrachten, da damit ein Eintrag des Stoffes in Gewässer sowie eine weitere Verbreitung möglich ist. Allerdings ist eine Halbwertszeit von einigen Tagen in terrestrischen Testsystemen oder Böden aufgrund der geringen Wanderungsgeschwindigkeit weniger kritisch anzusehen.
- Der anhand der Norm EN ISO 10712 : 1995 modifizierte Wachstumshemmtest mit *E. faecalis* hat veranschaulicht, dass die Übertragbarkeit der Ergebnisse

von Antibiotika auch bei Bakterien zwischen 2 Spezies nicht ohne weiteres möglich ist. Dies sollte u.a. zur erneuten Bearbeitung des Risikobewertungskonzeptes bzw. der Sicherheitsfaktoren führen.

- Kurzzeittests mit Mischpopulationen (Belebtschlamm), wie der Respirationshemmtest und Nitrifikationshemmtest, sind nicht ohne weiteres für die Untersuchung der Antibiotika-Toxizität anwendbar. Hierbei muss die verzögerte Toxizität der Antibiotika in den Testsystemen als wichtiges Kriterium der Bewertung der Testergebnisse und damit der Stoffbewertung berücksichtigt werden (bakteriostatische bzw. bakterizide Wirkung). Des Weiteren ist die Eignung der Tests mit Mischpopulationen für die Untersuchung der Antibiotika zu überdenken.
- Der verlängerte Respirationshemmtest demonstriert beispielhaft, dass die Antibiotika einen großen Teil der Bakterienpopulation beeinflussen können. Der Test konnte durch die Verlängerung der Inkubationszeit gut an die Wirkungsweise der Antibiotika angepasst werden, trotzdem traten zum Teil große Schwankungen bei den Untersuchungen auf. Einige Testwiederholungen haben nicht immer identische Ergebnisse geliefert.
- Die Ergebnisse zeigen, dass nicht alle normierten Tests aus der Chemikalienprüfung für die Untersuchung und Risikoabschätzung der Antibiotika in der aquatischen Umwelt geeignet sind. So zeigt der Wachstumshemmtest mit *Ps. putida* genauso wie der modifizierte Test mit *E. faecalis* eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit vorangegangenen Versuchen, dennoch ist unklar, inwiefern die Resultate auf die natürliche Situation extrapolierbar sind. Im Nitrifikationshemmtest konnten mit Antibiotika bislang keine verwendbaren Ergebnisse erzielt werden.
- Mit dem Vergleich der vier mathematischen Auswertungsverfahren (Probitmodell, Logistische Regression mit zwei bzw. drei Parametern und Gompertzmodell) für die EC_x -Berechnung wurde veranschaulicht, dass das Probitmodell das Umweltrisiko einer Substanz unterschätzen kann und nur für die Berechnung des EC_{50} -Wertes bei einer symmetrischen Datenverteilung geeignet ist. In allen anderen Fällen werden die Werte unter- und überschätzt. Die Logistische Regression mit zwei bzw. drei Parametern wäre ein besserer Ansatz für die EC_x -Bestimmung.

- Mit der EU-Richtlinie 93/69/EWG ist eine Umweltverträglichkeitsprüfung auch für Arzneimittel vorgesehen und eine entsprechende Vorgehensweise wird in der Europäischen Agentur für die Bewertung von Arzneimitteln (EMA) seit der Mitte der 90er Jahre diskutiert. Insbesondere für neue Stoffe ist die Expositionsabschätzung mit einem geeigneten Modell der erste Schritt in der Umweltrisikobewertung. Parallel zu dem Verfahrensvorschlag der EMA wurde das in der Chemikalienbewertung verwendete Modell EUSES mit dem Modell eines Bachlaufs (TOXSWA) kombiniert, um über eine höhere Komplexität eine bessere Realitätsnähe zu erreichen. Die Umweltkonzentrationen für 18 Antibiotika im Kläranlagenabfluss, Oberflächenwasser und Sediment wurden mit diesen Modellen simuliert.
- 13 der 18 untersuchten Stoffe besitzen eine gute Wasserlöslichkeit und einen z. T. sehr niedrigen $\log P_{OW}$. Infolgedessen werden sie bei der Simulation in der Kläranlage kaum zurückgehalten und haben auch nur eine geringe Tendenz dazu, in das Sediment zu verlagern. Das heißt, ein wesentlicher Eliminationspfad aus der Wasserphase – die Adsorption an organischer Materie aufgrund von Lipophilie – kommt nicht zum Tragen. Generell problematisch bei der Modellierung ist, dass die vorhandenen physikalisch-chemischen Grunddaten sich meist auf die ungeladene Substanz beziehen, während das Salz oder das Ion, so vorhanden, ein völlig anderes Umweltverhalten besitzen kann. Für letztere sind physikalisch-chemischen Grunddaten oft nicht verfügbar. Das wiederum erfordert, dass bei einem Vergleich mit gemessenen Umweltkonzentrationen unbedingt die chemische Form der Substanz identifiziert werden muss.
- Bemerkenswert ist zunächst die gute Übereinstimmung der Kläranlagenabfluss-, Oberflächenwasser- und Sedimentkonzentrationen der beiden Modelle EUSES und EMA. Die errechneten Konzentrationen für Substanzen mit hohen Produktionsmengen (z. B. Amoxicillin, 550 t/a; Sulfamethoxazol, 245 t/a) liegen in Oberflächengewässern im Bereich von einigen hundert ng/l bis einigen µg/l. Diese Substanzen erreichen auch einige µg/kg TS im Sediment. Um eine Zehnerpotenz höher liegen die Sedimentkonzentrationen bei Stoffen mit hoher Affinität zu organischem Material (z. B. Monensin, $\log P_{OW}$ 5.43), wobei die Konzentrationen in der Wasserphase unter 1 µg/l liegen (angenommene Produktionsmenge hier 50 t/a). Ein Vergleich mit analytischen Messdaten aus

dem Vorhaben ist für einige Stoffe im Kläranlagenabfluss möglich. Es zeigt sich, dass die berechneten Werte (hier nur für EUSES und EMEA) bis zum Faktor 10 höher liegen. Die Modelle sind zu generell, als dass sie die spezielle Situation der Kläranlagenpassage genau erfassen würden. Andererseits verarbeiten die Modelle die Grunddaten ausreichend genug, um geschätzte Umweltkonzentrationen (predicted environmental concentrations, PECs) zu berechnen, die in einer Risikoabschätzung verwendet werden können.

- Die um 1 bzw. höher liegenden PEC/PNEC-Quotienten (Daten aus dem Wachstumshemmtest mit *Ps. putida* und *E. faecalis*) deuten auf ein Risiko hin, das mit dem Vorkommen der Antibiotika in der aquatischen Umwelt verbunden ist (z. B. Amoxicillin).

Künftig sollte eine Überprüfung der Umwelteigenschaften von Antibiotika standardmäßig bei dem Zulassungsverfahren bzw. bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe berücksichtigt werden.

Tab. 98: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Antibiotikum	ANALYTIK				ABBAU + ELIMINATION										HEMMWIRKUNG					
	Extraktions- methode	Analytik HPLC-ESI-MS- wässr. Phase MS	Analytik Belebtschlamm ¹	Nachweis Realkläranlage ⁴	CBT		Kombinations- test ⁵		Anaerobe Abbaubarkeit Endabbau incl. IC [%] ⁵	KA- Simulations- versuch		Foto-/Thermo- stabilität t _{1/2} [d]			Adsorption	WHT <i>Ps. putida</i> EC ₅₀ [mg/l]	WHT <i>E. faecalis</i> EC ₅₀ [mg/l]	RHT EC ₅₀ [mg/l]		Anaerober Hemmtest EC ₅₀ [mg/g TS]
					Biolog. Abbau, 28 d [%]	Abiot. Abbau t _{1/2} [d]	Endabbau, 28 d [%]	DOC- Elimination, 28 d [%]		Verminderung der DOC- Elimination	Eliminierung	4°C, Dunkel- heit	20°C, Dunkel- heit	20°C, Licht				nach 0,5 h	nach 20 h	
Amoxicillin	+	+	-	-	5	7	38,3 ⁶	64,6 ⁶	-	-	+	365	86	95	k.U.	20,93	0,225	>100	>100	>95
Benzylpenicillin	+	+	-	-	27	<14	89,3	101,6	19	-	- ²	77	9	8	k.U.	108,6	0,821	>100	>100	>100
Ceftriaxon	-	(-)	-	- ⁶	3	53	4,3	8,3	k.U.	-	- ²	61	5	4	k.U.	0,799	14,87	>100	>100	>100
Cefuroxim	+	+	-	-	-	13	10,3	24	k.U.	-	+	110	15	11	k.U.	389,5	13,83	>100	>100	>100
Chlortetracyclin	+	+	-	-	1	<7	-	52	-	-	-	99	53	48	k.U.	0,241	0,102	>100	10-100	41,6
Clarithromycin	+	+	+	+	-	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	46,06	0,143	>100	10-100 ³	k.u.
Clindamycin	+	+	+	+	3	k.U.	-	12	k.U.	-	-	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	>800	0,672	>100	>100	>100
Erythromycin	+	+	+	+	-	k.U.	-	30,6	k.U.	-	-	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	54,50	1,87	>100	>100	>100
Gentamycin	(+)	+	-	- ⁶	-	k.U.	-	53,0	-	-	n.q	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	0,066	0,133	>100	>100	88,0
Imipenem	-	-	-	- ⁶	1	k.U.	23,6	29,2	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	0,333	0,052	>100	1-10 ³	24,1
Metronidazol	+	+	-	+	1	k.U.	5,1	2,2	k.U.	-	+	66	60	15	k.U.	>800	>800	>100	>100	0,69

Antibiotikum	ANALYTIK				ABBAU + ELIMINATION										HEMMWIRKUNG						
	Extraktions- methode	Analytik HPLC-ESI-MS- wässr. Phase	MS	Phase	Analytik Belebtschlamm ¹	Nachweis Realkläranlage ⁴	CBT		Kombinations- test ⁵		Anaerobe Abbaubarkeit Endabbau incl. IC [%] ⁵	KA- Simulations- versuch		Foto-/Thermo- stabilität t _{1/2} [d]			Adsorption	WHT <i>Ps. putida</i> EC ₅₀ [mg/l]	WHT <i>E. faecalis</i> EC ₅₀ [mg/l]	RHT EC ₅₀ [mg/l]	
Monensin	(+)	+	-	- ⁶	1	k.U.	-	87	-	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	>800	0,049	>100	>100	84,1
Nystatin	+	+	-	-	4	k.U.	12,8 ⁶	47,5 ⁶	6	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	k.U.	>100	>100	>100
Ofloxacin	+	+	+	+	-	257	-	41	-	-	-	k.U.	k.U.	k.U.	+	0,265	2,42	>100	1-10	39,5	
Sulfamethoxazol	+	+	+	+	4	s	-	13	-	-	+	s	s	s	k.U.	58,71	>800	>100	>100	>100	
Tetracyclin	+	+	-	-	2	16	-	83,8	k.U.	-	+	64	16	12	k.U.	0,322	0,131	>100	1-10	31,4	
Trimethoprim	+	+	+	-	4	s	-	160	k.U.	-	- ²	s	s	s	k.U.	190,2	0,242	>100	>100	>100	
Vancomycin	+	+	+	-	-	27	2,5 ⁶	17,6	-	-	+	s	s	s	k.U.	40,91	0,361	>100	>100	k.U.	

