

Texte

Texte

**11
05**

ISSN
0722-186X

**Verhalten von in der Umwelt
vorkommenden Pharmaka
und ihren Metaboliten in
Modelltestsystmen**

"Modellsystem Boden"

**Umwelt
Bundes
Amt**



Für Mensch und Umwelt

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungsbericht 201 67 401/02
UBA-FB 000805



**Verhalten von in der Umwelt
vorkommenden Pharmaka
und ihren Metaboliten in
Modelltestsystmen**

"Modellsystem Boden"

von

**apl. Prof. Dr. Robert Kreuzig
Christoph Kullmer
Birthe Matthies
Benjamin Plaga
Dr. Heike Dieckmann
Sibylla Höltge**

**Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik
Technische Universität Braunschweig**

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter
<http://www.umweltbundesamt.de>
verfügbar.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr
für die Richtigkeit, die Genauigkeit und
Vollständigkeit der Angaben sowie für
die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in der Studie geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: 030/8903-0
Telex: 183 756
Telefax: 030/8903 2285
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet IV 2.2
Dr. Jutta Klein-Goedcke

Berlin, Mai 2005

Berichts-Kennblatt

| | | |
|--|----------------------------------|---------------------------|
| 1. Berichtsnummer UBA-FB | 2. | 3. |
| 4. Titel des Berichts Verhalten von in der Umwelt vorkommenden Pharmaka und ihren Metaboliten in Modelltestsystmen – Teil 2: "Modellsystem Boden" | | |
| 5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Kreuzig, R., Kullmer, C., Matthies, B., Plaga, B., Dieckmann, H., Höltge, S. | 8. Abschlussdatum 31.08.2003 | 9. Veröffentlichungsdatum |
| 6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik Technische Universität Braunschweig Hagenring 30 D-38106 Braunschweig | 10. UFOPLAN-Nr. 201 67 401/02 | 11. Seitenzahl 128 |
| 7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Postfach 33 00 22, 14191 Berlin | 12. Literaturangaben 75 | 13. Tabellen 16 |
| 15. Zusätzliche Angaben | 14. Abbildungen 51 | |
| 16. Zusammenfassung In Labortestsystmen wurde das Rückstandsverhalten der Pharmaka Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, Diazepam, Paracetamol, Sulfamethoxazol und dessen Metabolit Acetyl-Sulfamethoxazol in unterschiedlichen Böden untersucht. Nach Standard- und Testklärschlamm-Applikation der ¹⁴ C-markierten Substanzen wurden die einzelnen Batchexperimente zum mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbau bezüglich Mineralisation sowie der Bildung extrahierbarer und nicht-extrahierbarer Rückstände bilanziert. Ferner wurden K _d - bzw. K _{OC} -Werte zur Abschätzung der Mobilität in Böden bestimmt. Sich hieraus ableitende Verlagerungstendenzen wurden in Säulen- und Laborlysimetertests überprüft. Die Mobilitätseinstufung reichte von mäßig mobil für Ketoprofen und die Sulfonamid-Derivate bis hin zum immobilen Paracetamol. Die Unterschiede in der Abbaubarkeit in den untersuchten Böden wurden deutlich von Diazepam und Paracetamol aufgezeigt. Diazepam war langfristig als unveränderte Ausgangsverbindung in den Extrakten nachweisbar, während Paracetamol spontan in der Matrix mikrobiell aktiver Bodenproben als nicht-extrahierbare Rückstände festgelegt wurde. Ibuprofen und Ketoprofen sind als leicht abbaubar einzustufen, da diese verstärkt der Mineralisation und der Metaboli ten-Bildung unterliegen. Das Rückstandsverhalten von Diclofenac und die Sulfonamid-Derivaten wurde dagegen stärker durch die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände bestimmt. | | |
| 17. Schlagwörter Pharmaka, Boden, Labortestsystme, Abbau, Sorption | | |
| 18. Preis | 19. | 20. |

Report Cover Sheet

| | | |
|---|-----|-----|
| 1. Report No. UBA-FB | 2. | 3. |
| 4. Report Title Behaviour of Selected Pharmaceutical Medicines and Metabolites in Modell Test Systems – Part 2: "Model system Soil" | | |
| 5. Autor(s), Family Name(s), First Name(s) Kreuzig, R., Kullmer, C., Matthies, B., Plaga, B., Dieckmann, H., Höltge, S. | | |
| 8. Report Date 08/31/2003 | | |
| 9. Publication Date | | |
| 10. UFOPLAN-Ref. No. 201 67 401/02 | | |
| 11. No. of Pages 128 | | |
| 12. No. of Reference 75 | | |
| 13. No. of Tables 16 | | |
| 14. No. of Figures 51 | | |
| 15. Supplementary Notes | | |
| 16. Abstract In laboratory test systems, fate and behaviour of the pharmaceutical medicines diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, diazepam, paracetamol, sulfamethoxazole and its metabolite acetyl-sulfamethoxazole in different soils have been investigated. After standard and test sludge application of the ¹⁴ C-labelled compounds, the batch tests on microbial, chemical and photoinduced degradability were balanced taking mineralisation and formation of extractable and non-extractable residues in special account. Additionally, K _d and K _{OC} values were determined to assess mobility in soil. Resulting leaching tendencies were monitored by column and laboratory lysimeter tests. The mobility in soils under study varied from moderately mobil for ketoprofen and the sulfonamide derivatives to immobile for paracetamol. Differences in the metabolic fate were reflected by diazepam that remained long-term extractable as the parent compound and by paracetamol that spontaneously formed non-extractable residues in microbially active soil samples. Ibuprofen and ketoprofen have been assessed slightly degradable due to mineralisation and formation of metabolites, while the fate of diclofenac and the sulfonamide derivatives was mainly determined by the formation of non-extractable residues. | | |
| 17. Keywords Pharmaceutical medicines, soil, laboratory test systems, degradation, sorption | | |
| 18. Price | 19. | 20. |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| 1. Veranlassung und Zielsetzung des Forschungsvorhabens | 1 |
| 2. Auswahl der pharmazeutischen Substanzen | 5 |
| 3. Auswahl und Charakterisierung der untersuchten Böden | 9 |
| 3.1 Bodeneigenschaften | 9 |
| 3.2 Entnahme von gestörten Bodenproben | 10 |
| 3.3 Entnahme von ungestörten Bodenproben | 11 |
| 4. Design der Labortestsysteme | 13 |
| 4.1 Batchexperimente zum mikrobiellen Abbau | 13 |
| 4.2 Batchexperimente zum chemischen Abbau | 16 |
| 4.3 Tests zur Stabilität in Klärschlamm | 15 |
| 4.4 Charakterisierung nicht-extrahierbarer Rückstände | 17 |
| 4.5 Batchexperimente zum photoinduzierten Abbau | 17 |
| 4.6 Bestimmung von Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten | 20 |
| 4.7 Tests zu Verlagerung und Abbau als simultan ablaufende Prozesse | 21 |
| 5. Verhalten von Pharmaka-Rückständen in Böden | 26 |
| 5.1 Mobilität und Verfügbarkeit | 27 |
| 5.2 Tests zur Extraktionseffizienz organischer Lösungsmittel | 31 |
| 5.3 Abbau und Verlagerung | 35 |
| 5.3.1 Diclofenac | 36 |
| 5.3.2 Ibuprofen und Ketoprofen | 44 |
| 5.3.3 Diazepam | 69 |
| 5.3.4 Paracetamol und Strukturanaloga | 74 |
| 5.3.5 Sulfamethoxazol und Acetyl-Sulfamethoxazol | 84 |
| 6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen | 102 |
| 7. Summary and Conclusions | 110 |
| 8. Literaturverzeichnis | 117 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------------------|--|
| AD-A | Boden Adenstedt, Ackerstandort |
| AD-G | Boden Adenstedt, Grünlandstandort |
| AOX | adsorbierbare organische Halogene |
| A-SMZ | Acetyl-Sulfamethoxazol |
| Ap-Horizont | Pflughorizont |
| BA | Bestrahlungsapparatur |
| BBA | Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft |
| CA | chemischer Abbau |
| C _{org} | organische Bodensubstanz |
| cts | counts |
| DIA | Diazepam |
| DIC | Diclofenac |
| DT ₉₀ | Disappearance time für 90 % der applizierten Chemikalie |
| DOC | Dissolved organic carbon |
| EMEA | European Agency for the Evaluation of Medicinal Products |
| ER | extrahierbare Rückstände |
| FKZ | Förderkennzeichen |
| GC/MS | Gaschromatographie/Massenspektrometrie-Kopplung |
| IBU | Ibuprofen |
| ID | innerer Durchmesser |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| KET | Ketoprofen |
| K _d , K _{OC} | Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten |
| KRE | p-Kresol |
| L, I | Lehm, lehmig |
| LC/MS | Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie-Kopplung |
| LUFA | Landwirtschaftliche Forschungs- und Untersuchungsanstalt |
| M1-M5 | nicht identifizierte Umwandlungsprodukte |
| MA | mikrobieller Abbau |
| MIN | Mineralisation |
| nb | nicht bestimmbar |
| NK | Boden Neuenkirchen |

| | |
|--------------------|---|
| NER | nicht-extrahierbare Rückstände |
| NW | Boden Nienwohlde |
| OECD | Organization for Economic Cooperation and Development |
| PA | photoinduzierter Abbau |
| PCA | photoinduziert-chemischer Abbau |
| PCM | Paracetamol |
| PHE | Phenacetin |
| PMA | photoinduziert-mikrobieller Abbau |
| PSM | Pflanzenschutzmittel |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| RTLC | Radio thin layer chromatography |
| S, s | Sand, sandig |
| SMZ | Sulfamethoxazol |
| T, t | Ton, tonig |
| TS | Trockensubstanz |
| TVO | Trinkwasser-Verordnung |
| U, u | Schluff, schluffig |
| U- ¹⁴ C | uniform- ¹⁴ C-ringmarkiert |
| UBA | Umweltbundesamt |
| WK _{max} | maximale Wasserkapazität |

1. Veranlassung und Zielsetzung des Forschungsvorhabens

In einer Vielzahl von Screening- und Monitoring-Untersuchungen wurden Pharmaka-Rückstände unterschiedlicher Indikationsgruppen in Abwasser- und Oberflächenwasserproben nachgewiesen. Damit sind diese biologisch wirksamen Substanzen als eine neue Klasse der Umweltchemikalien anzusehen, über deren Verhalten in den Umweltmedien Wasser, Sediment und Boden bisher jedoch nur wenig bekannt ist. Schließlich spielen umweltchemische und ökotoxikologische Studien, wie sie z.B. für Pflanzenschutzmittel im Pflanzenschutzgesetz verankert sind, für die Zulassung von Humanpharmaka nach dem Arzneimittelgesetz heute noch eine eher untergeordnete Rolle. Die Europäische Arzneimittelagentur (EMEA) hat allerdings in den vergangenen Jahren Konzepte zur Umweltbewertung von Humanpharmaka-Rückständen erarbeitet (EMEA, 2001). Für 2003 war so die Verabschiedung eines Bewertungskonzeptes in Form eines Leitfadens geplant, der sich an der EMEA-Richtlinie für die Zulassung von Veterinärpharmaka orientiert (EMEA, 1998). Dabei entscheidet die Überschreitung eines konzentrationsabhängigen Schwellenwertes (Trigger), der aus einer Expositionsschätzung (Phase I) basierend auf Anwendungsmuster, Produktionsmenge und Eintragspfad in verschiedene Umweltmedien abzuleiten ist, über die weitere Durchführung umweltchemischer und ökotoxikologischer Tests (Phase II). Dieses modifizierte Zulassungsverfahren gilt allerdings nur für neue Arzneistoffe, während zugelassene Alt-Arzneimittel mit relevanten Vermarktungsmengen auch weiterhin nicht einbezogen werden sollen (Rönnefahrt et al., 2002).

Humanpharmaka unterliegen nach Einnahme im menschlichen Metabolismus Abbaureaktionen, so dass unveränderte Wirkstoffe und gebildete Metaboliten wieder ausgeschieden werden (Haberer und Ternes, 1996, Heberer und Stan, 1998). Aus der Tatsache, dass diese Substanzen in Zu- und Abläufen von kommunalen Kläranlagen nachgewiesen werden, lässt sich eine nur unvollständige Elimination während der Abwasserreinigung ableiten (Hirsch et al., 1996, Stumpf et al., 1996a und b, Ternes, 1998). Für Humanpharmaka-Rückstände stellen damit kontaminierte Abwässer den hauptsächlichen Eintragspfad in die Umwelt dar (Sacher et al., 1998). Aus den gemessenen Konzentrationswerten für einzelne Arzneistoffe aus verschiedenen Indikationsgruppen ist unter der Zugrundelegung des Grenzwertes der Trinkwasser-Verordnung für Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe von $100 \text{ ng Einzelsubstanz L}^{-1}$ ein relevanter Bei-

trag zur Belastung von Oberflächengewässern abzuleiten (TVO, 2001) (**Tab. 1.1**). Auch wenn die gefundenen Konzentrationswerte unterhalb der humantherapeutisch begründeten Wirkungsschwelle liegen, ist eine Minderung der Wasserqualität zu konstatieren und aufgrund möglicher adverser Effekte, wie z.B. endokriner Wirkungen oder Antibiotika-Resistenzförderung, langfristig nicht zu akzeptieren (Heberer und Stan, 1998).

Durch Uferfiltration und Oberflächenwasserverrieselung zur artifiziellen Grundwasseranreicherung für die Trinkwassergewinnung sowie die landwirtschaftliche Nutzung kontaminierten Klärschlämme ist auch der Eintrag von Humanpharmaka-Rückständen in terrestrische Systeme vorgezeichnet. Ebenfalls zu berücksichtigen sind diesbezüglich Rückstände von Veterinärpharmaka, die nach Verabreichung und Ausscheidung durch behandelte Tierbestände in feste und flüssige Wirtschaftsdünger gelangen, mit diesen ausgebracht werden und somit zu einer zumindest temporären Bodenkontamination führen. In Abhängigkeit von physiko-chemischen Eigenschaften der Pharmaka-Rückstände und der kontaminierten Böden können diese Problemstoffe mit dem perkolierenden Sickerwasser einer Verlagerung in tiefere Bodenhorizonte bis in den Grundwasserleiter unterliegen. Nachweise von Arzneistoffen in Grund- und Trinkwasser verdeutlichen, dass diese zum Teil persistenten Substanzen weder durch die Bodenpassage noch durch die Trinkwasseraufbereitung vollständig entfernt werden können (Heberer und Stan, 1996, Heberer et al., 1997). Darüber hinaus kann aus der Einleitung kontaminierten Dränagewassers und durch Oberflächenabfluss nach Starkregenereignissen eine diffuse Belastung von Oberflächengewässern resultieren.

Begründet in der möglichen Umweltrelevanz dieser Eintragspfade in Böden und unter dem Vorsorgeaspekt des nachhaltigen Schutzes von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser, war es deswegen die Zielsetzung dieses Forschungsvorhabens, das Rückstandsverhalten ausgewählter Humanpharmaka in Böden zu untersuchen. Veterinärpharmaka verschiedener Indikationsgruppen finden dagegen im zweiten vom UBA geförderten und im Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik, in Zusammenarbeit mit dem Zoologischen Institut, beide TU Braunschweig, bearbeiteten Forschungsvorhaben[#] Berücksichtigung (Kreuzig et al., 2005a).

[#] FKZ 202 67 435: "Untersuchungen zum Abflussverhalten von Veterinärpharmaka bei Ausbringung von Gülle auf Ackerland und Weide" (kurz: "Runoff-Projekt")

Tab. 1.1: Konzentrationen häufig nachgewiesener Pharmaka-Rückstände in Abwasser und Oberflächenwasser

| Indikationsgruppe/ Wirkstoff | Abwasser [ng L ⁻¹] | Oberflächen- wasser [ng L ⁻¹] | Literatur |
|---------------------------------|-----------------------------------|---|--|
| Analgetika | | | |
| Acetylsalicylsäure | 1500 | 340 | Heberer und Stan (1998) |
| Paracetamol | 2600 | nb | Stumpf et al. (1996a) |
| Phenazon | 410 | 950 | Ternes (1998) |
| Antiepileptika | | | |
| Carbamazepin | 6300 | 2100 | Sacher et al. (1998) |
| | | | Ternes (1998) |
| Antiphlogistika | | | |
| Diclofenac | 2100 | 1200 | Buser et al. (1998) |
| Ibuprofen | 3400 | 530 | Sacher et al. (1990) |
| Ketoprofen | 380 | 120 | Ternes (1998) |
| Bronchospasmolytika | | | |
| Clenbuterol | 181 | 5 | Hirsch et al. (1996) |
| Salbutamol | 174 | 35 | Ternes (1998) |
| Cytostatika | | | |
| Cyclophosphamid | 146 | nb | Heberer und Stan (1998) |
| Ifosfamid | 2900 | nb | Steger-Hartmann et al. (1999), Ternes (1998) |
| Estrogene | | | |
| Estradiol | 21 | nb | Stumpf et al. (1996b) |
| Ethinylestradiol | 62 | 4 | Spengler et al. (1999) |
| Mestranol | 20 | 1 | Ternes et al. (1999) |
| Lipidsenker | | | |
| Bezafibrat | 4600 | 3100 | Heberer und Stan (1996) |
| Clofibrat* | 1560 | 550 | Stumpf et al. (1996a) |
| Fenofibrat* | 1190 | nb | Ternes (1998) |
| Psychopharmaka | | | |
| Diazepam | 40 | nb | Ternes (1998) |
| β-Rezeptorenblocker | | | |
| Metoprolol | 2200 | 1540 | Hirsch et al. (1996) |
| Propanolol | 286 | 98 | |
| Sulfonamide | | | |
| Sulfadiazin | 100 | 7 | Hartig et al. (1999) |
| Sulfamethoxazol | 2460 | 85 | |

* : bestimmt als Metabolit, nb: nicht bestimmbar

In diesem Vorhaben^{##} galt es, Labortestsysteme zu entwickeln, in denen Abbau und Sorption als konzentrationsbestimmende Prozesse für Pharmaka-Rückstände in Böden untersucht werden können. Im ersten Ansatz wurden mittels Standardtestsystmen Basisdaten zur mikrobiellen Abbaubarkeit und zur Mobilität in Böden ermittelt. Hierbei basierten die Testsysteme auf Richtlinien der BBA (1986a) und OECD (1981a, b), die im Zulassungsverfahren von Pflanzenschutzmitteln, aber auch in der Phase II-Bewertung für Veterinärpharmaka gemäß EMEA (1998) Anwendung finden. Die zu untersuchenden Substanzen wurden als ¹⁴C-markierte Radiotracer, gelöst in einem geeigneten organischen Lösungsmittel (Standard-Applikation), direkt zu verschiedenen Böden dotiert, um Verhalten und Verbleib mittels detaillierter Massenbilanzen unter Berücksichtigung der Mineralisation sowie der Bildung extrahierbarer und nicht-extrahierbarer Rückstände charakterisieren zu können.