+: positiv
 -: negativ(+): keine Validierung über das Gesamtverfahren möglich
 (-): nur in hohen Konzentrationen ¹: halbquantitatives Verfahren
 s: stabil
 k.U.: keine Untersuchung
 n.q.: nicht quantifizierbar

¹: halbquantitatives Verfahren
²: Messung der Radioaktivität
³: nach 24 h
⁴: Nachweis Kläranlage Kenzingen, Forchheim, Wyhl
⁵: hohe Konzentration, 100 mg/l C bzw. TOC
⁶: Mittelwert aus 2 sehr unterschiedlichen Werten

6 AUSBLICK

Im Rahmen des hier bearbeiteten Projektes konnten sowohl einige Fragen aber auch einige Risikofelder im Zusammenhang mit dem Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt genau beschrieben werden.

Weitere Forschung erscheint insbesondere für folgende Themenbereiche von Relevanz:

Zum einen haben die Arbeiten im Vorhaben gezeigt, dass analytische Methoden zum Nachweis von Antibiotika in Sedimenten und Schlämmen noch weiterer Verbesserung und Ausweitung bedürfen. Auf der Wirkungsseite sind zum einen die bakteriellen Hemmtests, der Wachstumshemmtest mit dem *Enterococcus faecalis*, wie auch der Nitrifikationshemmtest weiter zu optimieren. Für den Respirationshemmtest deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Antibiotika mit niedriger Wirkschwelle und gleichzeitig breitem Wirkspektrum am ehesten die Verlängerung des Tests für valide Ergebnisse erforderlich machen. Über die Trophiestufe der Bakterien hinaus ist jedoch festzustellen, dass außer vereinzelte Daten für Daphnien und Algen sowie für andere Organismen, von Fischen in der Aquakultur abgesehen, keine Daten zur Ökotoxikologie für Antibiotika vorliegen. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Modellierung des Ausbreitungsverhaltens von Antibiotika bisher noch nicht befriedigend durchgeführt werden kann, was auch an ihrer komplexen chemischen Struktur und dem dadurch bedingten komplexen chemischen Verhalten für Wirkstoffe in der Umwelt liegt. Darüber hinaus wäre es wünschenswert quantitative Struktureigenschaftsbeziehungen künftig vermehrt in der Beurteilung des Umweltverhaltens von Arzneimitteln und insbesondere auch Antibiotika zu verwenden. Dies ergibt sich nicht zuletzt aus der Vielzahl der zu untersuchenden Stoffe.

7 PUBLIKATIONEN

Publikationen / Diplomarbeiten / Dissertationen:

Alexy, R. (2003): Antibiotika in der aquatischen Umwelt: Eintrag, Elimination und Wirkung auf Bakterien. Dissertation. Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Alexy, R., Kümmerer, K.: Antibiotika in der Umwelt. KA-Abwasser, Abfall. Eingereicht

Alexy, R., Kümpel, T., Kümmerer, K. (2004): Assessment of Degradation of 18 Antibiotics in the Closed Bottle Test. Chemosphere. Im Druck

Alexy, R., Sommer, A., Lange, F. T., Kümmerer K.: Antibiotics in a Small Sewage Treatment Plant. Acta hydrochimica et hydrobiologica. Eingereicht

Dörner, M. (2001): Risikoanalyse und Abbaubarkeit ausgesuchter Antibiotika: Amoxicillin, Clarithromycin, Imipenem und Tetracyclin. Diplomarbeit. Fakultät für Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Gartiser, S., Stiene, G. (2000): Determination of the inhibition of the activity of anaerobic bacteria - draft report of a ring test based on ISO/TC 147/SC 5: N263, Freiburg, Feb. 1, 2000

Gleißner, M. (2002): Bestimmung von EC_x-Werten. Diplomarbeit. Fachbereich Statistik, Universität Dortmund

Gleißner, M., Theis, T., Alexy, R., Weihs, C., Kümmerer, K.: Estimating EC_x-values: probit regression often minor to non-linear regression. Environmental Science and Pollution Research. Eingereicht

Houben, K. (2001): Das Abbauverhalten ausgewählter Antibiotika in der aquatischen Umwelt und ihr Einfluss auf Abwasserbakterien – Untersuchung an Modellsystemen. Diplomarbeit. Fakultät für Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Junker, T. (2001): Prüfung der biologischen Abbaubarkeit ¹⁴C-markierter Antibiotika in einer modifizierten Laborkläranlage. Diplomarbeit. Fachhochschule Bingen

Kümmerer, K., Alexy, R., Hüttig, J., Schöll, A. (2004): Standardized Tests Fail to Assess the Effects of Antibiotics on Environmental Bacteria. Water Research. 38, 2111-2116

Sacher, F., Lange, F. T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I. (2001): Pharmaceuticals in groundwaters - analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. Journal of Chromatography A. 938, 199-210

Schöll, A. (2002): Optimierung von Bakterienhemmtests, Stabilität und Wirkung von Antibiotika auf Bakterien in der Abwasserreinigung. Diplomarbeit. Fachhochschule Albstadt-Sigmaringen

Sommer, A. (2002): Antibiotika in der aquatischen Umwelt – Bilanzierung des Verbrauchs und Einfluss auf Bakterien in Modellkläranlagen. Diplomarbeit. Fachhochschule Offenburg

Teilnahme von Hydrotex am Ringversuch zu anaeroben Hemmwirkungen (Bericht von Evans, M. R., Painter, H. A.: Ring test of ISO/DIS 13641-1- and ISO/DIS 13641-2 Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. Astra Zeneca Brixham Environmental Laboratory, 18.12.2000

Buchbeiträge:

Kümmerer, K., Alexy, R., Unger, J., Wiethan, J. (2002): Antimikrobielle Stoffe in der Umwelt und ihre Wirkung auf Bakterien – welches sind die richtigen Tests? In: Metzger J. W. (Ed) Pharmaka und Hormone in der aquatischen Umwelt - eine Bedrohung? Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft. Kommissionsverlag Oldenbourg Industrieverlag GmbH, Band 168, 127-136

Kümmerer, K., Alexy, R.: Arzneimittel in der Umwelt: Sind klassische Tests zur Erfassung der Wirkung geeignet? Dechema, Beitrag eingereicht

Kümpel, T., Alexy, R., Kümmerer, K. (2001): What do we know about antibiotics in the environment? In: Kümmerer K. (Ed.) Pharmaceuticals in the environment. Sources, fate, effects and risks. Springer Verlag, 67-76

Vorträge / Poster:

Alexy, R. (2001): Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt. FM&M-Workshop „Träger und Wirkstoffabgabe/Umweltmedizin“. Freiburg 2. Februar 2001

Alexy, R., Gleißner, M., Theis, W., Kümmerer, K., Weihs, C. (2002): Vergleich von verschiedenen Methoden zur EC_x-Bestimmung. Jahrestagung der GDCh-Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie. Braunschweig 6.-8. Oktober 2002. Tagungsband, S. 192

Alexy, R., Kümpel, T., Dörner, M., Kümmerer, K. (2001): Effects of antibiotics against environmental bacteria studied with simple tests – Are they suitable? 11th Annual Meeting of SETAC Europe. Madrid 6.-10. Mai 2001. Proceedings, S. 110

Alexy, R., Kümpel, T., Kümmerer, K. (2001): Bakterielle Standardtests – geeignet für Risikoabschätzung von Antibiotika in der aquatischen Umwelt? Sechste deutschsprachige SETAC-Tagung. Berlin 10.-11. September 2001. Tagungsband, S. 15

Alexy, R., Kümpel, T., Kümmerer, K. (2001): Effekte von Antibiotika auf das Bakterienwachstum in der Umwelt. Sechste deutschsprachige SETAC-Tagung. Berlin 10.-11. September 2001. Tagungsband, S. 38

Alexy, R., Kümpel, T., Kümmerer, K. (2002): Summary of effects of antibiotics on environmental bacteria with a simple risk assessment. 12th Annual Meeting of SETAC Europe. Wien 12.-16. Mai 2002. Proceedings, S. 236

Alexy, R., Lange, F. T., Kümpel, T., Sommer, A., Kümmerer, K. (2003): Input-output-balance of antibiotics in a municipal STP. 13th Annual Meeting of SETAC Europe. Hamburg 27. April-1. Mai 2003. Tagungsband, S. 71

Alexy, R., Lange, F. T., Metzinger, M., Wenz, M., Sommer, A., Kümmerer, K. (2003): Verbrauch und Umweltkonzentrationen von Antibiotika. Jahrestagung der GDCh-Fachgruppe Wasserchemie. Stade 26.-28. Mai 2003. Tagungsband, S. 143-147

Alexy, R., Schöll, A., Kümmerer, K. (2003): Identification and characterisation of the risk fields connected with the entry of antibiotics into the aquatic environment. Second Late Summer Workshop "Monitoring toxic effects in aquatic systems". Schloss Maurach, Lake Constance, 29.September -01.Oktober 2003. eingereicht

Alexy, R., Schöll, A., Kümpel, T., Kümmerer, K. (2003): Identifizierung und Charakterisierung der mit dem Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt verbundenen Risikofelder. Achte deutschsprachige SETAC-Tagung. Heidelberg, 21.-23.September 2003. eingereicht

Gartiser, S. (2001): Bestimmung der aeroben Abbaubarkeit und Hemmwirkung von Antibiotika in genormten Testsystemen. Vortrag auf dem 5. EESL Statuskolloquium "Pharmaka in der Umwelt" 19.-20. 11.2001, Konstanz

Gartiser, S., Urich, E., Kümmerer, K. (2003): Biodegradation and elimination of antibiotics in ready and inherent tests. Poster SETAC Europe 13th Annual Meeting, Hamburg 2003

Ingerslev, F., Unger, J., Wiethan, J., Alexy, R., Halling-Sørensen, B., Kümmerer, K. (2001): Testing biodegradability and bacterial toxicity of pharmaceuticals by standardized methods – is there a conceptual problem? 11th Annual Meeting of SETAC Europe. Madrid 6.-10. Mai 2001. Proceedings, S. 114

Junker, T., Kalsch, W., Alexy, R., Kümmerer, K. (2001): Abbau von ¹⁴C-markierten Antibiotika in einer Laborkläranlage. Sechste deutschsprachige SETAC-Tagung. Berlin 10.-11. September 2001. Tagungsband, S. 56

Kümmerer, K. (2003): Arzneimittel in der Umwelt – kein Problem oder nicht abschätzbares Risiko? Vortrag, Amt für Energie und Umwelt, Kanton Basel Stadt. 27.08.2003