In einem zweiten, spezifischeren Ansatz erfolgte eine differenzierte Betrachtung von mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbauprozessen. In Ergänzung zu den in Batch-Equilibrium-Experimenten ermittelten Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten (K_d -, K_{OC} -Werte) wurden auch Säulen- und Laborlysimeter-Experimente (BBA, 1986b, OECD 2002a, Rückert, 1997, Wang et al., 1998) durchgeführt, um Matrix- und präferentiellen Fluss als Prozesse der Verlagerung im Labormaßstab berücksichtigen zu können. Hierfür wurden geschlossene Labortestsysteme entwickelt, die die simultane Erfassung von Mineralisation sowie Boden- und Perkolatkontamination und somit Abbau und Verlagerung als gleichzeitig ablaufende Prozesse in Böden ermöglichen.

Im dritten Ansatz wurde der Eintragspfad durch kontaminierten Klärschlamm simuliert. Auf der Basis von Stabilitätstests für ausgewählte Pharmaka in Klärschlamm einer kommunalen Kläranlage wurde Testklärschlamm hergestellt, der mit den Radiotracern dotiert und zur definierten Alterung der Rückstände inkubiert wurde. Dieser Testklärschlamm wurde dann in den Abbau- und Verlagerungsexperimenten eingesetzt, um den Einfluss dieses Eintragspfades und die sich durch den Klärschlamm selbst ergebenden Matrixeffekte zu erkennen.

^{##} kurz: "Boden-Projekt"

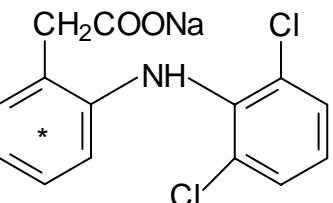
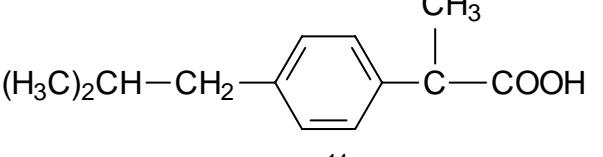
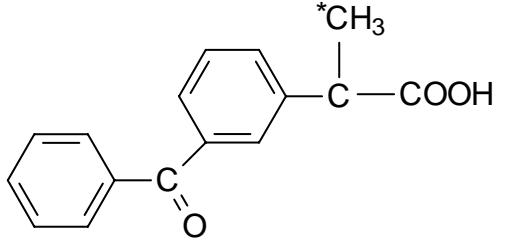
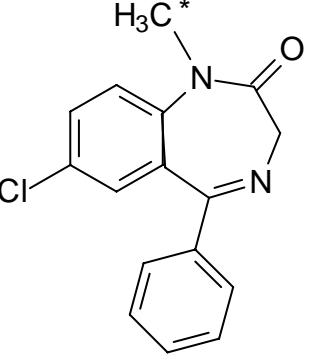
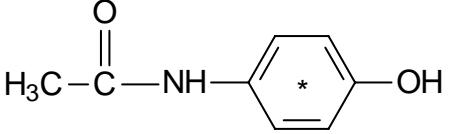
2. Auswahl der pharmazeutischen Substanzen

Die Auswahl der pharmazeutischen Substanzen erfolgte zu Beginn dieses Forschungsvorhabens gemäß folgender Kriterien:

- Aufgrund der jährlichen Produktionsmengen und der medizinisch verordneten Tagessdosen sind für die Substanzen beträchtliche diffuse Stoffeinträge in aquatische Systeme anzunehmen.
- Die ausgewählten Substanzen wurden bereits in Monitoring-Programmen nachgewiesen bzw. ihr Rückstandsverhalten in Abbauprozessen in Batchreaktoren oder Laborkläranlagen untersucht.
- Für die erfolgreiche Durchführung dieses Forschungsprojektes war es eine Grundvoraussetzung, die Substanzen als ^{14}C -markierte Radiotracer einzusetzen, um Verhalten und Verbleib dieser Pharmaka in Böden anhand detaillierter Massenbilanzen unter Berücksichtigung der Mineralisation und der Bildung extrahierbarer sowie nicht-extrahierbarer Rückstände zu beschreiben. Diese Vorgehensweise ist für toxikologische Untersuchungen von Arzneimitteln sowie für die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln eine seit Jahrzehnten etablierte Methodik.

Die ausgewählten Humanpharmaka sind hiernach die sauren Antiphlogistika Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen und Paracetamol sowie das basische Psychopharmakon Diazepam, die als ^{14}C -markierte Radiotracer eingesetzt wurden. Die spezifische Aktivität und die radiochemische Reinheit lagen bei $200\text{-}2260 \text{ MBq mmol}^{-1}$ bzw. 80-97 %. Die Strukturformeln mit der jeweiligen Position der ^{14}C -Markierung sind in **Tab. 2.1** dargestellt. Dabei wurden Diclofenac und Paracetamol in den Labortestsystemen als Phenylring-U- ^{14}C -markierte Radiotracer appliziert, während die anderen Pharmaka seitenketten-markiert waren. Da kein Stabilitätsvergleich zwischen den einzelnen Substanzen anzustellen war, ist es von untergeordneter Bedeutung, dass bei letzteren die Markierung nicht in der stabilsten Molekülgruppierung vorliegt. Ferner sind die durch Mineralisation bedingte Freisetzung von ^{14}C -Kohlendioxid aus dem applizierten Radiotracer und die Bildung von Metaboliten als simultan auftretende Prozesse anzusehen, so dass aus der Markierungsposition nicht zwangsläufig unterschiedliche Mineralisationsraten abzuleiten sind.

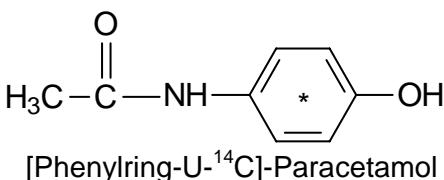
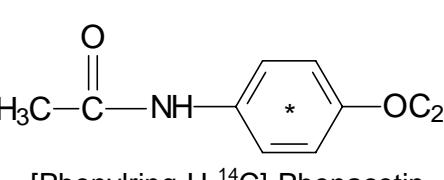
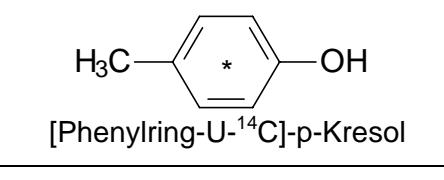
Tab. 2.1: Strukturen der ^{14}C -markierten pharmazeutischen Substanzen

| Arzneistoffe | Strukturformel der Radiotracer |
|---|--|
| Diclofenac [2-(2,6-Dichloranilino)-phenyl]-essigsäure |  <p>[Phenylring-U-^{14}C]-Diclofenac-natrium</p> |
| Ibuprofen 2-(4-Isobutylphenyl)-propionsäure |  <p>[Propionsäure-3-^{14}C]-Ibuprofen</p> |
| Ketoprofen 2-(3-Benzoylphenyl)-propionsäure |  <p>[Propionsäure-3-^{14}C]-Ketoprofen</p> |
| Diazepam 7-Chlor-1-methyl-5-phenyl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-on |  <p>[N-methyl-^{14}C]-Diazepam</p> |
| Paracetamol 4-Aacetamidophenol |  <p>[Phenylring-U-^{14}C]-Paracetamol</p> |

Das zeigten auch Untersuchungen zur mikrobiellen Abbaubarkeit des Morphin-Fungizides Fenpropimorph, das in Laborbatchexperimenten sowohl als U-¹⁴C-Phenylring- als auch als ¹⁴C-Morpholinring-markierter Radiotracer appliziert wurde (Kreuzig und Dieckmann, 1999).

Mit Ibuprofen und Ketoprofen wurden Strukturanaloga berücksichtigt, deren Untersuchungen Erkenntnisse liefern, inwieweit das Rückstandsverhalten in Böden von Strukturmerkmalen der isobutyl- und benzoyl-substituierten Phenylpropionsäure-Derivate beeinflusst wird. Entsprechend hierzu wurden ¹⁴C-Phenacetin und ¹⁴C-p-Kresol als strukturanealoge Verbindungen von Paracetamol untersucht (**Tab. 2.2**).

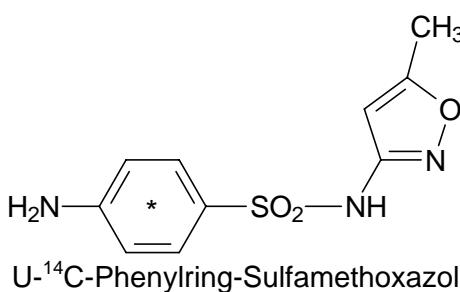
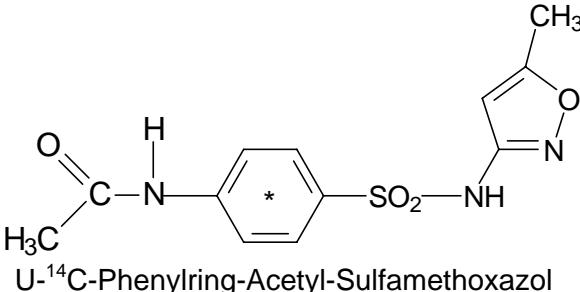
Tab. 2.2: Strukturen von ¹⁴C-markiertem Paracetamol und strukturanalogen Verbindungen

| Arzneistoff, Strukturanaloga | Strukturformel der Radiotracer |
|---|---|
| Paracetamol 4-Acetamidophenol |  <p>[Phenylring-U-¹⁴C]-Paracetamol</p> |
| Phenacetin 4-Acetamidophenoxyethylether |  <p>[Phenylring-U-¹⁴C]-Phenacetin</p> |
| p-Kresol 4-Methyl-phenol |  <p>[Phenylring-U-¹⁴C]-p-Kresol</p> |

Darüber hinaus wurde für das überwiegend in der Humanmedizin verabreichte Sulfonamid Sulfamethoxazol der Aspekt verfolgt, dass nach der Arzneimitteleinnahme überschüssige Ausgangsverbindungen zusammen mit gebildeten Metaboliten ausgeschieden werden. So wurde Acetyl-Sulfamethoxazol als Primärmetabolit dieses Sulfonamides in die Untersuchungen einbezogen (**Tab. 2.3**), für den anzunehmen ist, dass aus diesem in Wasser und Boden durch hydrolytische Spaltung wieder die Ausgangsver-

bindung zurückgebildet wird. Diese Umwandlung konnte bereits von Balizs et al. (1994) im Muskelgewebe von Schweinen nachvollzogen werden, während Langhammer (1989) in Schweinegülle die Rückführung von Acetyl-Sulfadimidin in Sulfadimidin beschrieb. Diese Untersuchungen zum Rückstandsverhalten von Sulfamethoxazol stellen ferner die direkte Schnittstelle zum "Runoff-Projekt" (s. S. 2) dar, in dem mit der Untersuchung von Sulfadiazin, Sulfadimidin und Sulfamethoxazol und deren Eintrag in Böden durch kontaminierte Wirtschaftsdünger die Bedeutung der Sulfonamide als Umweltchemikalien unterstrichen wird (Boxall et al., 2002; Thiele-Bruhn, 2003).

Tab. 2.3: Strukturen von ^{14}C -Sulfamethoxazol und korrespondierendem Metaboliten

| Arzneistoff, Metabolit | Strukturformel der Radiotracer |
|---|--|
| Sulfamethoxazol $\text{N}^1\text{-}(\text{5-Methyl-3-isoxazolyl})\text{-sulfanilamid}$ |  <p>U-^{14}C-Phenylring-Sulfamethoxazol</p> |
| Acetyl-Sulfamethoxazol $\text{N}^4\text{-}(\text{3-Acetyl})\text{-N}^1\text{-}(\text{5-methyl-3-isoxazolyl})\text{-sulfanilamid}$ |  <p>U-^{14}C-Phenylring-Acetyl-Sulfamethoxazol</p> |

3. Auswahl und Charakterisierung der untersuchten Böden

3.1 Bodeneigenschaften

Die Auswahlkriterien für die in den Labortestsystemen untersuchten Bodenproben berücksichtigten zum einen deutlich unterschiedliche physiko-chemische Eigenschaften, um bodenspezifische Einflüsse auf das Rückstandsverhalten der pharmazeutischen Substanzen aufzeigen zu können. Zum anderen wurden Proben aus Oberböden entnommen, die ein weites Spektrum in Deutschland landwirtschaftlich genutzter Böden abdecken. Entnahmeorte waren Neuenkirchen (NK) im Harzvorland und Nienwohlde (NW) in der südlichen Lüneburger Heide. Darüber hinaus sollte auch eine weitgehende Ähnlichkeit zu europäischen Referenzböden, wie z.B. EUROSOL 4 (Gawlik et al., 1999) bzw. LUFA 2.2 (LUFA, 2003), gegeben sein. In **Tab. 3.1** sind die Bodeneigenschaften vergleichend gegenübergestellt.

Tab. 3.1: Eigenschaften der untersuchten Bodenproben aus Ap-Horizonten eines Parabraunerde-Gebietes des Harzvorlandes und aus der südlichen Lüneburger Heide im Vergleich zu Referenzböden (Gawlik et al., 1999, LUFA, 2003)

| Standort | EUROSOL 4 | Neuenkirchen (NK) | Nienwohlde (NW) | LUFA 2.2 |
|-------------------------|------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| Landschaft | Normandie | Harzvorland | Lüneburger Heide | Rheinpfalz |
| Vegetation | --- | Weizen | Kartoffel | --- |
| Bodentyp | Parabraunerde | Parabraunerde | Braunerde | Braunerde |
| Bodenart | U | tU | uS | IS |
| Sand [%] | 4.1 | 4.7 | 76.8 | 73.2 |
| Schluff [%] | 75.7 | 78.4 | 19.1 | 18.5 |
| Ton [%] | 20.3 | 17.0 | 4.2 | 8.2 |
| C _{org} [%] | 1.6 | 1.4 | 0.8 | 2.3 |
| pH (CaCl ₂) | 6.8 | 7.2 | 5.4 | 5.8 |
| WK _{max} [%] | --- | 33.0 | 26.6 | --- |

T, t: Ton, tonig, L, l: Lehm, lehmig, U, u: Schluff, schluffig, S, s: Sand, sandig

Zusätzlich wurden für Tests zur Verlagerung von Pharmaka-Rückständen auch Proben eines schluffigen Tonbodens am Standort Adenstedt im Ambergau entnommen, an dem auch die Testplot-Studien zum Oberflächenabfluss von Veterinärpharmaka nach Gülleausbringung und Beregnung durchgeführt wurden (s. "Runoff-Projekt", S.2). Die hier anzutreffenden Bodeneigenschaften des Ackerstandortes (AD-A) sind Sand: 5 %, Schluff: 56 %, Ton: 39 %, C_{org}: 1.6 %, pH: 6.9), während die des Grünlandstandortes (AD-G; Sand: 2 %, Schluff: 59 %, Ton: 39 %, C_{org}: 3.0 %, pH: 4.5) insbesondere im C_{org}-Gehalt und dem pH-Wert differierten.

3.2 Entnahme von gestörten Bodenproben

Für die Laborbatchexperimente zur Abbaubarkeit der Pharmaka-Rückstände sowie für die Ermittlung der Mobilität von Pharmaka-Rückständen in Böden mittels Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten und Säulenexperimenten wurden aus den Ap-Horizonten (0-5 cm) gestörte Bodenproben entnommen. Einzelproben wurden zu Mischproben vereinigt und durch Sieben < 2 mm homogenisiert, anschließend aliquotiert und bis zum Einsatz in den Labortestsystemen bei -20 °C gelagert. Vor Beginn jeder Versuchsserie wurden die Bodenproben bei Raumtemperatur aufgetaut und bis zum eigentlichen Ansatz regelmäßig durch Befeuchten und Mischen konditioniert, um ein Austrocknen zu verhindern und so die bodeninhärente mikrobielle Aktivität zu erhalten.

Tab. 3.2: Mikrobielle Aktivitäten der untersuchten Böden

| Bodenart | Sauerstoffzehrung [#] [mg O ₂ 100 g ⁻¹ TS h ⁻¹] | C _{Biomasse} [mg C] | C _{Biomasse} / C _{org} [%] |
|--|---|---------------------------------|---|
| toniger Schluff | 1.1 | 30.8 | 2.2 |
| schluffiger Sand | 0.4 | 11.2 | 1.4 |
| schluffiger Ton (Ackerstandort) | 2.1 | 58.8 | 3.7 |
| schuffiger Ton (Grünlandstandort) | 3.3 | 92.4 | 3.1 |

[#] gemessen als substratinduzierte Respiration (BBA, 1990)

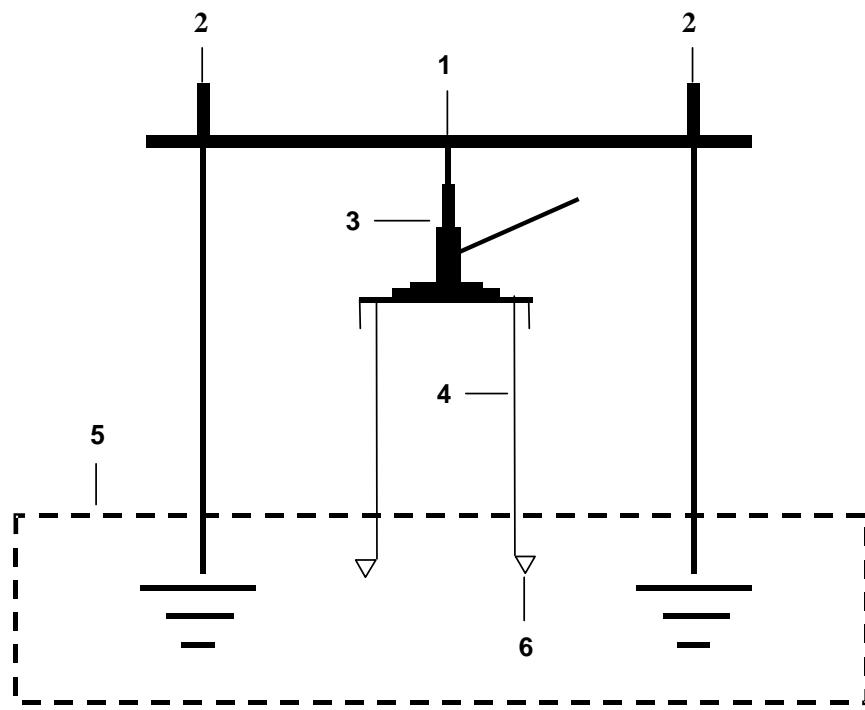
Für die Abbautests wurde der Wassergehalt der Bodenproben auf ca. 40 % der maximalen Wasserkapazität eingestellt, während in den Säulenexperimenten zur Ermittlung von Verlagerungstendenzen luftgetrocknete Bodenproben (Bodenfeuchte ca. 3 %) eingesetzt wurden. Gleichzeitig wurde die mikrobielle Bodenaktivität mittels substratinduzierter Respiration (SIR) ermittelt (Anderson und Domsch, 1987, BBA, 1990). Dabei zeigte sich der tonige Schluff gegenüber dem schluffigen Sand als der mikrobiell aktiver Boden. Die Daten zur stündlichen Sauerstoffzehrung und die mikrobielle Biomasse sind in **Tab. 3.2** aufgelistet. Eine deutlich höhere Sauerstoffzehrung von 2.1 bzw. 3.3 mg O₂ 100 g⁻¹ TS h⁻¹ wurden für die Bodenproben von Acker- und Grünlandstandort in Adenstedt ermittelt. Beim niedrigsten Wert für den schluffigen Sand von 0.4 mg O₂ 100 g⁻¹ TS h⁻¹ errechnet sich noch ein Gehalt an Kohlenstoff in der mikrobiellen Biomasse von C_{Biomasse}: 11.2 mg 100 g⁻¹ TS, entsprechend einem C_{Biomasse}/C_{org}-Verhältnis > 1%. Diesbezüglich sind die Kriterien für die Bodenauswahl nach OECD-Richtlinie 307 auch für diesen Boden erfüllt (OECD, 2002a). Zur Erfassung chemischer Prozesse auf die Abbaubarkeit der Pharmaka-Rückstände wurden die verwendete Bodenproben zuvor im Autoklaven an 3 aufeinanderfolgenden Tagen 2 x 20 min bei 140 °C und 3 x 10⁵ Pa mikrobiell inaktiviert. Eine Bodenprobe galt dann als mikrobiell inaktiv, wenn die Sauerstoffzehrung < 0.1 mg O₂ 100 g⁻¹ TS h⁻¹ war.

3.3 Entnahme von ungestörten Bodenproben

Zur Ermittlung von Verlagerungstendenzen wurden aus den Oberböden der 3 Standorte auch Bodenkerne mit ungestörter Bodenstruktur entnommen. Hierzu wurden zum einen Edelstahlstechringe (Höhe: 6 cm, ID: 8.5 cm) in den Oberboden gedrückt. Die Bodensäulen wurden abgegraben und abgekippt, ohne dabei das gewachsene Poren- system zu stören und somit die Wasserleitfähigkeit zu beeinträchtigen. Die Probenahme erfolgte an den Standorten Neuenkirchen und Adenstedt zum einen auf einer über eine Vegetationsperiode ausgebildeten Bodenoberfläche nach der Zuckerrüben- bzw. Weizenernte (Weizenstoppel) und zum anderen nach der sich anschließenden Saatbettbereitung, die durch Grubber- bzw. Pflugeinsatz ein Bröckel- bis Krümelgefüge im Oberboden bedingte.

Auf der Weizenstoppelfläche in Adenstedt wurden außerdem Bodenmonolithen von 30 cm Höhe und 15 cm ID entnommen. Hierzu wurde jeweils ein entsprechendes PVC-

Rohr mittels eines hydraulischen Entnahmesystems in den Boden eingelassen (**Abb. 3.1**). Diese Bodenmonolithen wurden wiederum durch Abgraben und Abkippen gewonnen (Nordmeyer und Aderhold, 1994, Wang et al., 1998) und, zur Verhinderung der Absättigung des Bodens, auf einem wassergesättigtem Quarzsandbett ins Laboratorium transportiert. Bis zum zeitnahen Beginn der Lysimeterexperimente wurden die Bodenmonolithen bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor dem Einsetzen in die geschlossenen Laborlysimetersysteme wurde der Anfangswassergehalt durch Sättigung und anschließende Absättigung auf Feldkapazität eingestellt.



1: Drucktraverse, **2:** Erdanker, **3:** Hydraulikheber, **4:** PVC-Rohr, **5:** Bodenoberfläche, **6:** Stechring

Abb. 3.1: Hydraulisches Entnahmesystem für Bodenmonolithen (30 cm Höhe, 15 cm ID) (Nordmeyer und Aderhold, 1994, Wang, 1999)

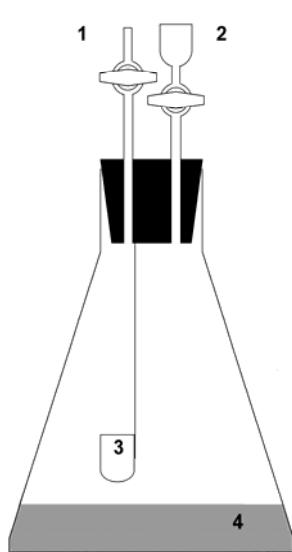
4. Design der Labortestsysteme

Für die Elimination in Böden eingetragener organischer Umweltchemikalien stellen Abbaureaktionen die relevantesten konzentrationsbestimmenden Prozesse dar. Neben chemischen und photolytischen Abbaureaktionen sind in terrestrischen Oberböden, in denen aerobe Milieubedingungen in Abhängigkeit vom Wasserhaushalt vorherrschen, durch Bodenmikroorganismen enzymatisch katalysierte Hydrolyse- und Oxidationschritte von besonderer Bedeutung, die die eingetragenen Ausgangsverbindungen in polarere Metaboliten und, im Idealfall der Mineralisation, in Kohlendioxid und Wasser umwandeln. Gleichzeitig können aber auch Ausgangsverbindungen und Metaboliten in der Bodenmatrix als nicht-extrahierbare Rückstände festgelegt werden (Agnihotri und Barooah, 1994, Geveo et al., 2000). Diese Prozesse determinieren die Persistenz eines organischen Fremdstoffes in Böden. Eine umweltrelevante Persistenz für z.B. Pflanzenschutzmittel ist gegeben, wenn die Konzentrationsabnahme des applizierten Wirkstoffes Werte von $DT_{90} > 100$ Tage unter Laborbedingungen oder $DT_{90} > 1$ Jahr unter Freilandbedingungen annimmt (BBA, 1992). Als weitere Kriterien des Zulassungsverfahrens für Pflanzenschutzmittel werden diesbezüglich die Mineralisation mit < 5 % und die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände mit > 70 % in jeweils 100 Tagen herangezogen (BBA, 1998).

4.1 Batchexperimente zum mikrobiellen Abbau

Insbesondere Mineralisation und Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände können nur mittels Radiotraceranalytik erfasst werden, die den Einsatz geschlossener Labortestsysteme erfordert. Für Untersuchungen mikrobieller und chemischer Abbauprozesse in Böden wurde die in **Abb. 4.1** illustrierte Batchapparatur eingesetzt. Das Test-Design zur mikrobiellen Abbaubarkeit von Pharmaka-Rückständen in Böden entsprach dabei weitgehend den Standardmethoden von BBA (1986a) und OECD (1981a, 2002a). Hierzu wurden mikrobiell aktive Bodenproben (50 g), eingestellt auf ca. 40 % der maximalen Wasserkapazität (WK_{max}), mit den Radiotracern, gelöst in einem geeigneten, die mikrobielle Bodenaktivität nicht beeinflussenden Lösungsmittel, wie z.B. Methanol, dotiert (Standard-Applikation). Die applizierte Radioaktivitätsmenge betrug 0.08-0.12 MBq, woraus sich in Abhängigkeit von der jeweiligen spezifischen Radioaktivität der

Radiotracer eine Anfangskonzentration von $230\text{-}2390 \mu\text{g kg}^{-1}$ Boden errechnete. Anschließend wurden die Ansätze im Dunkeln bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$ für 0, 1, 3, 7, 14, 28, 56 und 102 Tage inkubiert (Dunkelexperimente). Neben der Bilanzierung jedes Batchexperiments wurden zur Qualitätskontrolle die 28 und 102 Tage-Experimente doppelt ange setzt und analysiert.



1: Einlassventil, **2:** Auslassventil mit Aktivkohlefilter, **3:** ^{14}C -Kohlendioxid-Absorptionsfalle (8 mL 0.1 M Kaliumhydroxid-Lösung), **4:** Probe

Abb. 4.1: Batchapparatur für Abautests von Chemikalien

Alle 3 bis 4 Tage wurden die Absorptionslösungen zur Ermittlung der Mineralisationsraten ausgetauscht und die Versuchsapparaturen zur Gewährleistung aerober Milieubedingungen belüftet. Mit Ablauf der entsprechenden Inkubationsintervalle wurden die Kolben mit Stopfen verschlossen und bis zur anschließenden Analyse bei -20°C gelagert. Im ersten Schritt folgte dann eine Extraktion mit Ethylacetat, das sich in Vorversuchen zur Extraktionseffizient als geeignetestes Lösungsmittel erwies. Die Extrakte wurden ferner mittels Radio-Dünnschichtchromatographie (RTLC) analysiert, um mittels Vergleich der Retentionsfaktoren (R_F -Werte) zwischen applizierter Ausgangsverbindung und gebildeten Umwandlungsprodukten eine Differenzierung vornehmen zu kön-

nen. ^{###}

Die Extraktionsrückstände wurden jeweils getrocknet, zerkleinert, homogenisiert, aliquotiert und schließlich nach Zugabe von Cellulose einer Totaloxidation in einem Verbrennungsautomaten unterzogen, bei der die nicht-extrahierte Radioaktivität in ¹⁴C-Kohlendioxid umgewandelt wurde. Dieses wurde in einem Szintillationscocktail auf Aminbasis aufgefangen und mittels Flüssigszintillationszählung als Summenparameter für nicht-extrahierbare Rückstände quantifiziert. Die detaillierte Versuchsdurchführung für diese Experimente ist bei Kreuzig et al. (2003) und bei Kreuzig und Höltge (2005) beschrieben.

Neben diesen Standardbedingungen wurden für ¹⁴C-Ibuprofen exemplarisch auch Tests zur Abhängigkeit des mikrobiellen Abbaus von der Bodenfeuchte und Bodentemperatur durchgeführt. Eingesetzt wurden Bodenproben des tonigen Schluffes (NK) und des schluffigen Sandes (NW), die auf 3, 13 (entsprechend $WK_{max} = 33\%$) und 25 % bzw. 3, 11 (entsprechend $WK_{max} = 27\%$) und 20 % Bodenfeuchte eingestellt wurden. Die Inkubationstemperaturen betrugen 20 und $30 \pm 1^\circ C$. Die Inkubationsperiode war 7 Tage.

4.2 Batchexperimente zum chemischen Abbau

In dieser Batchapparatur wurden ebenfalls chemische Abbauprozesse betrachtet. Hierzu wurden mittels Autoklavieren mikrobiell inaktivierte Bodenproben eingesetzt, mit den Radiotraceren dotiert, mit autoklaviertem Wasser auf ca. 40 % der WK_{max} eingestellt und wiederum im Dunkeln bei $20 \pm 1^\circ C$ für 3 Tage (Kurzzeittests) inkubiert. Denn bei längeren Inkubationsintervallen ist unter diesen Feuchte- und Temperaturbedingungen mit der erneuten Sporulation verschiedener bodeninhärenter Mikroorganismen und damit einhergehend mit einem erneuten Anstieg der mikrobiellen Bodenaktivität zu rechnen. Die Analysen der Proben erfolgten wie bereits oben beschrieben.

^{###} In der Ergebnisdarstellung vom Metaboliten-Screening werden in Kapitel 5 die jeweiligen Ausgangsverbindungen explizit mit z.B. "¹⁴C-Ibuprofen als unveränderte Ausgangsverbindung" ausgewiesen. Die Bezeichnungen z.B. "¹⁴C-Ibuprofen-Rückstände" bzw. "% der applizierten Radioaktivität" beziehen sich auf die Gesamtrückstände, ohne dass hier zwischen Ausgangsverbindung und Umwandlungsprodukten differenziert wurde.

4.3 Tests zur Stabilität in Klärschlamm

Der Eintragspfad für Humanpharmaka-Rückstände durch Klärschlämme ist dann als umweltrelevant einzustufen, wenn diese Rückstände während der Lagerung der Klärschlämme, deren Dauer einige Tage bis hin zu einigen Wochen in den Wintermonaten beträgt, eine ausreichend hohe Persistenz zeigen. Deswegen wurden im Rahmen dieses hier verfolgten mehrstufigen Untersuchungskonzeptes Stabilitätstests in Klärschlamm durchgeführt. Der Klärschlamm wurde von der kommunalen Kläranlage Weddel des Wasserverbandes Lehre/Weddel, Niedersachsen, bezogen, der diesen anhand folgender Parameter charakterisiert: TS: 2 % mit 73 % organische Substanz und 27 % mineralische Substanz, pH: 6.5, Gesamt-Stickstoff: 69 kg L⁻¹, basisch wirkende Bestandteile: <10 kg L⁻¹, AOX: 192 mg L⁻¹. Die Klärschlammproben (80 g) wurden in die Batchapparatur eingefüllt, mit den einzelnen Radiotracern (0.1 MBq) dotiert und, entsprechend der Bodenuntersuchung, im Dunkeln bei 20 ± 1 °C für 0, 1, 3, 7, 14, 28, 56 und 102 Tage inkubiert. Die Absorptionslösung in der ¹⁴C-Kohlendioxid-Falle wurde zur Ermittlung der Mineralisationsraten alle 3-4 Tage ausgetauscht. Hierbei wurde in der Apparatur entsprechend den Bodenuntersuchungen ein Gasaustausch vorgenommen. Die radiotraceranalytischen Methoden entsprachen dabei weitgehend denen der Bodenanalytik, nur dass die Extraktionsrückstände der Klärschlammproben vor dem Trocknen mit Seesand versetzt werden mussten, um eine Aggregatbildung beim Trocknungsprozess zu verhindern, die eine für die Verbrennung erforderliche Zerkleinerung und Homogenisierung erschwert hätte.

Zur Simulation des realen Eintragspfades von Pharmaka-Rückständen durch kontaminierte Klärschlämme wurden auf der Basis dieser Experimente Testklärschlamm#### hergestellt. Hierzu wurden 10 g-Klärschlammproben mit den Radiotracern (0.1 MBq) dotiert und zur kurzfristigen Alterungen der Rückstände im Dunkeln bei 20 ± 1 °C für 7 Tage inkubiert. In dieser Periode wurden die Mineralisationsraten bestimmt, um die zu den Bodenproben applizierte Radioaktivität zu quantifizieren. Um Überführungsverluste bei der Testklärschlamm-Applikation auszuschließen, wurden mikrobiell aktive und auf ca. 40 % der WK_{max} eingestellte Bodenproben (50 g) zum Testklärschlamm hinzugefügt und gründlich gemischt. Aus Praktikabilitätsgründen wurde somit eine Klär-

"Testklärschlamm" bezeichnet Klärschlammproben, die mit jeweils einer ¹⁴C-markierten pharmazeutischen Substanz dotiert und für 7 Tage zur kurzfristigen Alterung der Rückstände gelagert wurde.

schlammmenge appliziert, die die laut Klärschlamm-Verordnung (2002) in 3 Jahren applizierte Höchstmenge von 5 t ha^{-1} um den Faktor 40 überschreitet. Geringere Klärschlammengen hätten die Handhabung bezüglich der Dotiergenauigkeit und der Verluste der Radiotracer durch Adsorption an Glaswandungen beeinträchtigen können. Die einzelnen Ansätze wurden im Dunkeln bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$ für 0, 1, 3, 7, 14, 28, 56 und 102 Tage inkubiert. Die Analysen der Proben erfolgten wie bereits oben beschrieben.

4.4 Charakterisierung nicht-extrahierbarer Rückstände

Die nicht-extrahierbaren Rückstände werden durch das bei der Verbrennung freigesetzte ^{14}C -Kohlendioxid summarisch erfasst. Da diese Fraktion einer stoffspezifischen Charakterisierung nur schwer zugänglich ist, wurden die Extraktionsrückstände der Proben vom Tag 102 einer Nachextraktion mit salzaurem Methanol unterzogen, um mit diesem reaktiven Lösungsmittel die Effizienz der Ethylacetat-Extraktion zu kontrollieren und damit gleichzeitig Hinweise auf die Bindungsstärke der nicht-extrahierbaren Rückstände zu erlangen.

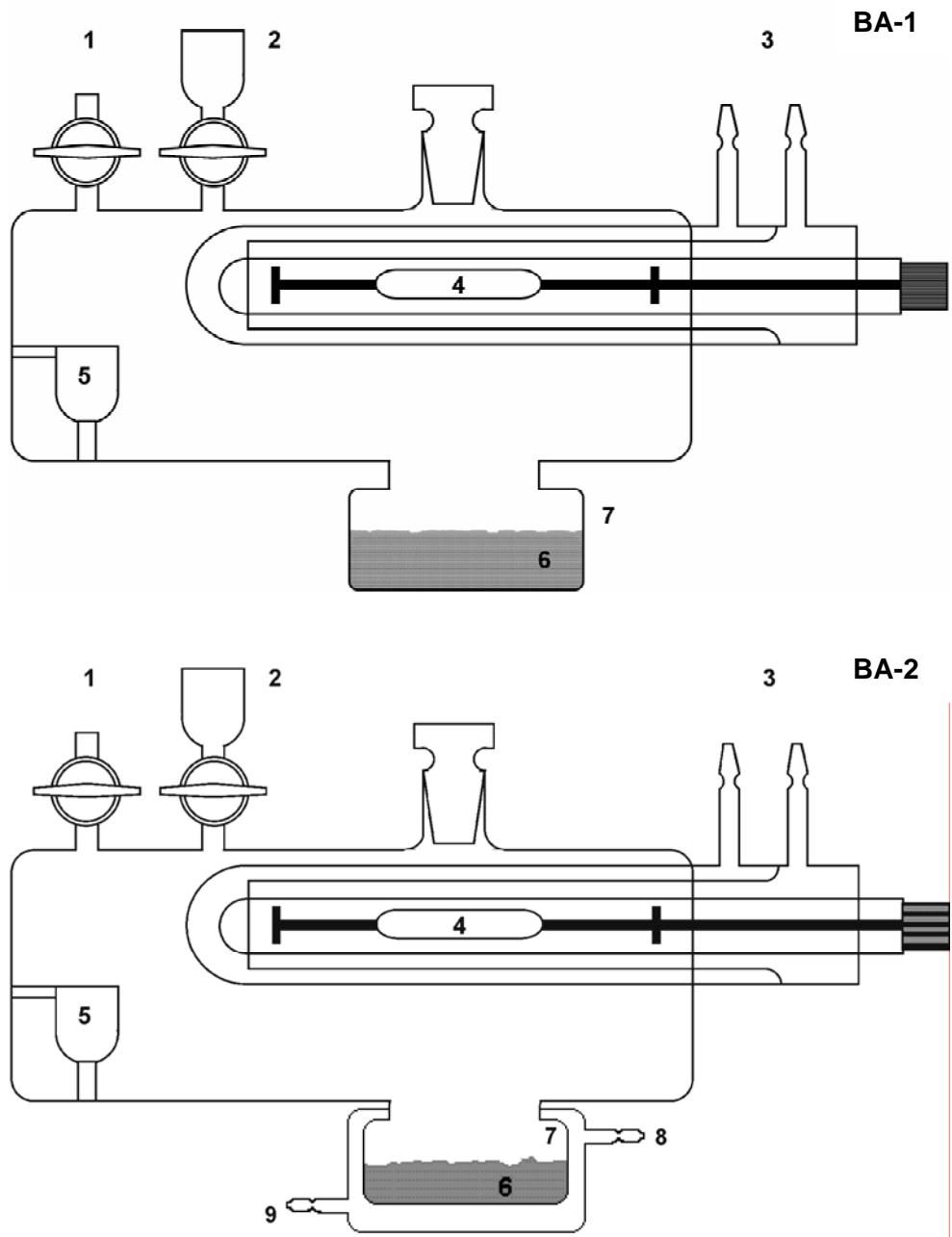
Darüber hinaus wurden Extraktionsrückstände der Ethylacetat-Behandlung, die nach Abdampfen des überschüssigen Lösungsmittels bei -20°C eingefroren waren, für weitere Batchexperimente bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Die Einstellung der Probenmatrices auf ca. 40 % der WK_{\max} erfolgte dann mit demineralisiertem Wasser bzw. mit Belebtschlamm der kommunalen Kläranlage. Danach wurden die Ansätze erneut im Dunkeln bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$ für 28 Tage inkubiert und, wie oben beschrieben, radioanalytisch untersucht.