Kümmerer, K., Alexy, R., Henninger, A., Unger, J. (2002): Antibiotics in the Aquatic and Terrestrial Environment – is there a Problem? Fifth International Conference of the Hospital Infection Society. Edinburgh 15.-18. September 2002. Proceedings, S. 40

Kümmerer, K., Alexy, R., Kümpel, T., Hüttig, J., Gantert, C. (2001): Wirkungen von Antibiotika auf Bakterien in der Umwelt – welches sind die geeigneten Tests? 6.Statuskolloquium „Ökotoxikologische Forschung in der Euregio Bodensee.“ Meersburg 19.-20. November 2001. Tagungsband

Kümpel, T., Alexy, R., Kümmerer, K. (2001): Abbaubarkeit ausgewählter Antibiotika in einem einfachen Testsystem. Sechste deutschsprachige SETAC-Tagung. Berlin 10.-11. September 2001. Tagungsband, S. 59

Kümpel, T., Alexy, R., Kümmerer, K. (2002): Effekte ausgewählter Antibiotika auf die mikrobielle Population von Modellkläranlagen und die Wirkung auf deren Reinigungsleistung. Jahrestagung der GDCh-Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie. Braunschweig 6.-8. Oktober 2002. Tagungsband, S. 106

Lange, F. T., Sacher, F., Metzinger, M., Wenz, M. (2001): Quantitative Spurenanalytik von Antibiotika-Wirkstoffen in Wasser mittels HPLC-ESI-MS-MS – gibt es eine Multimethode?. Schriftenreihe des Sonderforschungsbereiches 193 der TU Berlin “Biologische Behandlung industrieller und gewerblicher Abwässer”. ISSN 0941-8806, Bd. 16, ISBN 3 7983 1852 2, 193-212

Schöll, A., Alexy, R., Kümmerer, K. (2003): Modifikation des Nitrifikationshemmtests DIN EN ISO 9509 : 1995 zur Untersuchung von Antibiotika in der aquatischen Umwelt. Achte deutschsprachige SETAC-Tagung. Heidelberg, 21.-23. September 2003. eingereicht

Schöll, A., Alexy, R., Kümpel, T., Kümmerer, K. (2003): Effects of selected antibiotics on the biocoenosis of laboratory scale sewage plants. 13th Annual Meeting of SETAC Europe. Hamburg 27. April-1. Mai 2003. Tagungsband, S. 172

Schöll, A., Alexy, R., Unger, J., Hüttig, J., Kümmerer, K. (2003): Erfassung der Wirkung von Antibiotika auf Bakterien in Kläranlagen in Testsystemen mittels klassischer Methoden sowie Chemotaxonomie und FISH. Jahrestagung der GDCh-Fachgruppe Wasserchemie. Stade 26.-28. Mai 2003. Tagungsband, S. 343-345

Theis, W. (2000): Experiments with Antibiotics on Simulation Purification Plants. Poster, Herbstkolloquium des Graduiertenkollegs „Angewandte Statistik“, 17./18.11.2000, Bommerholz

Theis, W. (2001): Experimente mit Antibiotika auf Simulationskläranlagen. Poster, Herbstkolloquium des Graduiertenkollegs „Angewandte Statistik“, 2./3.11.2001, Bommerholz

Theis, W. und Weihs, C. (2001): Experiments with Antibiotics on Simulation Purification Plants. Vortrag, Biometrisches Kolloquium, 20.-23.03.2001, Homburg/Saar

Planung:

Von den Projektpartnern sind noch mehrere Publikationen (jeweils 1-2 Publikationen) geplant, die in verschiedenen Zeitschriften eingereicht werden sollen.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Al-Ahmad A., Daschner F. D., Kümmerer K. (1999): Biodegradability of Cefotiam, Ciprofloxacin, Meropenem, Penicillin G and Sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37, 158-163

Al-Ahmad, A., Kümmerer, K. (1998): Abbaubarkeit ausgewählter Antibiotika im Closed Bottle Test und Toxizität gegenüber Abwasserbakterien. 3. Statuskolloquium „Ökotoxikologische Forschung in der Euregio Bodensee, 3. – 4. Dezember, Meersburg

Alexy, R. (2003): Antibiotika in der aquatischen Umwelt: Eintrag, Elimination und Wirkung auf Bakterien. Dissertation. Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 59, 143-169

Auling, G. (1992): Polyamines, Biomarker for Taxonomy and Ecology of Phytopathogenic and other Bacteria belonging to the Proteobacteria, Belg. Journal: 203-209

Auling, G., Pilz, F., Busse, J., Karrasch, S., Streichan, M., Schön, G. (1991): Analysis of the Polyphosphate-Accumulating Microflora in Phosphorus-Eliminating, Anaerobic-Aerobic Activated Sludge Systems by Using Diaminopropane as a Biomarker for Rapid Estimation of Acinetobacter spp, Appl. Environm. Microbiology 55: 3585-3592

Auterhoff, H., Knabe, J., Höltje, H. P. (1994): Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, 13. neu bearbeitete Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart

Backhaus, T., Froehner, K., Altenburger, R., Grimme, L. H. (1997): Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: A comparison between the long term (24h) and the short term (30 min) bioassay. *Chemosphere* 35, 2925-2938

Barkvoll P., Attramadal A., Odont (1989): Effect of nystatin and chlorhexidine digluconate on *Candida albicans*, *Oral Surg Med Oral Pathol.* 67, 279-281

Baumann, U., Müller, M. (1996): Ein Ansatz für kläranlagenverträgliche Produkte. *Gas Wasser Abwasser*, 295-299

Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft (2000): Analytische Qualitätssicherung (AQS): BLAC-Ringversuch „Arzneimittel in der Umwelt“, Bericht, München

Beltman, W. H. J., Adriaanse, P. I. (1999): User's manual TOXSWA 1.2. Simulation of pesticide fate in small surface waters. Winand Staring Centre, Wageningen; Technical Documentation 54/HM/10-99, ISSN 0927-4499, 110 p

Bettin, U. (1996): Überwachung des Vertriebes und der Anwendung von Tierarzneimitteln in Schleswig-Holstein. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 103, 237-284

Blechsmidt, J. (1989): *Candida – Mykosen in der Praxis.* W. Meinhof. Berlin – Diesbach

Boxall, A.B.A., Kay, P., Blackwell, P.A., Fogg, L.A. (im Druck): Special Characteristics of Pharmaceuticals Related to Environmental Fate. In: Kümmerer, K. (Hrsg.) *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks.* 2nd edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Brendel, M. (1999): Großräumige Verteilung. *Der Spiegel* 7/99, 218-220

Brock, T. D., Madigan, J. M., Martinko, J. M., Parker, J. (2000): *Brock Mikrobiologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Berlin-Heidelberg

Brunswik-Titze, A. (2001): Resistente Keime im Abwasser – Untersuchung ausgewählter Resistenzen in kommunalen Kläranlagen in Abhängigkeit der Einleiterstruktur und in Modellkläranlagen in Abhängigkeit der Antibiotikagabe. Diplomarbeit: Universität Freiburg

Bundgaard, H. (1977): Polymerization of penicillins, II. Kinetics and mechanism of dimerization and self-catalyzed hydrolysis of amoxicillin in aqueous solution. *Acta Pharmaceutica* 14, 47-66

Burhenne, J., Ludwig, M., Spiteller, M. (1999): Polar photodegradation products of quinolones determined by HPLC/MS/MS. *Chemosphere*. 38, 1279-1286

Busse, J., Auling, G. (1988): Polyamine Pattern as a Chemotaxonomic Marker within the Proteobacteria, *System. Appl. Microbiol.* 11: 1-8

Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R. (2003): Strategic of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environ. Sci. Technol.* 37: 1241-1248

Cerovec, C. (2000): Entwicklung und Anwendung von HPLC-Methoden für die Analyse von Antibiotika in verschiedenen Testsystemen. Diplomarbeit, Fachhochschule Isny im Allgäu

Chandrasekaran, S., Venkatesh, B., Lalithakumari, D. (1998): Transfer and expression of a multiple antibiotic resistance plasmid in marine bacteria. *Curr. Microbiol.* 37, 347-351

Christensen, F. M. (1998): Pharmaceuticals in the environment - a human risk? *Reg. Tox. Pharm.* 28, 212-221

Christian, T., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T., Goldbach, H. E. (2003): Determination of Antibiotic Residues in manure, Soil, and Surface Waters. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31: 36-44

Comber, K. R., Merrikin, D. J., Sutherland, R. (1979): Antibacterial activity and synergy, in vitro and in vivo, of a combination of amoxicillin and flucloxacillin. *Chemotherapy*. 25, 30-39

Concannon, J., Lovitt, H., Ramage, M., Tai, L. H., McDonald, C., Sunderland, V. B. (1986): Stability of aqueous solutions of amoxicillin sodium in the frozen and liquid states. *American Journal of Hospital Pharmacy* 43, 3027-3030

Cook, B., Hill, S.A., Lynn, B. (1982): The stability of amoxicillin sodium in intravenous infusion fluids. *Journal of Clinical and Hospital Pharmacy* 7, 245-250

CSTEE (Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment) (2001): Opinion on: Draft CPMP Discussion Paper on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use [Non-Genetically Modified Organism (Non-GMO) Containing], expressed at the 24th CSTEE plenary meeting, Brussels, 12 June 2001; European Commission, DG Health and Consumer Protection, Report No. C2/JCD/csteeop/CPMPpaperRAssessHumPharm12062001/D(01); 22 p

Cunningham, V.L. (im Druck): Special Characteristics of Pharmaceuticals Related to Environmental Fate. In: **Kümmerer, K. (Hrsg.)** Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks. 2nd edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Daschner, F. D. (1996): Antibiotika am Krankenbett. 8. Auflage. Springer. Berlin-Heidelberg-New York

Dietrich, H. A., Eichler, H. G., Kurz, A. (1998): Antiinfektiva – ein Kurzlehrbuch zur Therapie mit Antibiotika, Antimykotika, antiviralen und antiparasitären Mitteln. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

DIN EN ISO 32 645 (1994): Deutsche Norm, Chemische Analytik: Nachweis-, Erfassung- und Bestimmungsgrenze. Arbeitsausschuss Chemische Terminologie (AchT) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

DIN EN ISO 38 414 Teil 10 (1981): Schlamm und Sedimente - Bestimmung des Schlammvolumenanteils und des Schlammindex. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (Band VII); 10. Lieferung, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim - New York - Basel – Cambridge

DIN EN ISO 38 414 Teil 2 (1985): Schlamm und Sedimente - Bestimmung des Wassergehaltes und des Trockenrückstandes bzw. der Trockensubstanz. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (Band VII); 15. Lieferung, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim - New York - Basel – Cambridge

DIN EN ISO 27 027 C2 (1994): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Bestimmung der Trübung (ISO 7027: 1990). Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim

DIN EN ISO 10 712 L (1995): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-, und Schlammuntersuchung: *Pseudomonas putida* Wachstumshemmtest (*Pseudomonas*-Zellvermehrungshemmtest). Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim

DIN EN ISO 11 734 (11/1998): Bestimmung der vollständigen anaeroben biologischen Abbaubarkeit im Faulschlamm - Verfahren durch Messung der Biogasproduktion

DIN EN ISO 9509 L38 (1995): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-, und Schlammuntersuchung: Verfahren zur Bestimmung der Nitrifikationshemmung von Mikroorganismen im Belebtschlamm durch Stoffe und Abwasser. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim

Doi, A. M., Stoskopf, M. K. (2000): The kinetics of oxytetracycline degradation in deionized water under varying temperature, pH, light, substrate, and organic matter. J. Aquat. Anim. Health. 12, 246-253

Dojmi di Delupis, G., Macrì, A., Civitareale, C., Migliore, L. (1992): Antibiotics of zootechnical use: effects of acute high and low dose contamination on *Daphnia magna* Strauss. Aquatic Toxicology 22, 53-60

Donoho, A. L. (1984): Biochemical studies on the fate of monensin in animals and in the environment. *J. Anim. Sci.* 58 (6), 1528-1539

Douzinis, R. (2001) Literature review on substances of potential concern in reclaimed water. url: <http://depts.washington.edu/cwws/Research/Reports/waterreuse.pdf>

ECOTOX (1993): Environmental hazard assessment of substances. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. Nr. 51

Eikelboom, D. H., van Buijsen, H. J. J. (1992): Handbuch für die mikroskopische Schlammuntersuchung. 2. Auflage, F. Hirthammer Verlag GmbH, München

EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (2001): Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP): Discussion Paper on Environmental Risk Assessment of Non-Genetically Modified Organism (Non-GMO) containing Medicinal Products for Human Use. London, 25 January 2001, Report No. CPMP/SWP/4447/00 draft corr.; 10 p

Erah, P. O., Goddard, A. F., Barrett, D. A., Shaw, P. N., Spiller, R. C. (1997): The stability of amoxicillin, clarithromycin and metronidazol in gastric juice: relevance to the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 39, 5-12

Erbe, T., Kümmerer, K., Daschner, F. (1997): Antibiotika in der aquatischen Umwelt – Erhebung des Antibiotikaverbrauchs für die Bereiche Krankenhaus, Praxis und Tierhaltung unter dem Aspekt der Resistenzentwicklung in der aquatischen Umwelt. Bericht für die Forschungskommission des Universitätsklinikums Freiburg

EU (1994): Draft Guideline III/5504/94 - Assessment of potential risks to the environment for human use: Phase I Environmental Risk Assessment. Ad hoc Working Party on Environmental Risk Assessments for non GMO Containing Medical Products

European Commission (2002): Quicker phase-out of antibiotics in animal feed demanded—vote (26/11/2002). <<http://www.health.fgov.be/WHI3/krant/krantarch2002/kranttekstnov2/021126m09eu.htm>>

European Commission (2003): Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part II, 2nd edition, 328 p., No. EUR 20418 EN/2

European Federation of Animal Health (FEDESA) (2001): Antibiotic Use in Farm Animals does not threaten Human Health, a new Study suggests. 13. Juni 2001. Visby, Schweden

Evans, M.R., Painter, H.A. (2000): Ring test of ISO/DIS 13641-1-and ISO/DIS 13641-2 Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. Astra Zeneca Brixham Environmental Laboratory

Faktendatenbank ABDATA

Faktendatenbank Chemis

Faktendatenbank Dose

Faktendatenbank Ecotox (Ecological Toxicity Database)

Faktendatenbank GSBL (Gefahrstoffdatenbank des Bundes der Länder)

Falbe, J., Regitz, M. (Hrsg.) (1989): Römpp Chemie Lexikon. 9. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Färber, H. (2002): Antibiotika im Krankenhausabwasser. Hyg. Med. 27, 35

Fasani, E., Profumo, A., Albini, A. (1998): Structure and medium-dependent photodecomposition of fluoroquinolone antibiotics. *Photochem Photobiol.* 68, 666-674

Fent, K. (1998): *Ökotoxikologie*. Thieme Verlag, Stuttgart New York

Feuerpfeil, I., Lopez-Pila, J., Schmidt, R., Schneider, E., Szewzyk, R. (1999): Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. *Bundesgeshbl.* 42, 32-50

Firmeninformation apogepha

Fjelde, S., Lunestad, B. T., Samuelsen, O. B., Ervik, A. (1993): Photostability of oxytetracycline, nitrofurazolidone, oxolinic acid, flumequine, sulfadiazine, sulfamethoxine, trimethoprim and ormethoprim in seawater. In: Haagsma, N., Ruiter, A., Czedik-Eysenberg, P. B. (Eds.): *Proc. 2. EuroResidue Conf. Vol. 1*, 285-288

Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (1992): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 6. Auflage, Wissenschaftsverlag, Mannheim-Leipzig-Wien-Zürich

Fritsche, W. (1998): *Umweltmikrobiologie – Grundlagen und Anwendungen*. Gustav Fischer Verlag, Jena

Froehner, K., Backhaus, T., Grimme, L. H. (2000): Bioassays with *Vibrio fischeri* for the assessment of delayed toxicity. *Chemosphere* 40, 821-828

Frühling, W., Rönnpagel, K., Ahlf, W. (2000): Nitrifikanten als Indikator für Bodenkontaminationen - Effekte von Umweltchemikalien auf Mikroorganismen als Beurteilungsgrundlage für Toxizität und stoffliche Verfügbarkeit. SETAC Germany, Jahrestagung, 12.-13.9., Hamburg

Gartiser, S. (1999): Abschätzung des Beitrages kommunaler Kläranlagen an Schadstoffkonzentration in Oberflächengewässern. *Z. Umweltchem. Ökotox. UWSF.* 11, 157-162

Gartiser, S., Wallrabenstein, M., Stiene, G. (1998): Assessment of several test systems for the determination of the anaerobic biodegradability of polymers. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, Vol. 6, Nr. 3, 159 – 173

Gavalchin, J., Katz, S. E. (1994): The persistence of fecal-borne antibiotics in soil. *J. AOAC Internat.* 77, 481-485

Gentlemen, R., Ihaka, R.: The R Project for Statistical Computing. <<http://www.r-project.org/>, 07-04-2003

Giger, W., Alder, A. C., Golet, E. M., Kohler, H.-P. E., Mc Ardell, C. S., Molnar, E., Siegrist, H., Suter, M. J.-F. (2003): Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. *Chimia.* 57, 9: 485-491

Gleißner, M., Theis, T., Alexy, R., Weihs, C., Kümmerer, K. (2002): Estimating EC_x-values: probit regression often minor to non-linear regression. *Env. Sci. Poll. Res.* (eingereicht)

Golet, E. M., Strehler, A., Alder, A. C., Giger, W. (2002): Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical Chemistry* 2002. 74, 5455-5462

Golet, E.M., Alder, A.C., Hartmann, A., Ternes, T.A., Giger W. (2001): Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Analytical Chemistry* 73 (15):3632-3638

Gomez, J., Mendez, R., Lema, J. M. (1996): The effect of antibiotics on nitrification process - by batch assays. *Appl. Biochem. Biotech.* 869-876

Halling-Sørensen, B. (2000): Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere* 40, 731-739

Halling-Sørensen, B. (2000): Worst-case eliminations of predicted environmental soil concentrations (PEC) of selected veterinary antibiotics and residue used in Danish agriculture. Technological Institute - Selection on Environmental Technology. International Seminar Day - Pharmaceuticals in the environment. 09.03.2000, Brussel

Halling-Sørensen, B., Nießen, N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten-Lutzhøft, H.-C., Jørgensen S.E. (1998): Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere* 36:357-393

Hamana, K., Matsuzaki, S. (1992): Polyamines as a Chemotaxonomic Marker in Bacterial Systematics, *Critical Reviews in Microbiology* 18, 261-283

Hamana, K., Matsuzaki, S. (1993): Polyamine Distribution Patterns serve as a Phenotypic Marker in the Chemotaxonomy of the Proteobacteria. *Can. J. Microbiol.* 39, 304-310

Hamscher, G., Sczesny, S., Hoper, H., Nau, H. (2001): Tetracycline and chlortetracycline residues in soil fertilized with liquid manure. In: *Livestock Farming and the Environment*, edited by J. Hartung and C. M. Wathes, Braunschweig: Bundesforschungsanstalt Landwirtschaft (FAL), 27-31

Hamscher, G., Sczesny, S., Höper, H., Nau, H. (2002): Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 1509-1518

Harris, J. C. (1982): Rate of Hydrolysis. In: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*. Mc Graw-Hill, New York

Hartmann, A., Alder, A. C., Koller, T., Widmer, R. M. (1998): Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of *umuC* genotoxicity in native hospital wastewater. *Env. Tox. Chem.* 17, 377-382

Hartmann, A., Golet, E. M., Gartiser, S., Alder, A. C., Koller, T., Widmer, R .M (1999): Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 115-119

Hartung, J., Elpelt, B., Klösener, K.-H. (1999) Statistik. 12. Auflage, Oldenbourg Verlag

Hassler, H. (2002): persönliche Mitteilung. Leiter des Klärwerks der Stadt Kenzingen

Heberer; T., Stan, H.-J. (1995): Polare Umweltkontaminanten im aquatischen System: Vorkommen und Identifizierung mittels GC-MS. *GIT Fachz. Lab.* 8:718-720

Hektoen, H., Berge, J. A., Hormazabal, V., Yndestad, M. (1995): Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133, 175-184

Heller, D.N., Clark, S., Righter, H. F. (2000): Confirmation of gentamycin and neomycin in milk by weak cation extraction and electrospray ionisation/ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35, 39-49

Hertle, W. (1999): Ciprofloxacin im Abwasser - Untersuchung der Resistenzausbildung und Elimination in Modellkläranlagen. Diplomarbeit: Universität Freiburg

Hiraishi, A. (1988): Respiratory Quinone Profiles as Tools for Identifying Different Bacterial Populations in Activated Sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 34, 39-56

Hiraishi, A., Masamune, K., Kitamura, H. (1989): Characterization of the Bacterial Population Structure in an Anaerobic-Aerobic Activated Sludge System on the Basis of Respiratory Quinone Profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (4): 897-901

Hiraishi, A., Morishima, Y., Takeuchi, J. (1991): Numerical Analysis of Lipoquinone Patterns in Monitoring Bacterial Community Dynamics in Wastewater Treatment Systems. *J. Gen. Appl. Microbiology* 37, 57-70

Hiraishi, A., Ueda, Y., Ishihara, J. (1998): Quinone Profiling of Bacterial Communities in Natural and Synthetic Sewage Activated Sludge for Enhanced Phosphate Removal. *Appl. and Environm. Microbiol.* 64 (3), 992-998

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-I. (1999): Occurrence of Antibiotics in the Aquatic Environment. *Science of the Total Environment* 225, 109-118