4.5 Batchexperimente zum photoinduzierten Abbau

Bestrahlungsapparatur

Die Bedeutung photoinduzierter Einflüsse auf die Übertragbarkeit von Laborexperimenten zur mikrobiellen Abbaubarkeit des Azol-Fungizides Prochloraz auf Freilandstudien wurde bereits früher erkannt (Kreuzig, 1998, Höllrigl-Rosta et al., 1999). Um die Annahme im Freiland relevanter Lichteinflüsse im Labor nachzugehen, wurde eine Bestrahlungsapparatur entwickelt und mehrfach zur Optimierung der Versuchsbedingun-

gen modifiziert (Kreuzig et al., 2003, Kreuzig und Höltge, 2005).



- 1:** Einlassventil, **2:** Auslass mit Aktivkohlefilter, **3:** Wasser- bzw. Luftkühlung, **4:** Quecksilber- bzw. Xenon-Strahler mit Pyrex®-Kühlmantel (cut off: $\lambda = 290$ nm),
- 5:** ^{14}C -Kohlendioxid-Absorptionsfalle (8 mL 0.1 M Kaliumhydroxid-Lösung), **6:** Probe, **7:** abnehmbarer Probenbehälter, **8,9:** Wasserkühlung des Probenbehälters

Abb. 4.2: Bestrahlungsapparaturen für Radiotracer-Batchexperimente zum photoinduzierten Abbau von Chemikalien

Abb. 4.2 zeigt die vom Prototyp abgeleiteten Apparaturen BA-1 und BA-2. Bei diesen fungiert als Lichtquelle ein Quecksilber-, alternativ ein Xenon-Strahler, der mit einem Pyrex®-Kühlfinger für Wasser- bzw. Luftkühlung umgeben ist. Damit ist zur Simulation des Sonnenlichtes die untere Grenze der Lichtdurchlässigkeit (Cut off) von $\lambda = 290$ nm gewährleistet. Wesentlicher Bestandteil dieser geschlossenen Glasapparatur ist der abnehmbare Probenbehälter, der den Einsatz mikrobiell aktiver sowie inaktiver Bodenproben aller Bodenarten, verschiedene Schichtdicken und verschiedene Bodenfeuchten ermöglicht. Neben der Applikation der Pharmaka als Standardlösung ist außerdem die Applikation von Testklärschlamm bzw. Testgülle sichergestellt.

In einer Modifikation dieser Bestrahlungsapparatur (BA-2) wurde der Probenbehälter mit einer eigenen Wasserkühlung ausgestattet, um die Temperatureinflüsse der Lichtquelle zu kompensieren und so die Austrocknung der Bodenoberfläche zu minimieren. Aus dem Design dieser Bestrahlungsapparatur geht ein weites Spektrum an Einsatzmöglichkeiten hervor, womit zum einen eine direkte Vergleichbarkeit zu den Dunkelexperimenten erzielt wird und zum anderen eine Vielzahl im Freiland auftretender Parameter abgebildet werden kann.

Die Notwendigkeit der Berücksichtigung photoinduzierter Effekte auf die Abbaubarkeit von organischen Fremdstoffen in Böden spiegelt auch der Entwurf der OECD-Richtlinie (2002b) zur Phototransformation von Chemikalien auf Bodenoberflächen wider. Der Vergleich der in diesem Entwurf skizzierten gegenüber der in diesem Forschungsvorhaben praktizierten Methode zeigt einerseits eine prinzipielle Übereinstimmung in der methodischen Durchführung, andererseits aber auch deutliche Unterschiede in der Zielsetzung des Einsatzes dieser Testsysteme. In beiden Ansätzen wird von einer bevorzugten Applikation der Leitchemikalien als ^{14}C -markierte Radiotracer zu Proben der Feinbodenfraktion ≤ 2 mm ausgegangen. Gemäß den OECD-Vorgaben werden dort allerdings Boden-Dünnschichtplatten einer Schichtdicke von nur 2 mm präpariert, auf denen dann die Phototransformation auf feuchtem (75 % der WK_{\max}) und lufttrockenem Boden untersucht wird. Bezuglich dieser doch sehr artifiziellen Boden-Dünnschichtplatten können naturgemäß nur Bodenarten eingesetzt werden, die wie schluffiger oder toniger Lehm eine ausreichende Adhäsivität zu Glas- oder Metallplatten aufweisen. Damit ist der OECD-Entwurf nicht geeignet, die große Variabilität von Bodeneigenschaften, insbesondere auch leichterer Sandböden, zu berücksichtigen, was einen signifikanten Nachteil zu der hier angewandten Methode darstellt.

Der artifizielle Charakter des OECD-Systems wird noch deutlicher dadurch betont,

dass die eingesetzten Bodenproben vor der Dünnschichtplatten-Präparation luftgetrocknet werden, da, wie dort angegeben, die mikrobielle Bodenaktivität für physiko-chemische Prozesse auf Bodenoberflächen als nicht relevant anzusehen ist. Durch diese Lufttrocknung der Bodenproben kann zwar die mikrobielle Aktivität vermindert, aber nicht wie bei der Sterilisation durch Autoklavieren zumindestens temporär ausgeschaltet werden. Insgesamt wird so ein nur wenig definierter mikrobieller Zustand der Bodenproben vorliegen. Dieses ist damit als der relevante Unterschied beider Bestrahlungsapparaturen einzustufen.

Bestrahlungsexperimente

In den Probenbehälter wurden Bodenproben (50 g) eingefüllt, die auf ca. 40 % der WK_{max} eingestellt wurden. Der Einsatz mikrobiell aktiver und inaktiver Böden führte dabei zur Differenzierung des photoinduziert-mikrobiellen (PMA) und des photoinduziert-chemischen Abbaus (PCA). Die Pharmaka wurden als Standardlösungen und exemplarisch für ^{14}C -Sulfamethoxazol und ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol auch als Testklärschlamm (0.1 MBq) appliziert. Die Inkubation erfolgte bei 20 ± 1 °C mit 8 h-Licht/16 h-Dunkelperioden bzw. 10 h-Licht/14 h-Dunkelperioden über 3 Tage. Diese Bestrahlungsexperimente waren ganz gezielt als Kurzzeittests ausgelegt. Schließlich ist die Eindringtiefe des Sonnenlichtes in Böden unter Freilandbedingungen auf die oberste Bodenschicht begrenzt. Damit werden photoinduzierte Effekte durch Prozesse wie Infiltration und Versickerung schnell minimiert. In den die Klärschlammausbringung simulierenden Ansätzen sind ferner die Klärschlamm-Verordnung sowie die Dünger-Verordnung (1997) zu berücksichtigen, in der eine zur Ausbringung zeitnahe Einarbeitung des Klärschlammes in den Boden vorgeschrieben wird.

4.6 Bestimmung von Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten

Die Verfügbarkeit einer Chemikalie in der Bodenlösung und in Biofilmen von Bodenpartikeln ist für seine Mobilität und Abbaubarkeit von entscheidender Bedeutung. Zur Ermittlung des Sorptionsverhaltens der Pharmaka in den beiden zu untersuchenden Böden wurden deswegen die Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten als K_d - und K_{oc} -Werte bestimmt, aus denen erste Tendenzen der Mobilität in Böden abgeleitet werden können. Diese Tests wurden in Anlehnung an die Richtlinie 106 "Adsorption/Desorp-

tion" der OECD (1981a, 2000) durchgeführt. Zur naturnäheren Wiedergabe des Verhältnisses Boden zu Bodenlösung wurde dieses, wie bereits vielfach in der Fachliteratur beschrieben (Boesten, 1990, Rüters et al., 1999, von Oepen et al., 1991), von 1:5 auf 1:1.4 erhöht. Zusätzlich wurde die in diesen Batchexperimenten erfolgte Gleichgewichtseinstellung anhand der K_d -Werte für Adsorption/Desorption ($K_d^{\text{ads}}/K_d^{\text{des}}$) abgeschätzt. Die einzelnen Schritte der Versuchsdurchführung sind detailliert an anderer Stelle beschrieben (Kreuzig et al., 2003).

Darüber hinaus wurde auch hier der Klärschlamm-Eintragspfad für Pharmaka-Rückstände in Böden betrachtet. Durch die Applikation von Testklärschlamm wurde so der definierten Alterung der Rückstände in 7 Tagen Rechnung getragen. Ferner konnten in diesen Batch-Equilibrium-Tests die Einflüsse der Klärschlammatrix Berücksichtigung finden, die infolge einer Sorption an die organische Substanz eine Verminderung, aber durch Co-Sorption an wasserlösliche organische Substanzen (DOC) und dem damit möglichen Co-Transport auch eine Erhöhung der Mobilität in Böden bewirken kann.

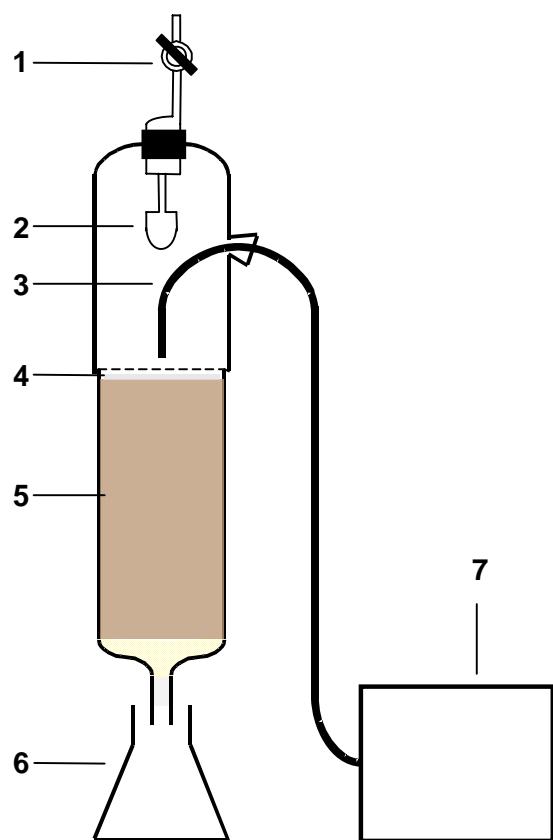
4.7 Tests zu Verlagerung und Abbau als simultan ablaufende Prozesse

Für die Überprüfung von für Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffen ermittelten K_d - bzw. K_{oc} -Werte sind im mehrstufigen Prüfkonzept der Pflanzenschutzmittel-Zulassung zusätzlich Säulenexperimente unter Laborbedingungen und Lysimeterstudien unter Freilandbedingungen vorgesehen, um auf deren Verlagerungsverhalten unter Freilandbedingungen schließen zu können (BBA, 1992). In Anlehnung an diese Vorgehensweise wurden für die Überprüfung der für die untersuchten Pharmaka in Batch-Equilibrium-Tests ermittelten Mobilitätstendenzen geschlossene Labortestsysteme konzipiert, die die Erfassung von Verlagerung und Abbau als gleichzeitig ablaufende Prozesse in Böden ermöglichen.

Säulenexperimente

Entsprechend der BBA-Richtlinie Teil IV, 4-2 (1986b) wurden exemplarisch für ^{14}C -Ibuprofen Säulenexperimente durchgeführt. Hierzu wurden Glassäulen (Höhe: 30 cm, ID: 5 cm) mit den gestörten Bodenproben, gesiebt auf < 1 mm, gefüllt und die Verlagerung unter gesättigtem Wasserfluss studiert. In **Abb. 4.3** ist das hierfür eingesetzte geschlossene Testsystem dargestellt. ^{14}C -Ibuprofen (0.1 MBq) wurde als Standardlö-

sung gleichmäßig auf der Oberfläche der Bodensäule verteilt. Nach der Dotierung des Radiotracers wurden 393 mL demineralisiertes Wasser, entsprechend einem Niederschlagsereignis von 200 L m^{-2} , kontinuierlich verregnet. In diesem Zeitraum von 48 h wurde das durch Mineralisation freigesetzte ^{14}C -Kohlendioxid sowie das Perkolat aufgefangen und der Radioaktivitätsanalyse unterzogen.

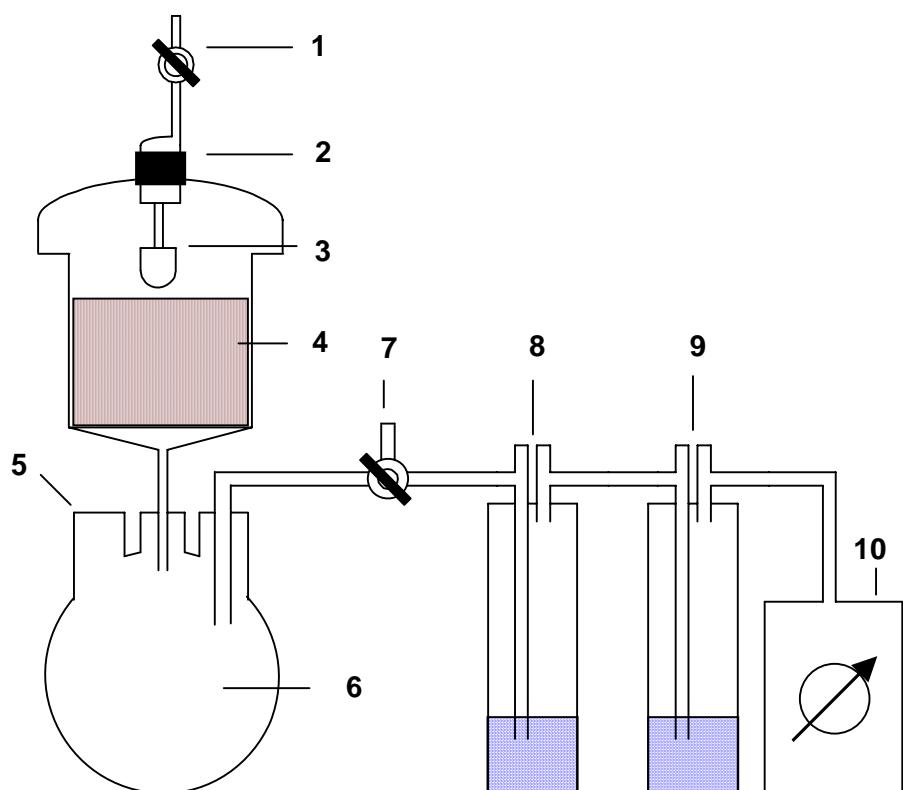


1: Ein-/Auslassventil, **2:** ^{14}C -Kohlendioxid-Absorptionsfalle ($8 \text{ mL } 0.1 \text{ M}$ Kaliumhydroxid-Lösung), **3:** Beregnungsschlauch, **4:** Glasfritte, **5:** Bodensäule, **6:** Perkolatsammler, **7:** Schlauchpumpe

Abb. 4.3: Labortestsystem zur simultanen Erfassung von Abbau und Verlagerung ^{14}C -markierter Chemikalien in gestörten Bodensäulen

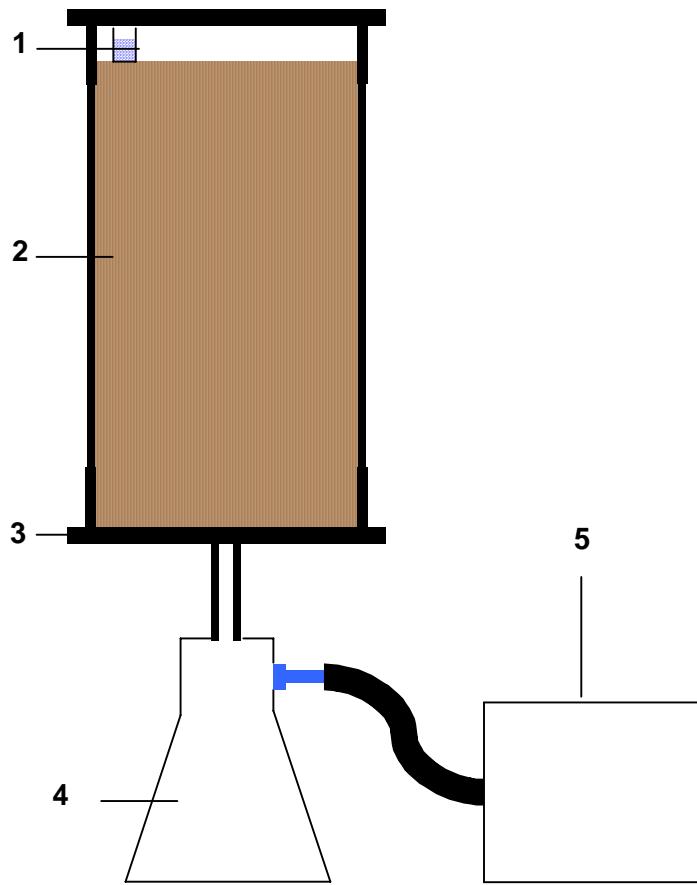
Für ein Metaboliten-Screening in den Perkolatproben wurden die Analyten mittels Festphasenextraktion ($\text{C}_{18}\text{polarplus}$) angereichert und im ersten Schritt mittels RTLC-Analyse nach Ausgangsverbindung und Umwandlungsprodukte differenziert. Im zweiten Schritt folgten nach Derivatisierung der Analyten zu Methylestern GC/MS-Ana-

lysen, um ^{14}C -Ibuprofen als unveränderte Ausgangsverbindung und die korrespondierenden Metaboliten Hydroxy- und Carboxy-Ibuprofen zu identifizieren und damit die RTLC-Analysen abzusichern (Kreuzig et al., 2005b). Alternativ hierzu wurden Säulenexperimente gemäß der neuen OECD-Richtlinie 312 (2002c) durchgeführt. Unterschiede betrafen zum einen die Bodensiebfraktion von 2 mm und den Einsatz einer 0.01 M Calciumchlorid-Lösung als Eluenten ("artificial rain").