Höffler, D. (2000): Antibiotikatherapie: 24. Interdisziplinäres Forum der Bundesärztekammer „Fortschritt und Fortbildung in der Medizin“ vom 12. bis 15. Januar 2000. *Deutsches Ärzteblatt* 97, Heft 18, 1236-1238

Holten-Lützhøft, H.-C., Halling-Sørensen, B., Jörgensen, S.E. (1999): Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36.1-6

Houben, K. (2001): Das Abbauverhalten ausgewählter Antibiotika in der aquatischen Umwelt und ihr Einfluss auf Abwasserbakterien - Untersuchung an Modellsystemen. Diplomarbeit. Universität Freiburg

Hugenholtz, P., Tyson, G. W., Webb, R. I., Wagner, A. M., Blackall, L. L. (2001): Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain bacteria with no known pure-culture representatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 411-419

Ihaka, R., Gentleman, R. (1996): A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, vol.5, numb. 3, 1996, pp. 299--314

Ingerslev, F., Halling-Sørensen, B. (2000): Biodegradability properties of sulfonamides in activated sludge. *Environ. Tox. Chem.* 19, 2467-2473

ISO/DIS 13641-1: Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria Part 1: Inhibition of anaerobic digestion. ISO/TC 147/SC 5: 29/12/99

ISO/DIS 13641-2: Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria Part 2: Test at low biomass concentration. ISO/TC 147/SC 5: 29/12/99

ISO (1998): ISO 11733, L41. Untersuchung der Elimination und der biologischen Abbaubarkeit in einem aquatischen Medium (Belebtschlamm-Simulationstest). Europäisches Komitee für Normung, Brüssel

Jacobson, S. N., O'Mara, N. L., Alexander, M. (1980): Evidence for cometabolism in sewage. Appl. Environ. Microbiol.. 40, 917-921

Janata, O. (2001): Antibiotika. pm-Verlag, PWG Pharma Werbegesellschaft m.b.H., Kössen

Jekel, M., Wischnack, S., Hartig, C. (2000): Röntgenkontrastmittel und Sulfonamide im Wasserkreislauf - unerwünschte Überbleibsel. Forschung Aktuell 1, 64-67

Jiang, Z., Yang, H., Sun, L., Shi, S. (2002): Integrated assessment for aerobic biodegradability of organic substances. Chemosphere 48, 133-138

Junker, T. (2001): Prüfung der biologischen Abbaubarkeit ¹⁴C-markierter Antibiotika in einer modifizierten Laborkläranlage. Diplomarbeit. Fachhochschule Bingen

Kamphues, J. (1999): Leistungsförderer mit antibiotischer Wirkung aus Sicht der Tierernährung. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 112, 370-379

Kamphues, J., Hebler, D. (1999): Leistungsförderer - der Status Quo aus Sicht der Tierernährung. Übers. Tierernährung 27, 1-28

Kapesser, S. (1990): Populationsanalysen, Nährstoffansprüche und Physiologie der Belebtschlamm-Mikroflora sowie „spezieller“ Bakterienkulturen für die aerobe Abwasserbehandlung. Dissertation. TH Darmstadt

Kern, W. (2002): persönliche Mitteilung. Abt. Innere Medizin II., Infektiologie, Universitätsklinikum Freiburg

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999 – 2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202-1211

Kreuzig, R. (2002): Untersuchungen zum Verhalten von Pharmaka-Rückständen in Böden – eine Herausforderung an das Design von Labortestsystemen. *Mitt. Fachgr. Umweltchem. Ökotox.* 3, 9-12

Kümmerer, K. (1998): Hessische Landesanstalt für Umwelt (Hrsg.): Vorkommen von Arzneimitteln in der Umwelt – was ist zu tun? *Umweltplanung, Arbeits- und Umweltschutz*, Heft 254/98, 97-104

Kümmerer, K. (Hrsg.) (2001): *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V. (2000): Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40, 701-710

Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Trittler, R., Unger, J., Wiethan, J., Henninger A. (2002): Antibiotikaresistenz – Vorkommen und Übertragung in Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser. Teil 2: Resistenzausbildung und Verbreitung durch Antibiotikaeintrag in Abwasser und Kläranlagen: Untersuchung mittels Chemotaxonomie und Kläranlagensimulation. Abschlussbericht BMBF, Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene des Klinikums der Alber-Ludwigs-Universität Freiburg, F&E-Vorhaben 02WU9871/2

Kümmerer, K., Henninger, A. (2003): Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. *Clin. Microbiol. Infect.* 9. 1203-1214

Kunz, S. (2001): Einfluss von Antibiotika auf Kläranlagen – Verfolgung mittels Chemotaxonomie. Diplomarbeit, FH Offenbach

Laak, E.A., Pijpers, A., Noordergraaf, J.H., Schoevers, E.C., Verheijden, J.H.M. (1991): Comparison of Methods for In Vitro Testing of Susceptibility of Porcine Mycoplasma Species to Antimicrobial Agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 35 (2), 228-233

Lange, F. T., Sacher, F., Metzinger, M., Wenz, M. (2001): Quantitative Spurenanalytik von Antibiotika-Wirkstoffen in Wasser mittels HPLC-ESI-MS-MS – gibt es eine Multimethode?. Schriftenreihe des Sonderforschungsbereiches 193 der TU Berlin "Biologische Behandlung industrieller und gewerblicher Abwässer". ISSN 0941-8806, Bd. 16, ISBN 3 7983 1852 2, 193-212

Lanzky, P. F., Halling-Sørensen, B. (1997): The toxic effect of the antibiotic Metronidazol on aquatic organisms. Chemosphere 11, 2553-2561

Lemmer, H., Griebe, T., Flemming, H.-C. (1996): Ökologie der Abwasserorganismen, Springer Verlag, Berlin – Heidelberg – New York

Lenga, R. E. (1988): Sigma-Aldrich Library of Chemical Safety Data, Vol. 1 +2, by Sigma-Aldrich, Wisconsin, USA

Lorian, V. (1991): Antibiotics in Laboratory Medicine. 3rd Edition, Williams & Wilkins, Baltimore

Lorian, V. (1999): Antibiotics in Laboratory Medicine. Fourth Edition, Williams & Wilkins, Baltimore

Lunestad, B. T, Goksøyr, J. (1990): Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. Dis. Aquat. Org. 9, 67-72

Lunestad, B. T., Samuelsen, O. B., Fjelde, S., Ervik, A. (1995): Photostability of eight antibacterial agents in seawater. *Aquaculture*. 134, 217-225

Macrì, A., Stazi, A. V., Dojmi di Delupis, G. (1988): Acute toxicity of furazolidone on *Artemia salina*, *Daphnia magna* and *Culex pipiens* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 16, 90-94

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.-H. (1992): Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematics and Applied Microbiology*, 15, 593-600

Marengo, J. R., Kok, R. A., O'Brien, K., Velagaleti, R. R., Stamm, J. M. (1997): Aerobic biodegradation of (¹⁴C)-sarafloxacin hydrochloride in soil. *Environ. Tox. Chem.* 16, 462-471

McDonald, C., Sunderland, V. B., Lau, H., Shija, R. (1989): The stability of amoxicillin sodium in normal saline and glucose (5%) solution in the liquid and frozen states. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 14, 45-52

Meinecke, S., Norr, C., Brackemann, H. (2000): Prüfung der biologischen Abbaubarkeit von schwerlöslichen und oberflächenaktiven Stoffen in einem neuen Testsystem auf Basis des Zahn-Wellens-Tests. *Vom Wasser* 95, 177-190

Merck-Index (1996): An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biological. Published by Merck Research Laboratories, Twelfth Edition, Division of Merck & Co., Inc.

Metha, A. C., Hart-Davies, S., Payne, J., Lacey, R. W. (1994): Stability of amoxicillin and potassium clavulanate in co-amoxiclav oral suspension. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 19, 313-315

Meylan, W.M.; Howard, P.H.; Boethling, R.S.; Aronson, S.D.; Printup, H.; Gouchie, S. (1999): Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient. – *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (4): 664-672

Mudrack, K., Kunst, S. (1994): Biologie der Abwasserreinigung. 4. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Naber, G., Adam, D. (1981): Wirkungsmechanismus, Bakteriologie, Pharmakokinetik. In: Chemotherapeutika im Vergleich. Futuramed Verlag, München

NCCLS (1998): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eight Informational Supplement. Vol. 18, No. 1

Neu, H., Ellner, P. (1983): The inhibitory quotient. Bull. N.Y. Acad. Med. 59, 430-442

Nowara, A., Burhenne, J., Spitteller, M. (1997): Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. J. Agric. Food Chem. 45, 1459-1463

Nusch, E. (1995): Möglichkeiten und Grenzen der Aussagefähigkeit konventioneller Biotestverfahren. Umwelttechnologieforum "Utech". 16. Februar, Berlin

Nyholm, N. (1991): The European system of standardized legal tests for assessing the biodegradability of chemicals. Environ. Tox. Chem. 10, 1237-1246

OECD (1981): OECD 303 A. OECD Guideline for Testing Chemicals – Simulation Test – Aerobic Sewage Treatment: Coupled Units Test. Organisation of Economic Cooperation and Development, Paris

OECD (1984): OECD Guideline for Testing of Chemicals (209): Activated Sludge, Respiration Inhibition Test. Organisation of Economic Cooperation and Development. Paris

OECD (1992): OECD Guideline for Testing of Chemicals (301D): Closed Bottle Test. Organisation of Economic Cooperation and Development: Paris

OECD (2000): OECD 303 A. OECD Guideline for Testing Chemicals - Simulation Test – Aerobic Sewage Treatment: Coupled Units Test. Draft Update Guideline, June 2000. Organisation of Economic Cooperation and Development, Paris

OECD 301 B: CO₂ Evolution Test OECD Guidelines for testing of Chemicals
17.07.92

OECD 302 B: Zahn-Wellens/EMPA Test. OECD Guidelines for testing of Chemicals
17.07.92

Oehlmann, J., Markert, B. (Hrsg.) (1999): Ökotoxikologie – Ökosystemare Ansätze und Methoden. Ecomed, Landsberg/Lech

Pagga, U., Strotmann, U. (1997): Bakterientoxizität- standardisierte Testmethoden und Erfahrungen. Gwf Wasser Abwasser 140, 827-835

Pietsch, J., Ricordel, D., Imhof, L., Werner, P., Croue, J. P., Brauch, H. J. (1998): Trace analysis of veterinary chemotherapeutic residues in water by high-performance liquid chromatography. Jahrestagung Fachgruppe Wasserchemie der GdCH, Lübeck 18.-20. Mai 1998, Tagungsband, 455-456

Rassow, D., Schaper, H. (1996): Zum Einsatz von Fütterungsarzneimitteln in Schweine- und Geflügelbeständen in der Region Weser-Ems. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 103, 244-249

Richardson, M. L., Bowron, J. M. (1985): The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. J. Pharm. Pharmacol. 37, 1-12

Richter, P. (1999): Isolation und Identifikation glykopeptidresistenter Enterokokkenspezies aus Mastgeflügel. Diplomarbeit. Universität Hamburg

Richterich, K., Gerike, P. (1986): A reproducibility study in the Closed-Bottle-Test. Chemosphere. 15, 331-341

Römbke, J., Knacker, T., Stahlschmidt-Allner, P. (1996): Umweltprobleme durch Arzneimittel – Literaturstudie. Forschungsbericht 10604 121, UBA-FB 96-060

Rönnefahrt, I. (2002): Humanarzneimittel in der Umwelt - Neue Ansätze in der Risikobewertung in der EU. Jahrestagung 2002 Umweltchemie und Ökotoxikologie, Tagungsband, 189

Rote Liste (1997): Arzneimittelverzeichnis für Deutschland. ECV – Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Aulendorf

Rote Liste (2001): Arzneimittelverzeichnis für Deutschland. ECV – Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH, Aulendorf

Sacher, F., Gabriel, S., Metzinger, M., Stretz, A., Wenz, M., Lange, F. T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I. (2002): Arzneimittelwirkstoffe im Grundwasser. Ergebnisse eines Monitoring-Programms in Baden-Württemberg. Vom Wasser 99, 183-196

Sacher, F., Lange, F. T., Brauch, H. J., Blankenhorn, I. (2001): Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. J. Chromatogr. 938, 199-210

Samuelson, O. B. (1989): Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. Aquaculture 83, 7-16

Sattelberger, S. (1999): Arzneimittelrückstände in der Umwelt, Bestandsaufnahme und Problemstellung. Report des UBA Österreich, Wien

Schäfer, A. (1996): Horizontaler Gentransfer - Mechanismen und biologische Sicherheit. Biospektrum. 6, 23-29

Scharf, S., Gans, O., Sattelberger, R. (2002): Arzneimittelwirkstoffe im Zu- und Ablauf von Kläranlagen. UBA Wien

Scherer, P., Kneifel, H. (1983): Distribution of Polyamines in Methanogenic Bacteria. J. Bact. 154: 1315-1322

Schneider, C., Möhle, E., Stenz, G., Krauß, P., Metzger, J. W. (2001): Arzneimittel in Siedlungsabfällen und in Deponiesickerwässern. Tagung Wasserchemisches Gesellschaft, Bad Wildungen Mai 2001

Schneider, G. (1985): Pharmazeutische Biologie. 2. neu bearbeitete und erweiterte Auflage, Mannheim: Bibliographisches Institut, 1985

Schöberl, P. (1991): Kopplung des OECD-confirmatory Tests mit kontinuierlichen Ökotoxizitätsprüfungen. Tenside Surf. Det. 28 (2): 97-105

Schönberger, H. (1991): Zur biologischen Abbaubarkeit im Abwasserbereich: Ist der Zahn-Wellens-Abbautest der richtige Test? Z. Wasser- Abwasser- Forsch. 24, 118-128

Schwabe, U., Paffrath, D. (1999): Arzneiverordnungsreport 1998. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

Sicherheitsdatenblätter (1999): Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Simon, C., Stille, W. (1993): Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. 8. neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Schattauer Stuttgart, New York

Singleton, B. (1995): Einführung in die Bakteriologie. Quelle und Meyer, Wiesbaden

Spain, J. C., Van Veld, P. A. (1983): Adaption of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure, time, inoculum, and chemical structure. Applied and Environmental Microbiology 45, 428-435

Strotmann, U. J., Schwarz, H., Pagga, U. (1995): The combined CO₂/DOC test - a new method to determine the biodegradability of organic compounds. Chemosphere 30, 525-538

Taeger, K., Beinhorn, D., Pagga, U., Diekmann, H., Lange, A. W., Nörtemann, B., Hempel, D. C., Huber, L., Knackmuss, H. J., Janssen, D. B. (1994): Biologische Abbaubarkeit-Bedeutung für chemische Industrie. *Bio Engineering*. 4, 41-59

Talinli, I., Tokta, S. (1994): Oxygen uptake rate inhibition test: a modified method for priority pollutants. *Environm. Technol.* 15, 979-988

Technical Guidance Document on Risk Assessment in Support of the Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Chemicals, the Commission Regulation (EC) 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances and the Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market. Part II: Environmental Risk Assessment. European Commission, Joint Research Centre (2003)

Ternes, T. A. (1998): Hessische Landesanstalt für Umwelt (Hrsg.): Arzneimittelrückstände in Gewässern und Kläranlagen. *Umweltplanung, Arbeits- und Umweltschutz*, Heft 254/98, 21-27

Ternes, T., Hirsch, R., Stumpf, M., Eggert, T., Schuppert, B. F., Haberer, K. (1999): Nachweis und Screening von Arzneimittelrückständen, Diagnostika und Antiseptika in der aquatischen Umwelt – Abschlussbericht. Abschlussbericht eines vom BMBF geförderten Vorhabens (02WU9567/3)

TGD (1996): Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances

Theuretzbacher, U. (1998): Beta-Lactamasen und Beta-Lactamasen-Inhibitoren. *Chemotherapie Journal*: 7, 136-142

Thiele-Bruhn, S. (2003): Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166, 145-167

Thomulka, K. W., McGee, D. J. (1993): Detection of Biohazardous Materials in Water by Measuring Bioluminescence Reduction with the Marine Organism *Vibrio harveyi*. *Viron. Sci. Health A* 28, 2153-2166

Tokumura, T., Machida, Y. (2001): UV absorption method should not be applied for determining amoxycillin in acidic dissolution test medium. *International Journal of Pharmaceutics*. 228, 1-4

Tomlinson, E., Notari, R. E., Byron, P. R. (1980): Simultaneous partitioning and hydrolysis kinetics of amoxicillin and ampicillin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 69, 655-658

Tomlinson, T. G., Boon, A. G., Trotman, C. N. A. (1966): Inhibition of nitrification in the activated sludge process of sewage disposal. *J. Appl. Bact.* 29, 266-291

Toutenburg, H. (1992): *Lineare Modelle*. Physica-Verlag

Tsuji, A., Nakashima, E., Hamano, S., Tsukinaka, Y. (1978): Physicochemical properties of amphoteric β -lactam antibiotics I: stability, solubility, and dissolution behavior of amino penicillins as a function of pH. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67, 1059-1066

UBA Abschlussbericht (2003): Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt – Prüfung der biologischen Abbaubarkeit ausgewählter Antibiotika, ihr Vorkommen im Abwasser und ihr möglicher Einfluss auf die Reinigungsleistung kommunaler Kläranlagen – Identifizierung von Risikofeldern. Institut für Umweltmedizin und Krankenhaushygiene der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, F&E-Vorhaben 298 63 722

Umweltbundesamt (1996): *Umweltprobleme durch Arzneimittel*. FKZ 106 04 121, UBA-Texte 60/96. Umweltbundesamt, Berlin

Umweltbundesamt (1997): *Jahresbericht 1997 des Umweltbundesamtes*, 100-101. Umweltbundesamt, Berlin

Unger, J. (2000): Überprüfung von Polyaminen und Chinonen als Biomarker für die Bestimmung von Schwimmschlammbildnern im Belebtschlamm aus Kläranlagen. Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

UVM (2002): Vorkommen von Pharmaka und Hormonen in Grund-, Oberflächenwässern und Böden in Baden-Württemberg. Abschlussbericht zu einem Forschungsvorhaben des Ministeriums für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg, Projekt-Nr. U53-00.01, Projektleitung: Dr. Heinz-Jürgen Brauch

Van der Heide, E. F., van der Plas, H. (1987): Arzneimittel und Umwelt. Studien- und Informationszentrum TNO für Umweltforschung, Delft. 1-36

Volmer, D.A., Hui, P.M. (1998): Study of erythromycin A decomposition products in aqueous solution by solid-phase microextraction/liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12, 123-129

Volmer, D.A., Lock, C.M. (1998): Electrospray ionisation and collision-induced dissociation of antibiotik polyether ionophores. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12, 157-164

Vonesh, E.F., Chinchilli (1997): Linear and non-linear models for the analysis of repeated measurements. Dekker. New York

Wagner, M., Amann, R., Kämpfer, P., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N., Schleifer, K.-H. (1994): Identification and in situ detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology*, 17, 405-417

Wagner, R., Fischer, W. K., Fleming, H. C., Gerike, P., Lingens, F., Müller, D., Reinarth, G., Robra, K. H., Schlimme, E., Steber, J., Trenel, J., Wilderer, P., Wunderlich, M. (1988): Methoden zur Prüfung der biochemischen Abbaubarkeit chemischer Substanzen. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Wagner, R., Kayser, G. (1990): Laboruntersuchungen zur Hemmung der Nitrifikation durch spezielle Inhaltsstoffe industrieller und gewerblicher Abwässer. Wasser Abwasser. Nr. 4

Walsh, C. (2000): Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature 406, 775-781

Watts, C. D., Craythorne, M., Fielding, M., Steel, C. P. (1983): Identification of non-volatile organics in water using field desorption mass spectrometry and high performance liquid chromatography. 120-130. in: Angletti, G., Bjorseth, A. (Ed.). D. D. Reidel Publishing Co, Dordrecht

Weerasinghe, C. A., Towner, D. (1997): Aerobic biodegradation of virginiamycin in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1873-1876

Wiethan, J. (1999): Selektionsdruck von Antibiotika in Gewässern - Untersuchungen am Beispiel von Ciprofloxacin und Ceftazidim in einem einfachen Testsystem. Diplomarbeit. Fachhochschule Albstadt-Sigmaringen

Wiethan, J., Al-Ahmad, A., Henninger, A., Kümmerer, K. (2000): Simulation des Selektionsdrucks der Antibiotika Ciprofloxacin und Ceftazidim in Oberflächengewässern mittels klassischer Methoden. Vom Wasser. 95, 107-118

Winckler, C., Grafe, A. (2000): Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden. Vorläufiger Abschlussbericht für die Landwirtschaftskammer Weser-Ems

Zahn, R., Wellens, H. (1974): Ein einfaches Verfahren zur Prüfung der biologischen Abbaubarkeit von Produkten und Abwasserinhaltsstoffen. Chemiker-Zeitung. 98, 228-232

Zuccato E., Bagnati R., Fioretti F., Natangelo M., Calamari D., Fanelli R. (2001): Environmental loads and detection of pharmaceuticals in Italy. In: Pharmaceuticals in the Environment (Editor K. Kümmerer), Springer Verlag, 19-27