1: Ein-/Auslassventil, **2:** Beregnungsöffnung, **3:** ^{14}C -Kohlendioxid-Absorptionsfalle (8 mL 0.1 M Kaliumhydroxid-Lösung) **4:** Bodenkern (6 cm Höhe, 8.5 cm ID), **5:** Perkolatentnahme, **6:** Perkolatsammler, **7:** Belüftungsventil, **8,9:** Waschflasche, **10:** Membranpumpe mit Manometer

Abb. 4.4: Kleinlysimetertestsystem zur simultanen Erfassung von Abbau und Verlagerung ^{14}C -markierter Chemikalien in ungestörten Bodenkernen



1: ^{14}C -Kohlendioxid-Absorptionsfalle (8 mL 0.1 M Kaliumhydroxid-Lösung), **2:** Bodenmonolith (30 cm Höhe, 15 cm ID), **3:** Einsatz mit Ablaurohr, Membran und Seesandfüllung, **4:** Perkolatsammler, **5:** Membranpumpe

Abb. 4.5: Laborlysimetersystem zur simultanen Erfassung von Abbau und Verlagerung ^{14}C -markierter Chemikalien in ungestörten Bodenmonolithen

Kleinlysimetertests

Die geschütteten Bodensäulen und der gesättigte Wasserfluss stellen für einen terrestrischen Oberboden eher artifizielle Milieubedingungen dar, so dass hieraus resultierende Ergebnisse nur bedingt auf Freilandbedingungen zu übertragen sind. Deswegen wurden auch Kleinlysimeter mit ungestörten Bodenkernen aller 3 Standorte (Höhe: 6 cm, ID: 8.5 cm) eingesetzt. Für diese wurde ebenfalls ein geschlossenes Testsystem konzipiert (**Abb. 4.4**), das die Bilanzierung der als ^{14}C -markierte Radiotracer eingesetzten Pharmaka Ibuprofen, Ketoprofen, Diazepam, Sulfamethoxazol und Acetyl-Sulfamethoxazol unter Berücksichtigung von Mineralisation und der Boden- und Perkolat-

Kontamination ermöglichte. Die Dotierung (0.1 MBq) erfolgte dabei als Standardlösung sowie als Test-Klärschlamm (30 g) mit über 7-10 Tage gealterten Pharmaka-Rückständen.

In einem Vorversuch mit ^{14}C -Ibuprofen und Boden aus Neuenkirchen wurde entsprechend den Säulenexperimenten ein Niederschlag von 200 mm simuliert, der in einem Zeitraum von 28 Tagen diskontinuierlich zur Beibehaltung ungesättigter Bedingungen verregnnet wurde. In den weiteren Experimenten wurde der simulierte Niederschlag auf 100 mm und der Untersuchungszeitraum auf 14 Tage mit einer 10-tägigen Beregnung reduziert. Die radiotraceranalytische Untersuchung sowie das GC/MS-gestützte Metaboliten-Screening für die Ibuprofen-Ansätze wurden wie bereits oben beschrieben durchgeführt.

Laborlysimetertests

Zur Berücksichtigung einer Fließstrecke, die der Mächtigkeit eines Pflughorizontes (Ap-Horizont) eines Ackerbodens entspricht, wurden für Ibuprofen auch Verlagerungsexperimente in einem Bodenmonolithen von 30 cm Höhe und 15 cm ID durchgeführt. ^{14}C -Ibuprofen wurde als Standardlösung (0.3 MBq) dotiert. Innerhalb von 28 Tagen wurden 200 mm demineralisiertes Wasser unter Beibehaltung eines ungesättigten Wasserflusses verregnnet. Der Verbleib von ^{14}C -Ibuprofen wurde wiederum in einem geschlossenen Labortestsystem nach oben beschriebenen Analysenmethoden bilanziert (**Abb. 4.5**).

5. Verhalten von Pharmaka-Rückständen in Böden

Die Rückstandsdynamik einer Chemikalie in Böden wird durch Sorption und Abbau bestimmt. Für diese Prozesse ist dabei die Verfügbarkeit in der Bodenlösung bzw. das Auftreten in Biofilmen an der Oberfläche von Bodenpartikeln von entscheidender Bedeutung (Kreuzig, 1998). Denn nur mobile und damit verfügbare Substanzen können dem mikrobiellen Abbau und/oder der Verlagerung in tiefere Bodenhorizonte unterliegen.

Diesen Gesichtspunkten folgt die Gliederung von Darstellung und Diskussion der in diesem Forschungsvorgaben erarbeiteten Ergebnisse. Danach werden die sich aus der Ermittlung der Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten ergebenden Tendenzen der Mobilität der als ^{14}C -markierte Radiotracer eingesetzten Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, Diazepam, Paracetamol, Sulfamethoxazol und Acetyl-Sulfamethoxazol vorangestellt, um einen ersten Eindruck über das Rückstandsverhalten dieser Wirkstoffe in Böden zu gewinnen. Mit der Testklärschlamm-Applikation finden bereits in diesem Testsystem Matrixeffekte und Alterungsprozesse der Rückstände Berücksichtigung.

Entsprechend des Projektantrages schließen sich dann für alle ausgewählten Pharmaka Betrachtungen zur mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbaubarkeit an. Zusätzlich wurde dem Eintrag von Pharmaka-Rückständen in Böden durch kontaminierte Klärschlämme dadurch Rechnung getragen, dass ausgewählte Substanzen auch als definiert gealterte Rückstände in Testklärschlamm in den Abbautests appliziert wurden. Hier lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf den Strukturanaloga Ibuprofen und Ketoprofen sowie auf Sulfamethoxazol und dem korrespondierenden Acetyl-Metaboliten.

Für die Untersuchungen zur Verlagerung wurden geschlossene Labortestsysteme eingesetzt, die neben der Perkolat- und Boden-Kontamination auch die Erfassung der Mineralisation ermöglichen. Mit diesem spezifischen Methodenansatz, der unter Verwendung von ^{14}C -Ibuprofen ausgearbeitet wurde, konnten Verlagerung und Abbau als simultan auftretende Prozesse in Böden erfasst werden. Auf der Basis ermittelter K_d -Werte wurden dann ^{14}C -Ketoprofen, ^{14}C -Diazepam und die ^{14}C -Sulfonamid-Derivate ausgewählt, um deren Verlagerung auch in Kleinlysimetertests nach Standard- und Testklärschlamm-Applikation zu untersuchen.

Während die Tests zur Mobilität in Böden für alle Substanzen vergleichend gegenübergestellt werden, werden die Ergebnisse zum Rückstandsverhalten in Böden für

jede einzelne Substanz getrennt behandelt und im Detail diskutiert. Eine gegenüberstellende Bewertung erfolgt abschließend in Kapitel 6.

5.1 Mobilität und Verfügbarkeit

OECD-Standardtest Adsorption/Desorption

Eine erste Abschätzung zur Mobilität von Pharmaka-Rückständen in Böden erfolgte in Batch-Equilibrium-Experimenten, in denen Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten als K_d -Werte ermittelt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Böden lassen sich aus diesen unter Einbeziehung der bodeninhärenten C_{org} -Gehalte K_{OC} -Werte berechnen. Die nach dem OECD-Standardtest (OECD, 1981b) bestimmten Verteilungskoeffizienten sind in **Tab. 5.1** zusammengestellt. Dabei lagen die K_d - und K_{OC} -Werte in Bereichen von 2-46 bzw. 112-4500 L kg⁻¹. Der Vergleich von Adsorptions- und Desorptionsprozessen (K_d^{ads}/K_d^{des} -Werte < 1) verdeutlichte dabei, dass eine Gleichgewichtseinstellung in diesen Kurzzeittests nur teilweise erfolgte.

Nach Fichter und Holden (1992) ist für Umweltchemikalien in Böden dann eine erhöhte Mobilität und Verfügbarkeit anzunehmen, wenn folgende Parameter von einem Umweltchemikalie/Boden-System erfüllt werden: $K_d < 5$, $K_{OC} < 300$, Löslichkeit > 30 mg/L, DT₅₀ > 14 Tage, DT₅₀ Hydrolyse > 175 Tage. Unter Zugrundelegung dieser Kriterien war nur für ¹⁴C-Ketoprofen mit K_d -Werten von 2 L kg⁻¹ bzw. K_{OC} -Werten von 112 und 195 L kg⁻¹ mit einer potentiellen Verlagerungstendenz in beiden untersuchten Böden zu rechnen. Auf der Basis der von Hollis (1991) für Pestizide aufgestellten Klassifikation war diese allerdings nur als eine mäßige Mobilität (K_{OC} : 75-499 L kg⁻¹) einzustufen (**Tab. 5.2**). Insgesamt unterschied sich das Sorptionsverhalten der untersuchten Pharmaka in Sand- und Schluffböden nicht sehr stark. Für ¹⁴C-Ibuprofen und ¹⁴C-Paracetamol erwies sich der tonige Schluff als der sorptionsstärkere Boden, was sich auch in Untersuchungen von Stockmaier et al. (1996, 1997) für die Morpholin-Fungizide Fenpropimorph und Aldimorph und ihre korrespondierenden Metaboliten Fenpropimorphsäure bzw. Aldimorph-C₁₂-Alkohol widerspiegelte.

Im Gegensatz hierzu zeigten ¹⁴C-Diclofenac und ¹⁴C-Diazepam eine höhere Affinität zum schluffigen Sand, die ggf. auf einen Einfluss des mäßig sauren Boden-pH-Wertes von 5.4 zurückzuführen ist. Für das saure Diclofenac kann die Sorption beeinflusst werden, wenn das Phenylessigsäure-Derivat unter diesen Milieubedingungen undisso-

ziert vorliegt und dieses somit über Wasserstoffbindungen, van der Waals-Kräfte oder Dipolmomente mit spezifischen Oberflächen der Bodenmatrix in Wechselwirkung tritt. Bei Erhöhung des pH-Wertes in den Neutralbereich und darüber hinaus, kann diese Substanz dann nach Dissoziation als Anionen vorliegen und sich so zumindest teilweise der sorptiven Festlegung entziehen. Dieser Ansatz wurde für Pentachlorphenol von Kukowski und Brümmer (1987) beschrieben und schließt auch pH-abhängige Protonierungs- und Deprotonierungsschritte an funktionellen Gruppen der spezifischen Bodenoberflächen insbesondere der Huminstofffraktion ein.

Tab. 5.1: Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten von ^{14}C -markierten Pharmaka nach Standard-Applikation

| Bodenart | K_d [L kg $^{-1}$] | $K_d^{\text{ads}}/K_d^{\text{des}}$ | K_{oc} [L kg $^{-1}$] |
|--------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Diclofenac | | | |
| tU | 8 ± 1 | 0.4 | 581 ± 84 |
| uS | 10 ± 1 | 0.4 | 864 ± 52 |
| Ibuprofen | | | |
| tU | 17 ± 0.3 | 0.3 | 1216 ± 24 |
| uS | 6 ± 0.6 | 1 | 795 ± 78 |
| Ketoprofen | | | |
| tU | 2 ± 0.04 | 0.04 | 112 ± 3 |
| uS | 2 ± 0.04 | 1 | 195 ± 5 |
| Diazepam | | | |
| tU | 13 ± 1 | 2 | 893 ± 86 |
| uS | 20 ± 4 | 3 | 2500 ± 438 |
| Paracetamol | | | |
| tU | 46 ± 3 | 0.2 | 3250 ± 179 |
| uS | 36 ± 1 | 0.1 | 4500 ± 125 |

tU: toniger Schluff, **uS:** schluffiger Sand

Ein dem basischen 1,4-Benzodiazepin-Derivat (pK_s : 3.4) ähnliches Sorptionsverhalten wurde für das ebenfalls basische Azol-Fungizid Prochloraz (pK_s : 3.8) festgestellt. Für

die Sorptionsstärke dieser Substanz konnte neben einer engen Korrelation zum C_{org}-Gehalt auch eine direkte Abhängigkeit zum Boden-pH experimentell nachgewiesen werden. Gezielte Modifikationen der bodeninhärenten pH-Werte zeigten, dass mit der Annäherung von pH- an den pK_S-Wert höhere K_d-Werte und damit eine stärkere Sorption verbunden sind (Rüters et al., 1999). Es ist anzunehmen, dass Prochloraz bei erhöhter H⁺-Ionenkonzentration einer Protonierung unterliegt und damit die stärkere Sorption auf die Beteiligung am Kationenaustausch zurückzuführen ist. Ein ähnliches Bild wie bei diesem Imidazol-Derivat zeichnet sich infolge der Molekülstruktur von Diazepam ab, in dem freie Elektronenpaare an den Stickstoffatomen des Diazepinon-Ringes eine Anlagerung von Protonen ermöglichen.

Tab. 5.2: Klassifikation der Mobilität von Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffen in Böden (Hollis, 1991)

| Mobilitätseinstufung | K _{oc} [L kg ⁻¹] |
|----------------------|--|
| immobil | > 4000 |
| leicht mobil | 500-4000 |
| mäßig mobil | 75-499 |
| mobil | 15-74 |
| sehr mobil | < 15 |

K_d-Wert-Bestimmung nach Testklärschlamm-Applikation

Um den Eintragspfad über kontaminierte Klärschlamm zu simulieren und damit gleichzeitig Matrixeffekte wie auch die Alterung der Rückstände in Böden zu betrachten (s. Kapitel 4.3), wurde auf der Basis von Stabilitätstest in Klärschlamm (s. Kapitel 5) Testklärschlamm mit definiert gealterten Pharmaka-Rückständen hergestellt und auch für die K_d-Wert-Bestimmung eingesetzt. Aus den in **Tab. 5.3** aufgeführten Ergebnissen gehen dabei unterschiedliche stoffspezifische Tendenzen hervor. Während sich aus im Vergleich zur Standard-Applikation ansteigenden K_d-Werten für ¹⁴C-Ibuprofen und ¹⁴C-Ketoprofen eine verminderte Mobilität in Böden abzeichnete, ließ sich für ¹⁴C-Diclofenac und ¹⁴C-Diazepam eine Erhöhung der Mobilität abschätzen. Die Unterschiede zwischen den untersuchten Bodenarten waren nur gering. Eine Sonderstellung

nahm ^{14}C -Paracetamol ein. Unabhängig von der Applikationsform wurden in beiden Böden mit einem durchschnittlichen K_d -Wert von 42 L kg^{-1} insgesamt die höchste Affinität zur Bodenmatrix ermittelt.

Tab. 5.3: Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten von ^{14}C -markierten Pharmaka-Rückständen nach Testklärschlamm-Applikation #####

| Boden | Diclofenac | Ibuprofen | Ketoprofen | Diazepam | Paracetamol |
|-----------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| tU | 5 ± 0.1 | 38 ± 2 | 4 ± 0.4 | 7 ± 1 | 45 ± 5 |
| uS | 4 ± 0.1 | 63 ± 0.5 | 5 ± 0.7 | 4 ± 0.3 | 41 ± 3 |

tU: toniger Schluff, **uS:** schluffiger Sand

In Ergänzung zu den Untersuchungen im "Runoff-Projekt" wurden K_d -Werte für ^{14}C -Sulfamethoxazol und den korrespondierenden ^{14}C -N-Acetyl-Metaboliten in den Böden des Acker- und Grünlandstandortes des Untersuchungsgebietes Adenstedt ermittelt (**Tab. 5.4**). Neben den unterschiedlichen Applikationsformen konnte hier der Einfluss unterschiedlicher C_{org} -Gehalte und pH-Werte auf die Sorption beider Substanzen im tonigen Schluffboden betrachtet werden. Nach Applikation als Standardlösung ergaben sich K_d -Werte für ^{14}C -Sulfamethoxazol und ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol von 1.3 und 2.9 bzw. 2.1 und 3.1 L kg^{-1} , die zum einen eine geringfügig stärkere Sorption des Metaboliten und zum anderen eine geringfügig größere Sорptivit t des Gr nlandbodens aufzeigten. Normiert auf die C_{org} -Gehalte der untersuchten Böden ergab sich auf Basis der K_{OC} -Werte von 81 bzw. 97 L kg^{-1} für ^{14}C -Sulfamethoxazol und 131 bzw. 103 L kg^{-1} für ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol eine moderate Mobilität (Hollis, 1991). Mit Ausnahme von ^{14}C -Sulfamethoxazol im Ackerboden f rte die Testklärschlamm-Applikation zu geringf ig niedrigeren K_d -Werten. Hieraus konnte allerdings keine relevante Änderung der Mobilität beider Substanzen abgeleitet werden. Im Gegensatz stehen dagegen Tests, in denen ^{14}C -Sulfadiazin als definiert gealterten Rückstände in Testgülle eingesetzt wurde, womit eine Zunahme der K_d -Werte im Ackerboden von 2.1 auf 14.2 L kg^{-1} und

Mit der "Testklärschlamm-Applikation" wurden ^{14}C -markierte Pharmaka-Rückstände, bestehend aus der jeweiligen Ausgangsverbindung und die während der Kl rschlammelagerung gebildeten Umwandlungsprodukte sowie die nicht-extrahierbaren Rückstände, in diesen Batch-Equilibrium-Tests appliziert. Damit beziehen sich die hier ermittelten K_d -Werte auf die Gesamtrückstandssituation (z.B. ^{14}C -Ibuprofen-Rückstände).

im Grünlandboden von 5.6 auf 19.6 L kg⁻¹ einherging, woraus tendenziell eine Verminderung der Mobilität abzuleiten war (Kreuzig und Höltge, 2005).

Tab. 5.4: Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten für ¹⁴C-Sulfamethoxazol (SMZ) und ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol (A-SMZ) in Abhängigkeit von Applikationsform und bodeninhärentem C_{org}-Gehalt

| Sub-stanz | Applikationsform | Bodenart | C _{org} -Gehalt [%] | pH | K _d [L kg ⁻¹] | K _{oc} [L kg ⁻¹] |
|--------------|--------------------------|-----------|------------------------------|-----|--------------------------------------|---------------------------------------|
| SMZ | Standard Testklärschlamm | uT (AD-A) | 1.6 | 6.9 | 1.3 ± 0.1 2.4 ± 0.5 | 81 ± 6 --- |
| | Standard Testklärschlamm | uT (AD-G) | 3.0 | 4.5 | 2.9 ± 0.2 2.3 ± 0.4 | 97 ± 7 --- |
| A-SMZ | Standard Testklärschlamm | uT (AD-A) | 1.6 | 6.9 | 2.1 ± 0.3 1.3 ± 0.1 | 131 ± 19 --- |
| | Standard Testklärschlamm | uT (AD-G) | 3.0 | 4.5 | 3.1 ± 0.1 1.8 ± 0.3 | 103 ± 3 --- |

uT: schluffiger Ton, **---**: nicht bestimmt

AD-A: Boden des Ackerstandortes Adenstedt

AD-G: Boden des Grünlandstandortes Adenstedt

5.2 Tests zur Extraktionseffizienz organischer Lösungsmittel

Für die Bilanzierung in den Abbauexperimenten galt es, neben der Ermittlung der Mineralisation eine Differenzierung zwischen extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Rückständen vorzunehmen. Dabei werden als nicht-extrahierbare Rückstände gemäß der IUPAC-Definition die Rückstände von Umweltchemikalien in Bodenproben angesehen, die durch eine Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel nicht ohne signifikante Veränderung ihrer chemischen Natur aus der Bodenmatrix freigesetzt werden (Roberts, 1984, Agnihotri und Boroohah, 1994, Gevao et al., 2000).

Aufgrund möglicher Analyt-Verluste bei der Co-Destillation von organischen Chemika-

lien und bodeninhärentem Wasser bei der Probentrocknung bei 105 °C, aber auch schon bei Raumtemperatur, werden Bodenproben zur Rückstandsuntersuchung prinzipiell "feldfeucht" eingesetzt. Damit können nur organische Lösungsmittel Verwendung finden, die eine ausreichende Benetzung der feuchten Bodenoberflächen zur Analyt-Freisetzung aus dieser komplexen Probenmatrix sicherstellen. Unter diesem Gesichtspunkt wurde die Extraktionseffizienz der vielfach in der Bodenanalytik eingesetzten Lösungsmittel Ethylacetat und Methanol für alle Pharmaka in Zusatzversuchen zu den untersuchten Böden überprüft.

Tab. 5.5: Tests zur Extraktionseffizienz organischer Lösungsmittel

| Boden | toniger Schluff | | schluffiger Sand | |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| ¹⁴ C-markierte Substanzen | Ethylacetat [ER %] | Methanol [ER %] | Ethylacetat [ER %] | Methanol [ER %] |
| Diclofenac | 80 | 36 | --- | --- |
| Ibuprofen | 99 | 62 | 98 | 88 |
| Ketoprofen | 93 | 24 | --- | --- |
| Diazepam | 102 | 98 | 104 | 101 |
| Paracetamol | 8 | 19 | 37 | 47 |
| Sulfamethoxazol | 99 | 88 | --- | --- |
| Acetyl-Sulfamethoxazol | 99 | 68 | --- | --- |

ER: extrahierbare Anteile, ---: nicht bestimmt

Die in **Tab. 5.5** gegenübergestellten Ergebnisse zeigten insgesamt eine höhere Extrahierbarkeit der Rückstände in Ethylacetat. Der Einsatz von Ethylacetat liefert außerdem deutliche Vorteile in den einzelnen Schritten der Probenaufbereitung. Bereits nach der Schüttleextraktion kommt es bei beiden Böden zum vollständigen Absetzen der Bodenpartikel aus der Lösungsmittel/Boden-Suspension, so dass das Dekantieren des Lösungsmittelüberstandes unproblematisch verläuft. Ferner gestaltet sich die Extrakt-Aufkonzentrierung mittels Rotationsverdampfer schneller und schonender als bei Methanol; dort wird dieser Schritt durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken merklich verzögert. Außerdem bildet Ethylacetat mit Wasser, das sich im Extraktionsschritt bis zu 8 % in Ethylacetat lösen kann, ein binäres Azeotrop, so dass Wasserspuren im Auf-

konzentrierungsschritt entfernt werden.

Weitere Extraktionstests gingen auf Vorgaben der BBA-Richtlinie zur mikrobiellen Abbaubarkeit von Pflanzenschutzmitteln in Böden (BBA, 1986a) zurück. Dort ist zur Charakterisierung der Bindungsstärke nicht-extrahierbarer Rückstände auch eine Extraktion mit demineralisiertem Wasser vorgesehen. Exemplarisch wurden diese Tests für ¹⁴C-Diclofenac und ¹⁴C-Ibuprofen durchgeführt. Da diese Extraktionstechnik in erster Linie für die Bestimmung bioverfügbarer Rückstände Anwendung findet, war die in **Tab. 5.6** wiedergegebene deutlich höhere Extraktionseffizienz des organischen Lösungsmittels nach 3-tägiger Alterung der Rückstände in tonigem Schluff und schluffigem Sand leicht nachvollziehbar.

Tab. 5.6: Vergleich der Effizienz von Wasser- und Ethylacetat-Extraktion für 3 Tage gealterte Rückstände von ¹⁴C-Diclofenac und ¹⁴C-Ibuprofen in Böden

| Boden | toniger Schluff | | schluffiger Sand | |
|--------------------------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|
| ¹⁴ C-markierte Substanzen | Ethylacetat [ER %] | Wasser [ER %] | Ethylacetat [ER %] | Wasser [ER %] |
| Diclofenac | 19 | 9 | 57 | 14 |
| Ibuprofen | 20 | 5 | 63 | 12 |

ER: extrahierbare Rückstände

Auch aus Gründen der Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchsansätzen wurde im weiteren Verlauf dieses Forschungsvorhabens Ethylacetat als Extraktionsmittel eingesetzt. Unter Zugrundelegung, dass die Persistenz eines Pflanzenschutzmittels neben einem DT₉₀-Wert > 100 Tage auch durch die Mineralisation < 5 % und die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände > 70 % in jeweils 100 Tagen definiert wird (BBA, 1992, 1998), kann eben der zuletzt genannte Prozess ein Ausschlusskriterium im Zulassungsverfahren darstellen. Deswegen wurden die bereits mit Ethylacetat extrahierten Tag 102-Proben aus den Tests zur mikrobiellen Abbaubarkeit zur Prüfung auf erschöpfende Extraktion zusätzlich einer reaktiven Behandlung mit salzaurem Methanol unterzogen, die zu einer Steigerung der Extraktionseffizienz von 6-13 % führte (**Tab. 5.7**). Für ¹⁴C-Sulfamethoxazol und ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol betrug die Freisetzung

5 bzw. 6 %. Insgesamt ist die Effizienz dieser arbeitsintensiven Nachextraktion gegenüber der Ethylacetat-Extraktion als gering zu bezeichnen. Trotz Nachextraktion blieb es für ¹⁴C-Paracetamol und die ¹⁴C-Sulfonamid-Derivate bei der Überschreitung des 70 %-Wertes für nicht-extrahierbare Rückstände. Von allen anderen untersuchten Substanzen wurde dieser in tonigem Schluff deutlich unterschritten. Insbesondere für ¹⁴C-Diazepam war die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände rückstandsdynamisch von untergeordneter Bedeutung. In der weiteren Ergebnisdarstellung beziehen sich die Angaben zu den nicht-extrahierbaren Rückständen in den Abbau- und Verlagerungsexperimenten (s. Kapitel 5.3) grundsätzlich auf die Ethylacetat-Extraktion, sofern nicht andere Lösungsmittel explizit genannt werden.

Tab. 5.7: Bilanzierung der Tests zur mikrobiellen Abbaubarkeit ¹⁴C-markierter Pharmaka nach 102 Tagen unter Berücksichtigung der Nachextraktion mit salzaurem Methanol [%]

| Substanz | Diclofenac | | Ibuprofen | | Ketoprofen | | Diazepam | | Paracetamol | |
|------------------------------|------------|-----------|-----------|----------|------------|-----------|----------|-----------|-------------|----------|
| Boden | tU | uS | tU | uS | tU | uS | tU | uS | tU | uS |
| MIN | 12 | 8 | 39 | 45 | 46 | 53 | 3 | 1 | 12 | 27 |
| ER_{Etac} | 5 | 48 | 12 | 21 | 2 | 15 | 78 | 83 | 1 | 1 |
| ER_{MeOH/HCl} | 13 | 13 | 10 | 7 | 9 | 10 | 6 | 12 | 9 | 9 |
| NER | 56 | 26 | 32 | 23 | 28 | 24 | 10 | 9 | 80 | 63 |
| Bilanz | 86 | 95 | 93 | 96 | 85 | 102 | 97 | 105 | 102 | 100 |

MIN: Mineralisation

ER_{Etac}: extrahierbare Rückstände nach Ethylacetat-Extraktion

ER_{MeOH/HCl}: extrahierbare Rückstände nach salzsaurer Methanol-Nachextraktion

NER: nicht-extrahierbare Rückstände

tU: toniger Schluff

uS: schluffiger Sand

Bereits in den Extraktionstests stellte ¹⁴C-Paracetamol eine besonders auffällige Ausnahme dar. Obgleich sich unmittelbar nach der Dotierung der Standardlösung und dem Abdampfen des Lösungsmittels die Ethylacetat- und Methanol-Extraktion anschlossen,

betrugen die extrahierbaren Anteile in den Tests mit tonigem Schluff nur 8 % bzw. 19 %. In den Tests mit schluffigem Sand wurden weniger als 50 % extrahierbare Anteile gefunden. Dabei konnte nach Dotierung von Seesandproben belegt werden, dass Ethylacetat bei Wiederfindungsraten > 90 % prinzipiell für die extractive Freisetzung von ¹⁴C-Paracetamol von einer porösen Feststoffmatrix geeignet ist.

Unter Verwendung von Ethanol konnte die Extraktionseffizienz für Proben unmittelbar nach der Dotierung von ¹⁴C-Paracetamol zwar gesteigert werden. So betrugen die extrahierbaren Anteile 36 % im tonigen Schluff und 41 % im schluffigen Sand. Doch zeigte sich, dass dieser Vorteil durch den Alterungsprozess der ¹⁴C-Paracetamol-Rückstände innerhalb von 28 Tagen kompensiert wurde. In parallel mit Ethylacetat und Ethanol extrahierten Tag 28-Proben beliefen sich schließlich extrahierbaren Anteile nur noch auf 1 %, während auf die nicht-extrahierbaren Anteile 79 % entfielen.

Durch die Nachextraktion mit salzaurem Methanol wurden zusätzlich nur 9 % der nicht mit Ethylacetat extrahierten Radioaktivität aus der Bodenmatrix herausgelöst. Aufgrund dieser hohen Affinität von ¹⁴C-Paracetamol zu den untersuchten Böden schlossen sich weitergehende Untersuchungen unter Verwendung mikrobiell aktiver und inaktiver Bodenproben sowie Seesand und anderer Extraktionsmittel an. Die Ergebnisse werden detailliert in Kapitel 5.3.4 vorgestellt.

5.3 Abbaubarkeit und Verlagerung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Laborexperimente für die einzelnen Pharmaka dargestellt und diskutiert. Nach den Betrachtungen des Rückstandsverhaltens von ¹⁴C-Diclofenac folgt die direkte Gegenüberstellung der strukturanalogen Antiphlogistika ¹⁴C-Ibuprofen und ¹⁴C-Ketoprofen. ¹⁴C-Diazepam als basische Substanz wird wiederum einzeln behandelt, während ¹⁴C-Paracetamol aufgrund seiner hohen Affinität zur Bodenmatrix, die sich bereits in den Test zur Extraktionseffizienz organischer Lösungsmittel erkennen ließ, gemeinsam mit den strukturanalogen Verbindungen ¹⁴C-Phenacetin und ¹⁴C-p-Kresol Berücksichtigung findet. Den Abschluss bildet die Ergebnisdarstellung für ¹⁴C-Sulfamethoxazol und den Metaboliten ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol.

Sofern die gesamte Sequenz der Versuchsansätze durchgeführt wurden (s. Kapitel 4), sind diese nach folgenden Gesichtspunkten angeordnet: Vorangestellt werden jeweils

die Ergebnisse zum mikrobiellen Abbau nach Standard-Applikation. Stabilitätstests der einzelnen Substanzen in Klärschlamm gehen jeweils dem mikrobiellen Abbau nach Testklärschlamm-Applikation voran. Nach diesen Langzeittests werden dann die Kurzzeittests zum mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbau berücksichtigt, bevor abschließend die Verlagerungstendenzen aus den Säulen- und Labolysimeter-tests diskutiert werden.

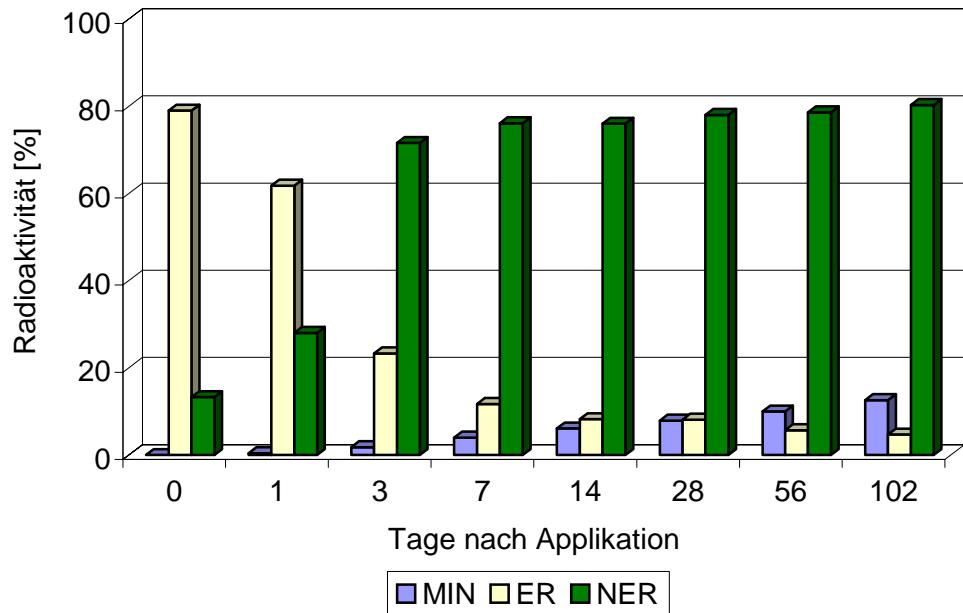
5.3.1 Diclofenac

Mikrobieller Abbau nach Standard-Applikation

Die Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von ^{14}C -Diclofenac in tonigem Schluff und schluffigen Sand erfolgten in Inkubationsintervallen bis zu 102 Tagen, da über diesen Zeitpunkt hinaus mit einer natürlichen Abnahme der mikrobiellen Aktivität infolge der Nährstoffverarmung in den Bodenproben zu rechnen ist. Die Rückstandssituation für ^{14}C -Diclofenac in den untersuchten Böden ist in **Abb. 5.1** wiedergegeben. In den Ansätzen mit tonigem Schluff wurden durch Mineralisation 13 % der applizierten Ausgangsverbindung in ^{14}C -Kohlendioxid umgewandelt. Auffällig war hier der zweiphasige Verlauf der Mineralisation, bei dem die Mineralisationsrate anfänglich von 231 auf 404 pmol d^{-1} anstieg, um dann auf 35 pmol d^{-1} abzufallen (Matthies, 2002, Kreuzig et al., 2003).

Ein ähnliches Bild ergab sich für die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände. Bereits nach 3 Tagen lagen 72 % der anfangs mit dem Radiotracer applizierten Radioaktivität in dieser nicht mit Ethylacetat extrahierbaren Fraktion vor. Danach erfolgte nur noch eine geringfügige Zunahme bis zum Versuchsende auf 80 %. Nach BBA (1992) wäre damit das eine für die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln entscheidende Ausschlusskriterium mit der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände > 70 % in 100 Tagen überschritten. Mit Zunahme von Mineralisation und nicht-extrahierbaren Rückständen ging eine Abnahme der extrahierbaren Anteile von 79 % in der Tag 0-Probe auf 5 % zum Versuchsende einher.