9 ANHANG

9.1 MATERIAL UND GERÄTE**9.1.1 Untersuchte Stoffe**

Bezeichnung	Bezugsquelle	CAS- Nr.	Reinheit IUK	Reinheit TZW	Reinheit Hydrotox
Amoxicillin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	26787-78-0	98,9%	99%	98,9%
Benzylpenicillin, Natriumsalz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	69-57-8	99,8%	Keine Angaben	Keine Angaben
Ceftriaxon, Natrium	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	56238-63-2	83,8%	Keine Angaben	Keine Angaben
Cefuroxim, Natriumsalz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	56238-63-2	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben
Chlortetracyclin, Hydrochlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	64-72-2	82%	79%	82%
Clarithromycin	IDC, Abbott Laboratories Ltd., Queenborough, England	81103-11-9	97,2%	97,2%	Keine Angaben
Clindamycin, Hydrochlorid	Rosen Pharma GmbH, Bli- eskastel	21462-39-5	91,3%	91,3%	Keine Angaben
Erythromycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	114-07-8	94,7%	94,7%	~97%
Gentamycin, Sulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim ²⁾	1405-41-0	69,2%	Keine Angaben	63,8%
Imipenem	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar ³⁾	64221-86-9	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben
Metronidazol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	443-48-1	99,6%	99,6%	99%
Monensin, Natriumsalz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	22373-78-0	~90%	90-95%	90-95%
Nystatin	Calbiochem, Darmstadt ⁴⁾	1400-61-9	Keine Angaben	Keine Angaben	Keine Angaben
Ofloxacin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	82419-36-1	Keine Angaben	100%	Keine Angaben
Sulfamethoxazol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	723-46-6	Keine Angaben	99%	Keine Angaben
Tetracyclin ¹⁾	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	60-54-8	>95%	>95%	≥95%
Trimethoprim, Naphthoat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	738-70-5	98%	99,6%	98,5%

Bezeichnung	Bezugsquelle	CAS- Nr.	Reinheit IUK	Reinheit TZW	Reinheit Hydrotox
Vancomycin, Hydrochlorid	Lederle Arzneimittel GmbH, Wolfratshausen ⁵⁾	1404-93-9	97,5%	Keine Angaben	97,5%

¹⁾ Antibiotikum Tetracyclin lag bei TZW und Hydrotox als Hydrochlorid vor, CAS-Nr. 60-75-5

²⁾ andere Bezugsquelle von Gentamycin bei TZW: Promochem, European Pharmacopeia

³⁾ andere Bezugsquelle von Imipenem bei TZW: Promochem, European Pharmacopeia

⁴⁾ andere Bezugsquelle von Nystatin bei TZW und Hydrotox: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

⁵⁾ andere Bezugsquelle von Vancomycin bei TZW: Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

9.1.2 Untersuchte radioaktiv markierte Stoffe

Bezeichnung	Bezugsquelle	CAS-Nr.	chem. Reinheit	radiochem. Reinheit
Benzylpenicillin, Natriumsalz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	69-57-8	~ 99%	-
¹⁴ C-Benzylpenicillin-Kalium	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg			96,8%
Trimethoprim	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	738-70-5	≥ 99.0%	-
¹⁴ C-Trimethoprim	Hoffmann-La Roche AG, CH-Basel			97,0%
Ceftriaxon, Natriumsalz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	104376-79-6	keine Angaben	-
¹⁴ C-Ceftriaxon	Hoffmann-La Roche AG, CH-Basel			> 95%

9.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle	Formel
1,8-Diaminooctan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	C ₈ H ₂₀ N ₂
3,5-Dichlorphenol, 97%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	C ₆ H ₄ Cl ₂ O
Aceton, p.a.	Merck 14, Darmstadt	(CH ₃) ₂ CO
Acetonitril LiChrosolv [®] , gradient grade	Merck 30, Darmstadt	C ₂ H ₃ N
Agar Agar	Merck 1614, Darmstadt	-
Ameisensäure 98-100%, p.a.	Merck, Darmstadt	CH ₂ O ₂
Ammoniumacetat, p.a.	Fluka, CH-Buchs	C ₂ H ₇ NO ₂

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

Bezeichnung	Bezugsquelle	Formel
Ammoniumchlorid	Merck 1145, Darmstadt	NH ₄ Cl
Ammoniumformiat >99%, microselect	Fluka, CH-Buchs	CH ₅ NO ₂
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt	(NH ₄) ₂ SO ₄
Bariumhydroxid	Sigma Aldrich Laborchemika- lien GmbH, Steinheim	Ba(OH) ₂
Blutagar	Heipha Diagnostika 109e, Heidelberg	-
Borsäure	Merck 0165, Darmstadt	H ₃ BO ₃
Bromethansäure	Fluka, CH-Buchs	BrCH ₂ COOH
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck 2382, Darmstadt	CaCl ₂ * 2H ₂ O
Cobalt(II)chlorid-Hexahydrat	Merck 2539, Darmstadt, Sigma Aldrich Laborchemika- lien GmbH, Steinheim	CoCl ₂ * 6H ₂ O
D(+)-Glucose wasserfrei	Merck 8337, Darmstadt	C ₆ H ₁₂ O ₆
Dansylchlorid	Fluka Chemie AG, Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim	C ₁₂ H ₁₂ ClNO ₂ S
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck 5099, Darmstadt	K ₂ HPO ₄
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt	C ₂ H ₆ OS
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Merck 6580, Darmstadt	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O
Dinatriumhydrogenphosphat- Dodecahydrat	Merck, Darmstadt	Na ₂ HPO ₄ * 12H ₂ O
Dinatriumselenit	-	Na ₂ SeO ₃
EDTA Ethylendiamintetra- essigsäure Dinatriumsalz	Serva 11280, Heidelberg	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂
EDTA Ethylendiamintetra- essigsäure-Dinatriumsalz Dihydrat >97%, purum	Fluka, CH-Buchs	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ * 2H ₂ O
Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat	Merck 3861, Darmstadt	FeCl ₂ * 4H ₂ O
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	Merck 3943, Darmstadt	FeCl ₃ * 6H ₂ O
Eisen(III)citrat-Monohydrat	Fluka 44941, CH-Buchs	C ₆ H ₅ O ₇ Fe* H ₂ O
Essigsäure 96%, p.a.	Merck, Darmstadt	CH ₃ COOH
Ethanol 96%, reinst	Merck 971, Darmstadt	C ₂ H ₅ OH
Fleischextrakt	Merck 3979, Darmstadt	-
Glutardialdehyd	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	C ₅ H ₈ O ₂
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co 3941.1, Karlsruhe; Merck, Darmstadt	CH ₄ N ₂ O

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

Bezeichnung	Bezugsquelle	Formel
Hefeextrakt	Merck 5099, Darmstadt Difco, Kansas City, USA	-
Hexamethylentetramin	Riedel-de Häen 33233, Seelze	$C_6H_{12}N_4$
Hionic-Fluor	Packard, Dreieich	-
Isopropylether, $\geq 99,0\%$	Fluka Chemie AG, Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim	$C_6H_{14}O$
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck 4873, Darmstadt	KH_2PO_4
Kupfer(II)chlorid	Merck, Darmstadt	$CuCl_2$
Kupferchlorid-Dihydrat	Merck 2733, Darmstadt	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$
Kupfersulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
L-Prolin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	$C_5H_9NO_2$
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck 5886, Darmstadt	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
Mangan(II)chlorid-Dihydrat	Merck 5934, Darmstadt	$MnCl_2 \cdot 2H_2O$
Manganchlorid-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$
Methanol, LiChrosolv®, gradient grade	Merck 6007, Darmstadt; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	CH_3OH
N-Allylthioharnstoff	Merck-Schuchard (808158), Hohenbrunn	$C_4H_8N_2S$
Natriumazid	Merck 6688, Darmstadt	NaN_3
Natriumbenzoat	Merck, Darmstadt	C_6H_5COONa
Natriumcarbonat	Merck 6392, Darmstadt	Na_2CO_3
Natriumchlorid	J. T. Baker B. V. 278, NL- Deventer; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	$NaCl$
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem 1940, Darmstadt	$NaHCO_3$
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	$NaOH$
Natriumhydroxid Plätzchen p.a.	Merck, Darmstadt	$NaOH$
Natriummolybdat(IV)-Dihydrat	Merck 6521, Darmstadt	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
Natriumnitrat	Merck 6537, Darmstadt	$NaNO_3$
Natriumnitrit	Merck 417cc400949, Darmstadt	$NaNO_2$

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

Bezeichnung	Bezugsquelle	Formel
Natronkalk, Plätzchen mit Indikator	Merck, Darmstadt	-
Natronlauge, c= 1 mol/l	Merck 9137, Darmstadt	NaOH
n-Hexan, p.a.	Merck 4367, Darmstadt	$(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_4$
Nickelchlorid-Dihydrat	Merck 6717, Darmstadt	$\text{NiCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Nickelchlorid-Hexahydrat	Merck 6717, Darmstadt	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Nitri-VIT Testkit zum Nachweis nitrifizierender Bakterien	Vermicon AG, München	-
Oxalsäure-Dihydrat p.a.	Merck, Darmstadt	$\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co 8952.2, Karlsruhe	-
Perchlorsäure 60%, p.a.	Merck 518, Darmstadt	HClO_4
Phosphorsäure, >85% p. a.	Rotipuran [®] , Carl Roth GmbH & Co 8952.2, Karlsruhe	H_3PO_4
Pyruvat (Brenztraubensäure Natriumsalz)	Merck 6619, Darmstadt	$\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$
Resazurin	Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim	-
Rotiszint Ecoplus	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	-
Salzsäure 32%, p.a.	Merck, Darmstadt	HCl
Salzsäure c = 1 mol/l	Merck 9057, Darmstadt	HCl
Salzsäure, c = 2 mol/l	Shimadzu 998, Duisburg	HCl
Salzsäure, rauchend, $\geq 37\%$	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	HCl
Schwefelsäure 95-95%, p.a.	Merck 0731, Darmstadt	H_2SO_4
Spectroquant [®] , Ammonium Küvettentest	Merck 14739, Darmstadt	-
Spectroquant [®] , Ammonium-Test	Merck 14752, Darmstadt	-
Spectroquant [®] , Nitrat Küvettentest	Merck 14542, Darmstadt	-
Spectroquant [®] , Nitrat-Test	Merck 14773, Darmstadt	-
Spectroquant [®] , Nitrit Küvettentest	Merck 14547, Darmstadt	-
Spectroquant [®] , Nitrit-Test	Merck 14776, Darmstadt	-
Spectroquant [®] , Stickstoff(gesamt)-Küvettentest	Merck, Darmstadt	
tert-Butylmethylether	Merck 8883, Darmstadt	$(\text{CH}_3)_4\text{CO}$
Toluol, p.a.	Merck 8324, Darmstadt	C_7H_8

Bezeichnung	Bezugsquelle	Formel
Triethylamin >99,5%, p.a.	Fluka, CH-Buchs	C ₆ H ₁₅ N
Triethylenglykol (TEG)	Merck, Darmstadt	C ₆ H ₁₄ O ₄
Trifluoressigsäure >98%, purum	Fluka, CH-Buchs	C ₂ HF ₃ O ₂
Ultima Gold	Packard, Dreieich	-
Zinkchlorid	Merck, Darmstadt	ZnCl ₂
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck 8883, Darmstadt	ZnSO ₄ * 7H ₂ O