A



B

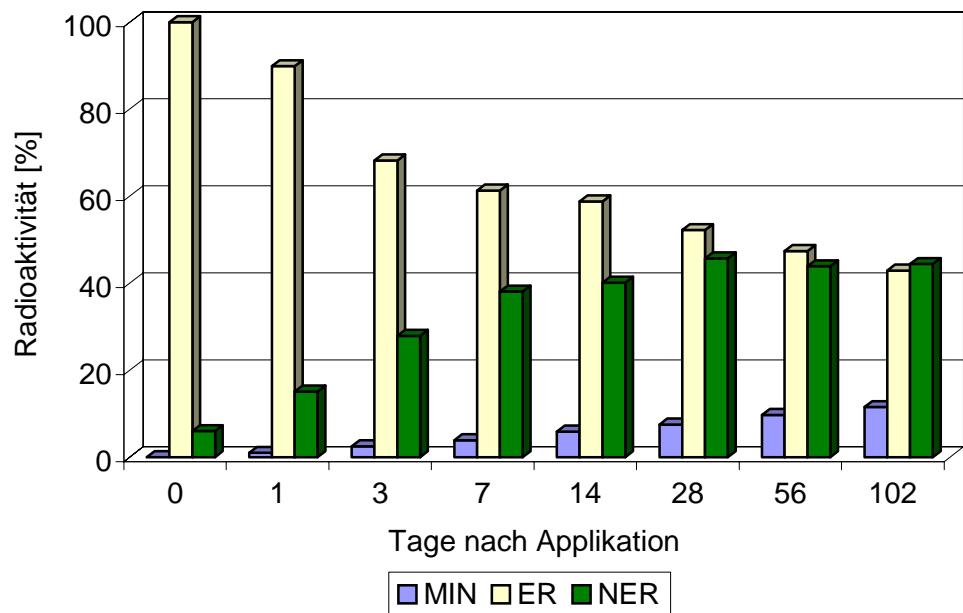


Abb. 5.1: Mikrobieller Abbau von ^{14}C -Diclofenac in **A: tonigem Schluff und **B:** schluffigem Sand nach Standard-Applikation**

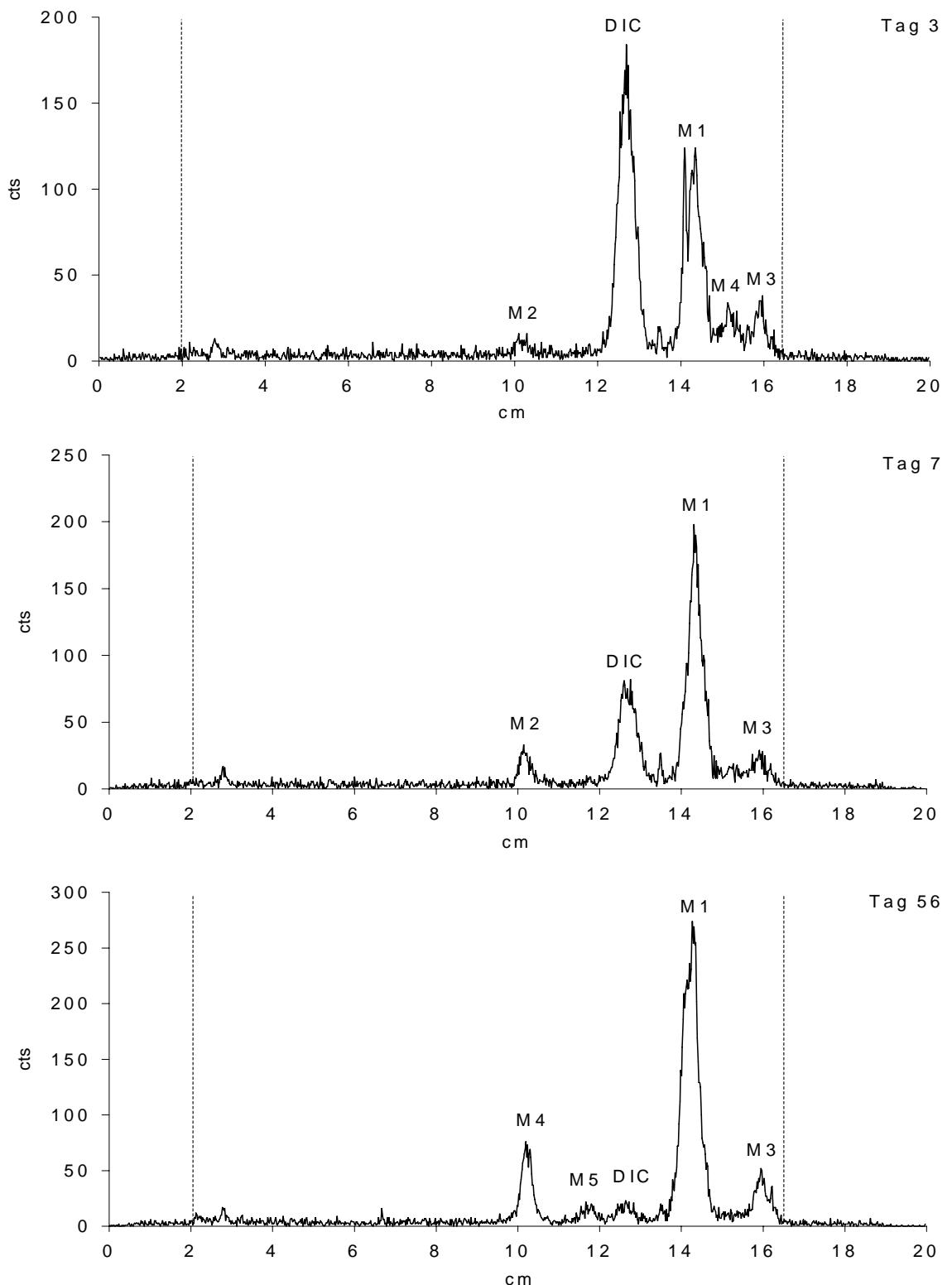


Abb. 5.2: Metaboliten-Screening auf ^{14}C -Diclofenac (DIC) und ^{14}C -Metaboliten (M1-M5) in Extrakten der schluffigen Sandproben

Das Rückstandsverhalten von ^{14}C -Diclofenac im schluffigen Sand spiegelte eine Verlangsamung der Abbauprozesse wider, die auf die niedrigere mikrobielle Aktivität im schluffigen Sand gegenüber dem tonigen Schluff zurückgeführt werden kann. Die Mineralisation und die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände unterlagen in 102 Tagen einer eher kontinuierlichen Zunahme auf Werte von 12 % bzw. 43 %. Mit diesen Aktivitätsverläufen ging eine sukzessive Abnahme der extrahierbaren Fraktion von 104 auf 43 % einher. Trotz der hier deutlich höheren Extrahierbarkeit der Rückstände waren die in beiden Böden annähernd identischen Mineralisationsraten auffällig.

Die Radioaktivitätskonzentration in diesen Extrakten des schluffigen Sandes blieb bis zum Versuchsende ausreichend hoch, um mittels Radio-Dünnschichtchromatographie zwischen der applizierten Ausgangsverbindung und gebildeten Metaboliten zu differenzieren (Metaboliten-Screening). In den Extrakten nach 3-, 7- und 56-tägiger Inkubation wurden so neben Diclofenac als unveränderter Ausgangsverbindung insgesamt 5 Umwandlungsprodukte detektiert (**Abb. 5.2**). Obgleich die Metaboliten ohne verfügbare Referenzchemikalien nicht identifiziert werden konnten, lassen sich, entsprechend dem Prinzip der Normalphasenchromatographie, aus ihren teilweise niedrigeren, aber auch höheren R_f -Werten gegenüber ^{14}C -Diclofenac Rückschlüsse auf ihre Polaritätsverhältnisse ziehen. Bei R_f -Werten kleiner der Ausgangsverbindung ist infolge stärker retender Wechselwirkung mit der Kieselgeloberfläche mit polareren, bei höheren R_f -Werten mit unpolareren Metaboliten zu rechnen. Aufgrund der höchsten Radioaktivitätskonzentration war der M1-Metabolit von besonderem Interesse. Diese Substanz kann zum einen aus einer Dechlorierung oder Veresterung von Diclofenac hervorgehen. Zum anderen ist aber auch eine Co-Sorption von Diclofenac mit Matrixbestandteilen aus der Huminstofffraktion nicht auszuschließen.

Mit der Aufnahme des Konzentrationsverlaufes des M1-Metaboliten in die in **Abb. 5.3** dargestellte Gesamtbilanz des Batchexperimentes mit schluffigen Sand wurde ersichtlich, dass Diclofenac als unveränderte Ausgangsverbindung innerhalb von 56 Tagen von 93 % auf 3 % der ursprünglich dotierten Radioaktivität abnahm, was einer Verminderung der Konzentration von 265 auf 9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ trockenen Boden entsprach.

Im Extrakt der Tag 102-Probe war Diclofenac nicht mehr nachweisbar. Daraus errechnete sich für dieses Antiphlogistikum ein DT_{50} -Wert von 2 Tagen (Timme et al., 1986). Mit dem Verschwinden der Ausgangsverbindung steigt die M1-Metaboliten-Konzentration bis zu Tag 14 an, um dann wieder sukzessive abzufallen. Parallel mit diesen beiden Konzentrationsverläufen ging auch eine Zunahme der nicht-extrahierbaren Rück-

stände bis Tag 28 einher. Danach traten keine wesentlichen Änderungen auf.

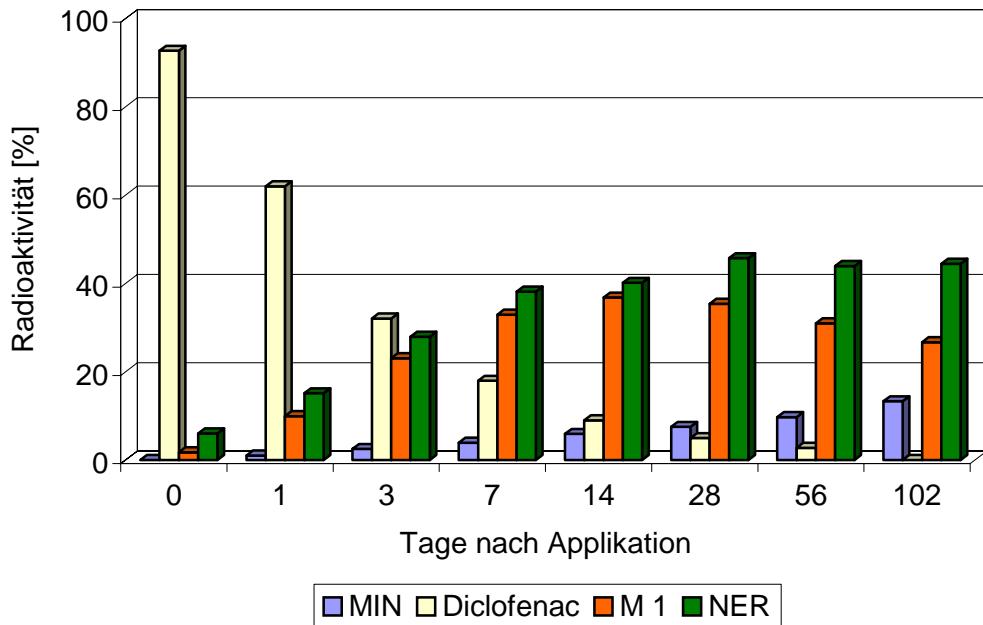


Abb. 5.3: Bilanzierung des Tests zum mikrobiellen Abbau von ^{14}C -Diclofenac im schluffigen Sand unter Berücksichtigung des ^{14}C -M1-Metaboliten

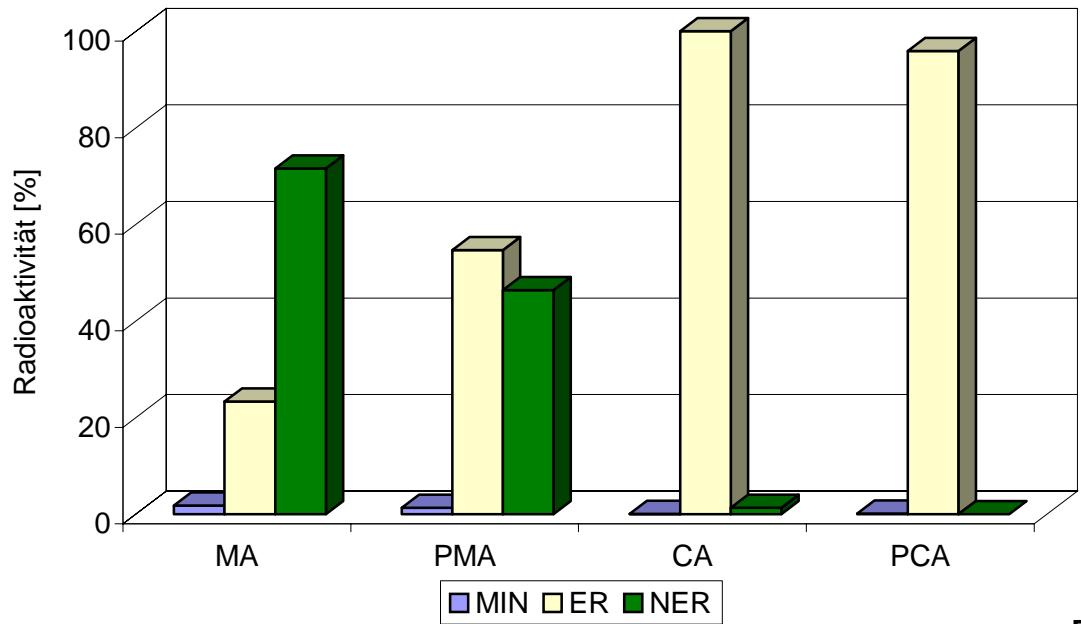
Kurzzeittests zum mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbau

In Ergänzung zu den 102 Tage dauernden Tests zur mikrobiellen Abbaubarkeit von Pharmaka-Rückständen in Böden wurden auch 3-tägige Kurzzeittests in einer Bestrahlungsapparatur durchgeführt, um auch photochemische Einflüsse auf den Abbau der Pharmaka zu betrachten.

Aus dem Einsatz mikrobiell aktiver und inaktiver Bodenproben ergaben sich die Varianten des photoinduziert-mikrobiellen und photoinduziert-chemischen Abbaues, während der Einsatz mikrobiell inaktiver Bodenproben in den Dunkelexperimenten den chemischen Abbau definierte. Die vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse für die beiden untersuchten Böden ist in **Abb. 5.4** illustriert.

Besonders auffällig war, dass in den Bestrahlungsexperimenten insgesamt kein verstärkter Abbau von ^{14}C -Diclofenac in Böden zu konstatieren war, obgleich Diclofenac als photosensitive Verbindung eingestuft wurde (Buser et al., 1998, Encinas et al., 1998, Moore et al., 1990, Poiger et al., 2001).

A



B

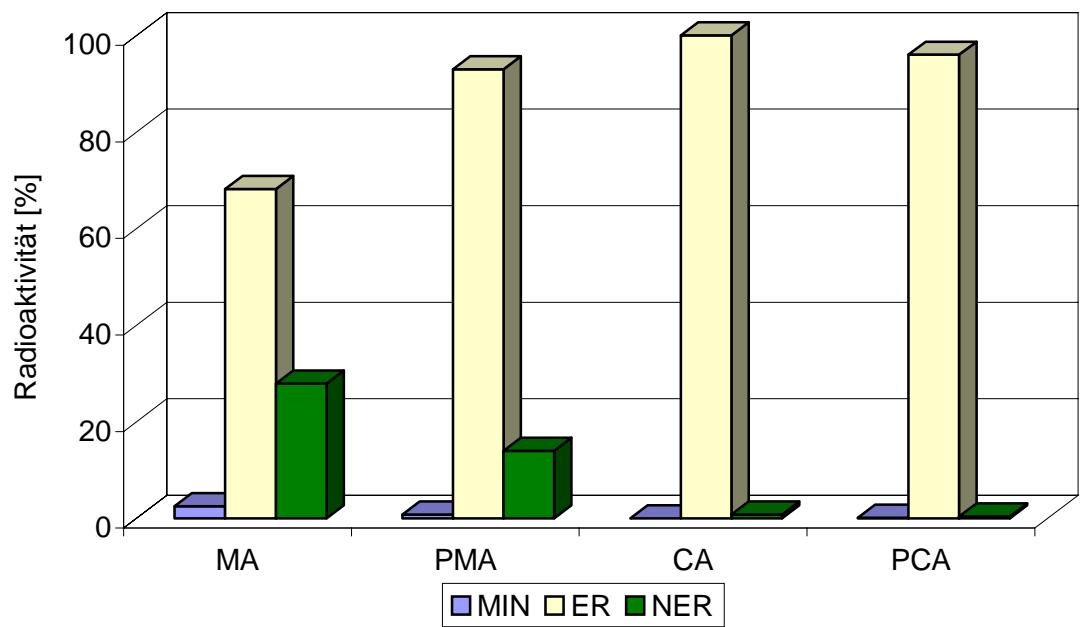


Abb. 5.4 : Mikrobieller (MA), photoinduziert-mikrobieller (PMA), chemischer (CA) und photoinduziert-chemischer Abbau (PCA) von ^{14}C -Diclofenac in A: tonigem Schluff und B: schluffigem Sand nach Standard-Applikation

Mit Hilfe des Metaboliten-Screenings konnten in diesen Extrakten zwar neben der applizierten Ausgangsverbindung verschiedene Abbauprodukte nachgewiesen werden. Der Vergleich der R_f-Werte lieferte allerdings dabei keinen Hinweis darauf, dass möglicherweise unter Bestrahlung andere Umwandlungsprodukte wie in den Dunkelexperimenten entstanden sind. Somit war kein relevanter Einfluss der Bestrahlung zu erkennen. Ein gegensätzliches Verhalten wurde von Buser et al. (1998) für den Abbau von Diclofenac im Seewasser des Greifensees, Schweiz, beschrieben. In diesem Fall wurde der Einfluss der Mikroorganismen sogar als vernachlässigbar gering eingestuft, da im Vergleich zu belichteten Proben trotz nicht steriler Bedingungen im Dunkeln nur eine sehr geringe Konzentrationsabnahme von Diclofenac stattfand.

In den Kurzzeittests mit Böden fiel dagegen auf, dass nicht-extrahierbare Rückstände ausschließlich in den Ansätzen mit mikrobiell aktiven Bodenproben gebildet wurden. Da diese Festlegung auch stärker in der Bodenmatrix des mikrobiell aktiveren tonigen Schluffes erfolgte, ist für ¹⁴C-Diclofenac die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände deswegen als Funktion von mikrobiell induzierten Abbauprozessen anzusehen und nicht der Sorption an die Bodenmatrix zuzuordnen. Insofern stehen die niedrigen K_d- bzw. K_{oc}-Werte mit den nicht-extrahierbaren Anteilen in einzelnen Versuchsreihen bis zu über 70 % der applizierten Radioaktivität in keinem Widerspruch. Unterstützt wird dieser Interpretationsansatz auch dadurch, dass jeweils in den Bestrahlungsexperimenten eine höhere Extrahierbarkeit der ¹⁴C-Diclofenac-Rückstände als in den korrespondierenden Dunkelexperimenten erzielt wurde. Für die Erklärung war hier die Beobachtung bei der Versuchsdurchführung von Bedeutung, dass die Bodenoberfläche während der Bestrahlung austrocknete, was mit einer Kondensation des Verdunstungswassers am Kühlfinger der Glasapparatur einherging. Da die hier eingesetzte Bestrahlungsapparatur BA-1 noch mit keiner unabhängigen Kühlung des Probenbehälters ausgerüstet war, könnte mit dieser Austrocknung eine Verminderung der mikrobiellen Bodenaktivität sowie physiko-chemische Veränderungen der Bodenoberfläche verbunden sein, die schließlich die Festlegung von ¹⁴C-Diclofenac in der Bodenmatrix herabsetzte. Wenn auch dieser Austrocknungsprozess in der Bestrahlungsapparatur die unmittelbare Vergleichbarkeit zu den Dunkelexperimenten einschränkt, spiegelt dieser doch natürliche Freilandverhältnisse wider, in denen die direkte Sonneneinstrahlung auch eine Austrocknung und Erwärmung der Bodenoberfläche bewirkt.

Die in diesem Forschungsvorhaben vorangetriebene Weiterentwicklung der Bestrahl-

lungsapparatur BA-2 verfügt über die Kühlung des Probenbehälters, so dass die Bodentemperatur weitgehend konstant auf 20 °C gehalten wird und somit Verdunstungsverluste minimiert werden. Für ¹⁴C-Diclofenac wurden deswegen exemplarisch die Einflüsse der konstruktiven Veränderungen der Bestrahlungsapparaturen auf den photoinduziert-mikrobiellen Abbau untersucht. In der Apparatur BA-2 erfolgten so 3-tägige Tests mit 8 h Licht/16 h-Dunkelperioden bzw. 10 h Licht/14 h-Dunkelperioden. Aus dem ersten Versuchsansatz resultierte eine deutliche Verschiebung der Radioaktivitätsverteilung zugunsten der nicht-extrahierbaren Rückstände. Die Verlängerung der Bestrahlungsintervalle zeigte dagegen weder einen relevanten Einfluss auf die Intensitätsverhältnisse, noch ergab sich ein Hinweis auf einen beschleunigten photoinduzierten Abbau (**Tab. 5.8**).