9.1.4 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle	Beschreibung
Capes	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	ND 13, PP, mit Septum
Cellulose-Acetat-Filter	Macherey-Nagel, Düren; Schleicher & Schuell, Dassel	porafil®, 0,45 µm, Ø 25 mm; 0,2 µm
Cellulose-Mischesther-Filter	Millipore, Eschborn	0,42 µm
Cellulose-Nitrat-Filter	Macherey-Nagel, Düren	porafil®, 0,45 µm, Ø 13 mm
Dispenser Tips	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	25 ml, 5 ml, 2,5 ml (gemäß DIN 12650)
Einmal-Kanülen	-	0,9 x 40 mm
Einmalspritzen	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	10, 20, 50 ml
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel	Ø 320 mm
Festphasenextraktionssäulchen	Separtis, Grenzach-Wyhlen	1 g Isolute C18, 6 ml Kartuschen
Festphasenextraktionssäulchen	Separtis, Grenzach-Wyhlen	100 mg Isolute ENV+, 3 ml Kartuschen
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel	595 ½, Φ 125 mm
Küvetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim	Plastikbrand, 2,5 ml, PS
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	kurz, 150 mm
Petrischalen	Cellstar, Greiner, bio-one, Frickenhausen	40 x 12, PS
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	Eppendorf®, 1-200 µl
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	Eppendorf®, 100-1000 µl
Probenröhrchen	Cellstar, Greiner, bio-one, Frickenhausen	15 ml, 50 ml
Reagenzgläser	Duran, Schott, Mainz	-

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

Bezeichnung	Bezugsquelle	Beschreibung
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf	1,5 ml, spitz
Rollrandflaschen	A-Z Analytik-Zubehör, Langen	1,5 ml, enge Öffnungen
Septen	Merck, Darmstadt	Silikon, A-Ø 42 mm, Dicke 2 mm
SiOH-Säulen	Macherey-Nagel, Düren	Chromabond®, 6 ml, 1000 mg
Sterilfilter	Millipore, Bedford, USA	0,22 µm
Steril-Stopfen	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	Ø 16/22 mm, Ø 22/32 mm, Zellwatte, Rotilabo®
µ-Einsatz für Rollrandflaschen	A-Z Analytik-Zubehör, Langen	30 x 5 mm, Spitze 9 mm
Verschlusskappen für Rollrandflaschen	A-Z Analytik-Zubehör, Langen	11 mm
Vials	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe; Packard, Dreieich	2 ml, 4 ml, Borosilikatglas 5, 20 ml
Vials	Supelco, Bellefonte, USA	10 ml, Borosilikatglas
Vierkantküvetten	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	Plastibrand, 2,5 ml, PS
Wägeschalen	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	41 x 41 x 25 mm 140 x 140 x 22 mm
Weißrandfilter	Schleicher & Schuell, Dassel	Ø 0,45 µm

9.1.5 Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Analysenwaage	AE 240	Mettler, Giessen
Analysenwaage	BP 110 S	Sartorius AG, Göttingen
Aquarienheizstäbe	Typ TSRH	Jäger, Wüstenrot
Aquariumspumpe	Elite 802 / Maxima	Hagen, Holm
Autoanalyser	-	Skalar, Erkelenz
Autoklav	Ventilab HP	Münchener Medizin Mechanik GmbH, München
Becherglas	1000 ml	Schott Glas, Mainz
Belüfterpumpe	-	Schego, Offenbach
Belüftungseinheit	Wariolab Mobilien W90	Sanitärinstallation nach DIN-DVGW, Waltnerlaboreinrichtungen GmGH & Co in Wangen
Brutschrank	Modell 400	Memmert, Schwabach

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Dampfsterilisator	Varioklav Typ EV	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
DOC-Messgerät	TOC 5000/ ASI 5000	Shimadzu, Duisburg
Drucksensor	-	Fa. Schlee GmbH & Co., Witten
Enghals-Standflaschen mit Stopfen	Kalk-Soda-Glas, 250 ml	-
Erlenmeyerkolben	Weithals, Duran [®] , 50, 250, 1000, 5000 ml	Schott Glas, Mainz
Festphasenextraktion	ASPEC [™] XL	Gilson, Villier le Bel, Frankreich
Festphasenextraktionseinheit	Autotrace SPE Workstation	Zymark, USA-Hopkinton
Flüssigkeits-Szintillationszähler	TriCarb TM 2500 TR	Packard, Dreieich
Fotometer	Ultraspec 4000 MPM 1500	Pharmacia Biotech, Cambridge WTW, Weilheim
Gasbrenner	Fireboy plus	INTEGRA, Biosciences AG, CH-Wallisellen
Gaswaschflasche	2000 ml	Schott Glas, Mainz
Handdispenser	HandyStep [®] , 705 100	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Heizblock	2091-DA	Gbr. Liebisch, Bielefeld
HPLC, Autoinjector	SIL-10AD, SIL-10AXL	Shimadzu, Duisburg
HPLC, Datenstation	CBM-10A	Shimadzu, Duisburg
HPLC, Diodenarray-Detektor	SPD-M10A	Shimadzu, Duisburg
HPLC, Fluoreszenz-Detektor	RF-10A	Shimadzu, Duisburg
HPLC, Gradientenpumpe	LC 10AT, LC 10AD	Shimadzu, Duisburg
HPLC Komplettsystem	HP 1090	Agilent, Waldbronn
HPLC, RP 18 Säule	Luna 5µ C18(2), 250 x 2 mm	Phenomenex, Aschaffenburg
HPLC, RP 18 Säule (HD)	Nucleosil 120-3 C18, 250 x 2 mm	Bischoff, Leonberg
HPLC, RP 18 Säule (HD)	Nucleosil 120-3 C18, 250 x 2 mm	Macherey-Nagel, Düren
HPLC, RP 18 Säule (HD)	Nucleosil 100-5, 250 x 4.6 mm	Macherey-Nagel, Düren
HPLC, Säulenofen	CTO-10AS	Shimadzu, Duisburg
HPLC, UV-Vis Detektor	SPD-10A	Shimadzu, Duisburg
IC, Autosampler	Marathon	Spark, Emmen, Holland
IC, Autosuppressor	ASRS-Ultra4-mm	Dionex, Sunnyvale, USA
IC, Entgasungsmodul	EDM-2	Dionex, Sunnyvale, USA

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

Bezeichnung	Typ	Hersteller
IC, Gradientenpumpe	AGP-1	Dionex, Sunnyvale, USA
IC, IonPac Säule + Vorsäule	AS4A, AG4A	Dionex, Sunnyvale, USA
IC, Leitfähigkeitsdetektor	CD25	Dionex, Sunnyvale, USA
Ionenchromatograf	DX 100	Dionex, Sunnyvale, USA
Kanister	28/ 10 l, PE-HD	-
Kohlenstoffanalysator	TOCOR-2	Maihak, Hamburg
Kolbenhubpipette	Pipetta 2, 100 – 1000 µl, 50 – 200 µl; Rotilabo; 100 µm	Ratiolab GmbH, Dreieich- Buchsschlag; Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Laborflasche mit Gewinde	Duran [®] , Braunglas / Klarglas, 100, 500, 1000, 5000 ml	Schott Glas, Mainz
Laborkläranlage	Behrotest KA 1	Behr Labortechnik, Düsseldorf
Lyophile	Lyovac GT2	Amsco, Finnland
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik, Staufen
Magnetrührstäbchen	zylindrisch, PTFE-ummantelt	-
Massenspektrometer mit ESI- Interface	API 2000	Applied Biosystems, Langen
Membranpumpe	-	WISA, Wuppertal
Messkolben	Klasse A, blau graduiert, 100, 250, 500, 1000 ml	Hirschmann GmbH & Co KG, Eberstadt
Messpipette	Braun/ blau graduiert , Klasse A/B, 10, 20 ml	Hirschmann GmbH & Co KG, Eberstadt
Messzylinder	Blaubrand, Duran [®] , 100, 250, 500, 1000 ml	Brand GmbH & Co KG, Wert- heim
Mikroliter-Spritzen	5, 10, 50, 100, 250, 500 µl	Hamilton, CH-Banaduz
Mikroskop	Axioplan 2	Zeiss, Jena
pH-/Oxi-Messgerät	MultiLab P4	WTW, Weilheim
pH-Messgerät	CG 804	Schott, Hofheim
pH-Messgerät	Φ 10 pH Meter	Beckmann Instruments, USA- Fullerton
Photometer	MPM 1500	WTW, Weilheim
Präzisionswaage	PC 1616	Mettler, Giessen
Pumpe	Gamma-4	ProMinent, Heidelberg
Reinstwasseranlage	Millipore Reagent-Water- System, Direkt-Q TM	Millipore, Eschborn
Rotationsverdampfer	Labo Rota S300, resona technics	Buchs, Berlin
Rührwerk	RW 20 DZW	IKA Labortechnik, Staufen

Abschlussbericht F&E-Vorhaben 298 63 722

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Sample Concentrator	Dri-Block DB-3A	Techne, Gernsbach
Sauerstoffmessgerät	OXI 196; OXI 530	WTW, Weilheim
Schlauchpumpe	IPS-12; PLP 1000	Ismatec, Zürich; Behr Labor-technik, Düsseldorf
Schraubglas	Pyrex®, 11,5 ml	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Schüttelwasserbad	ME 310035001 SWB 25, Typ 003-3678	Köttermann, Freiburg Haake, Karlsruhe
Stopfen, mit Bohrung	Ø 47/55 mm, Naturgummi	-
Stoppuhr	Modell No TR 113	Oregon Scientific
Teflonröhrchen	Nalgene®, 40ml	-
Thermometer	Oxi 196	WTW, Weilheim
Thermoschrank	BV 80 KL, 760011	Memmert, CH-Bern
Trichter	Ø 120, 150 mm	-
Trockenschrank	UT 12, UT 6060	Heraeus Instruments, Hanau
Ultraschallbad	Transsonic 460/H	Elma, Singen
Ultraschallgerät	Sonoplus HD 200	Bandelin, Berlin
Vollpipette	Klasse AS, blau graduiert, 10, 20 ml	Hirschmann GmbH & Co KG, Eberstadt
Weithalsschraubflaschen aus PE	250, 500 ml	-
Weithals-Standflasche mit Stopfen	Duran®, Braunglas, 1000/2000 ml	Schott Glas, Mainz
Zentrifuge	RC 50 plus	Sorvall, Newton, USA
Zentrifuge	Universal K2S	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	8K10; 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifugenbecher	200 ml, mit Deckel	Sorvall, Newton, USA
Zentrifugeneinsatz	12143	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifugeneinsatz	SLA 1500	Sorvall/ Du Pont, USA
Zentrifugengläser	50 ml, Duranglas	Schott Glas, Mainz

9.2 STOFFDOSSIERS

1. Amoxicillin
2. Benzylpenicillin
3. Ceftriaxon
4. Cefuroxim
5. Chlortetracyclin
6. Clarithromycin
7. Clindamycin
8. Erythromycin
9. Gentamycin
10. Imipenem
11. Metronidazol
12. Monensin
13. Nystatin
14. Ofloxacin
15. Sulfamethoxazol
16. Tetracyclin
17. Trimethoprim
18. Vancomycin