Tab. 5.8: Einflüsse konstruktiver Veränderungen der Bestrahlungsapparaturen BA-1 und BA-2 auf den mikrobiell-photoinduzierten Abbau von ¹⁴C-Diclofenac in tonigem Schluff

| Apparatur | BA-1 | | BA-2 | | BA-2 | |
|-------------|---------------------------|-----|---------------------------|-----|----------------------------|-----|
| Bestrahlung | 8 h Licht/ 16 h Dunkel | | 8 h Licht/ 16 h Dunkel | | 10 h Licht/ 14 h Dunkel | |
| | MA | PMA | MA | PMA | MA | PMA |
| MIN [%] | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| ER [%] | 23 | 55 | 28 | 40 | 40 | 37 |
| NER [%] | 72 | 46 | 65 | 55 | 50 | 53 |
| Bilanz [%] | 97 | 102 | 95 | 96 | 91 | 91 |

MA: mikrobieller Abbau im Dunkeln (Kontrolle),

PMA: photoinduziert-mikrobieller Abbau

Aus diesen Bestrahlungsexperimenten lassen sich insgesamt keine relevanten photochemischen Einflüsse auf das Rückstandsverhalten von ¹⁴C-Diclofenac ableiten. Damit stellt die mikrobiell bedingte Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände den wesentlichen konzentrationsbestimmenden Prozess in den untersuchten Böden dar.

5.3.2 Ibuprofen und Ketoprofen

Mikrobieller Abbau nach Standard-Applikation

In den Batchexperimenten mit ^{14}C -Ibuprofen und ^{14}C -Ketoprofen stand die Frage im Mittelpunkt des Interesses, inwieweit das Abbauprozess dieser strukturanalogen Phenylpropionsäure-Derivate durch ihre Isobutyl- bzw. Benzoyl-Substituenten geprägt wird. Schließlich ließen sich in Labor- und Freilandstudien für die phenylring- bzw. alkyl-substituierten Morpholinfungizide Fenpropimorph und Aldimorph deutliche substanzspezifische Unterschiede für Mineralisation und Abbauwege sowie Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände und ihrer Remobilisierung nachweisen (Kreuzig, 1998).

In **Abb. 5.5** sind die Bilanzen zum mikrobiellen Abbau von ^{14}C -Ibuprofen in den beiden untersuchten Böden illustriert. Wie bei ^{14}C -Diclofenac fielen auch hier die bodenspezifischen Unterschiede in der Rückstandsdynamik auf. Im tonigen Schluff erfolgte wiederum eine schnelle Abnahme der extrahierbaren Rückstände, die mit einer schnellen Bildung nicht-extrahierbarer Anteile einhergingen. Letztere stiegen innerhalb von 14 Tagen auf 53 % der Anfangsaktivität an, um dann bis zum Tag 102 sukzessive auf 42 % abzufallen. Die Nachbehandlung der bereits mit Ethylacetat extrahierten Tag 102-Proben mit salzaurem Methanol setzte aus den nicht-extrahierten ^{14}C -Ibuprofen-Rückständen weitere 10 % der Radioaktivität frei. Auch in den zusätzlich durchgeföhrten, über 28 Tage dauernden Inkubationstests zur Remobilisierung nicht-extrahierter Rückstände, in denen der Zusatz von Belebtschlamm bzw. demineralisiertem Wasser zu einem erneuten Anstieg der mikrobiellen Aktivität in den bereits extrahierten Tag 102-Proben führte, wurden 26 % der applizierten Radioaktivität als ^{14}C -Kohlendioxid sowie 4 % als extrahierbare Rückstände freigesetzt. Aus diesen Tests lässt sich damit auf eine eher geringe Bindungsstärke dieser nicht-extrahierten ^{14}C -Ibuprofen-Rückstände an die Bodenmatrix schließen.

Im schluffigen Sand nahm die Extrahierbarkeit auf 21 % ab, während die nicht-extrahierbaren Anteile innerhalb von 14 Tagen auf 41 % anstiegen, um dann ebenfalls auf 28 % abzufallen. Bei einem gleichzeitigen Anstieg der Mineralisation auf 38 % bzw. 45 % zum Ende der Tests mit tonigem Schluff und schluffigen Sand konnte damit in den späteren Inkubationsintervallen auch auf eine ^{14}C -Kohlendioxid-Freisetzung aus der nicht-extrahierbaren Fraktion geschlossen werden. Darauf deutete auch der zweiphasige Verlauf der Mineralisation hin. So wurden anfangs Mineralisationsraten von 5350 pmol d^{-1} bzw. 1904 pmol d^{-1} gemessen, mit der die ^{14}C -Kohlendioxid-Freisetzung

aus der extrahierbaren Fraktion einhergehen könnte. Zum jeweiligen Versuchsende fielen dann die Mineralisationsraten auf 53 pmol d^{-1} bzw. 59 pmol d^{-1} ab.

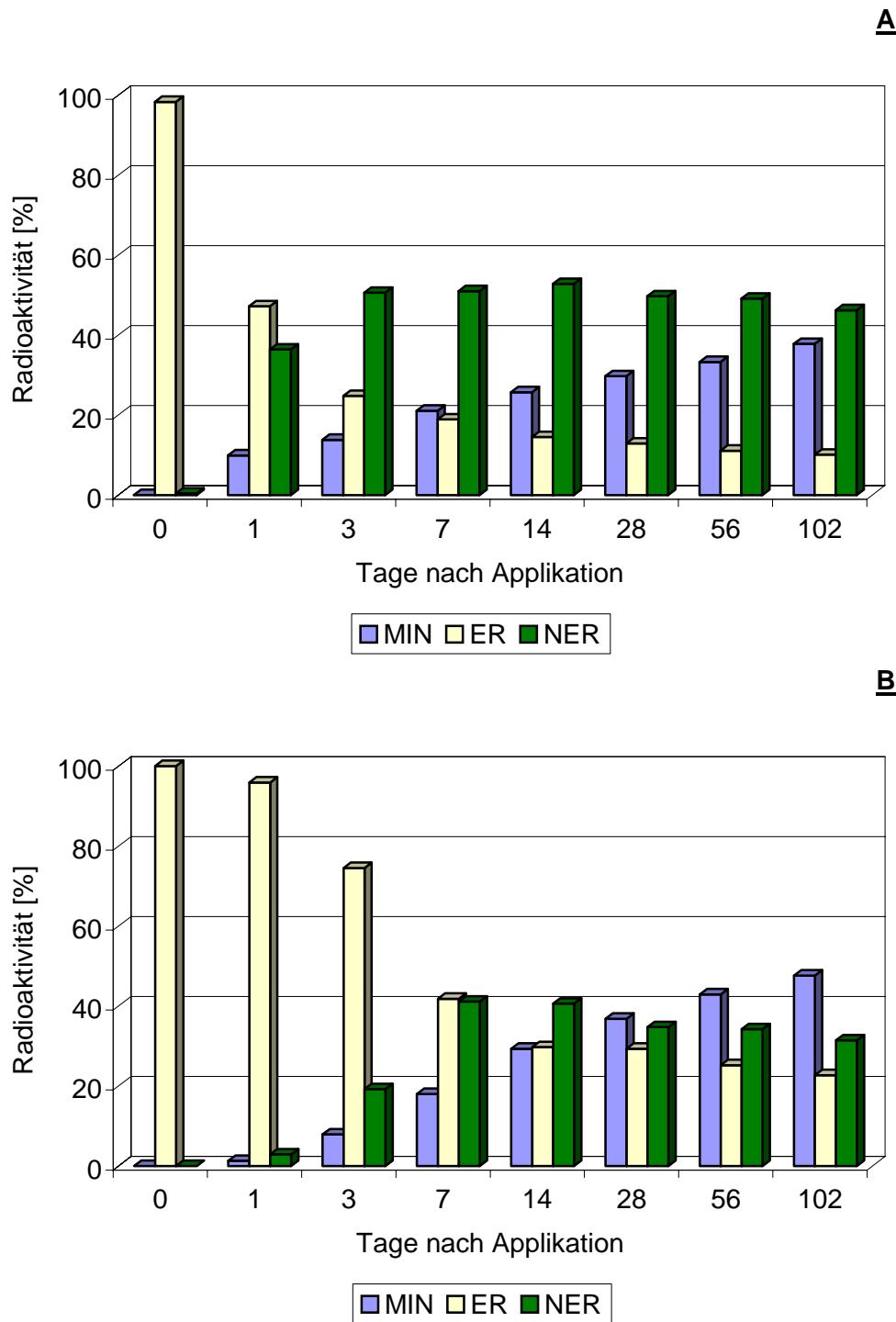


Abb. 5.5: Mikrobieller Abbau von ^{14}C -Ibuprofen in **A:** tonigem Schluff und **B:** schluffigem Sand nach Standard-Applikation

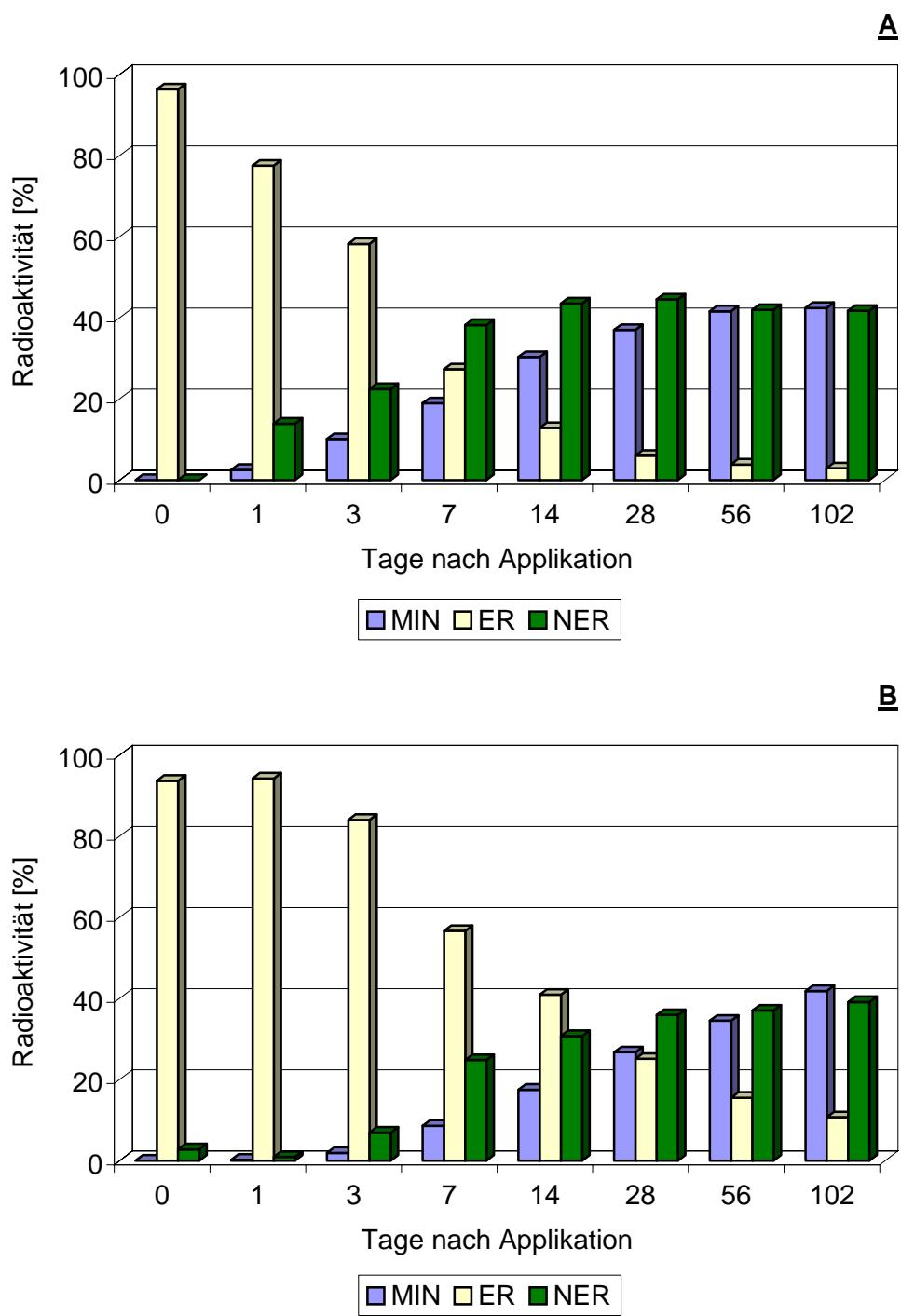


Abb. 5.6: Mikrobieller Abbau von ^{14}C -Ketoprofen in **A: tonigem Schluff und **B:** schluffigem Sand nach Standard-Applikation**

Unter Zugrundelegung der Persistenzkriterien der Pflanzenschutzmittel-Zulassung wiesen die hier ermittelten Werte für Mineralisation und Bildung nicht-extrahierbarer Rück-

stände ^{14}C -Ibuprofen als eine in Böden leichter abbaubare Substanz aus. Diese Abschätzung wurde durch das Metaboliten-Screening bekräftigt, nach dem ^{14}C -Ibuprofen als unveränderte Ausgangsverbindung in tonigem Schluff und schluffigem Sand nur noch in den Tag 1- bzw. Tag 7-Proben nachweisbar war. Hieraus errechneten sich DT₅₀-Werte von < 1 Tag bzw. 3 Tagen. Nach diesen Zeitpunkten wurde die Extraktzusammensetzung überwiegend von nicht identifizierten Metaboliten bestimmt.

Für ^{14}C -Ketoprofen war eine ähnliche Rückstandsdynamik zu erkennen (**Abb. 5.6**). Dabei kam es in den untersuchten Böden insbesondere innerhalb der ersten 7 Tage der Inkubation zu Unterschieden, in dem eine schnellere Abnahme der Extrahierbarkeit der ^{14}C -Ketoprofen-Rückstände im tonigen Schluff, einhergehend mit höheren Mineralisationsraten und Anteilen an nicht-extrahierbaren Rückständen, festgestellt wurde. Zum Ende der Abautests glich sich die Rückstandssituation in beiden Böden an. Mit DT₅₀-Werten von 3 bzw. 7 Tagen, einer Mineralisation im Mittel von 42 % und nicht-extrahierbaren Rückständen von 40 % ist ^{14}C -Ketoprofen ebenfalls als eine in Böden leichter abbaubare Substanz einzustufen.

Damit zeigten ^{14}C -Ibuprofen und ^{14}C -Ketoprofen in Böden eine geringere Persistenz als ^{14}C -Diclofenac. Diese ist nicht zwangsläufig auf die ^{14}C -Seitenkettenmarkierung der Phenylpropionsäure-Derivate zurückzuführen. Schließlich war in den ersten Inkubationsintervallen neben der raschen ^{14}C -Kohlendioxid-Freisetzung auch noch die jeweils applizierte Ausgangsverbindung in den Extrakten nachweisbar. Damit sind die Mineralisation sowie die Bildung extrahierbarer und nicht-extrahierbarer Rückstände als gleichzeitig ablaufende, konzentrationsbestimmende Prozesse in Böden zu betrachten.

Kurzzeittests zum mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbau

Die Langzeittests zur mikrobiellen Abbaubarkeit ergaben bezüglich der Rückstandsdynamik beider Phenylpropionsäure-Derivate hauptsächlich Unterschiede in den ersten Inkubationsintervallen, während sich die Rückstandssituation zum Versuchsende hin änderte. In den 3-tägigen Kurzzeittests traten damit diese Unterschiede deutlicher hervor. So zeigte sich in beiden Böden, dass ^{14}C -Ibuprofen stärker der Mineralisation und der Festlegung in der Bodenmatrix unterlag als ^{14}C -Ketoprofen (**Abb. 5.7 und 5.8**). Der Vergleich zwischen mikrobiellem und chemischen Abbau, definiert durch den Einsatz mikrobiell aktiver und inaktiver Bodenproben, zeigte deutlich, dass beide konzentrationsbestimmende Prozesse unmittelbar von der bodeninhärenten Mikroorganismenaktivität abhängen. Hieraus resultierend kann die Bildung nicht-extrahierbarer Rück-

stände nicht als eine Funktion der Sorption an die Bodenmatrix, sondern eher als eine Folge von Abbauprozessen angesehen werden. Relevante Unterschiede bezüglich einer Inkubation im Dunkeln und unter Bestrahlung lassen sich in den Ansätzen mit mikrobiell inaktiven Bodenproben nicht erkennen. Ein anderes Bild ergab sich insbesondere für die Abautest von ^{14}C -Ibuprofen im mikrobiell aktiven tonigen Schluff. Bei Inkubation im Dunkeln konnte so eine höhere Mineralisation und eine deutlich stärkere Affinität der Rückstände zu Bodenmatrix festgestellt werden. Der Anteil an nicht-extrahierbaren Rückständen belief sich hier auf 53 %, während sich im Bestrahlungs-experiment nur 40 % der applizierten Radioaktivität der Extraktion mit Ethylacetat entzogen. Hier konnte die Versuchsbeobachtung den Interpretationsansatz liefern, dass es in der Bestrahlungsapparatur trotz der zusätzlichen Kühlung des Probenbehälters infolge der Energieabstrahlung des gekühlten Quecksilber-Mitteldruckstrahlers zu einer Abtrocknung der Bodenoberfläche kam, mit dem eine Inhibierung der Mikroorganismenaktivität einhergehen konnte. Unter diesem Einfluss wird zwar die Übertragbarkeit der hier erzielten Ergebnisse auf die der Dunkelexperimente eingeschränkt. Doch werden in den Bestrahlungsexperimenten damit Verhältnisse wiedergegeben, wie sie auch unter Freilandbedingungen unter starker Sonneneinstrahlung auftreten.

Einfluss von Temperatur und Bodenfeuchte auf den mikrobiellen Abbau

Um die in der Bestrahlungsapparatur beobachteten Effekte näher zu charakterisieren, wurden Tests zum mikrobiellen Abbau bei verschiedenen Temperaturen und verschiedenen Bodenfeuchten durchgeführt. Allgemein wird dabei angenommen, dass mit einem Temperaturanstieg von 10 °C die Mikroorganismenaktivität deutlich gefördert wird. Aus **Abb. 5.9** wird dagegen ersichtlich, dass bei einer konstanten Bodenfeuchte von 13 %, die ca. 40 % der WK_{\max} des tonigen Schlusses entspricht, eine Temperaturerhöhung von 20 °C auf 30 °C nicht mit relevanten Änderungen der Rückstandssituation verbunden war. Die Absenkung der Inkubationstemperatur auf 10 °C führte dagegen bei einer geringeren Abnahme der Extrahierbarkeit zu einer verminderten Mineralisation, die den Temperatureinfluss auf die Mikroorganismenaktivität andeutet.

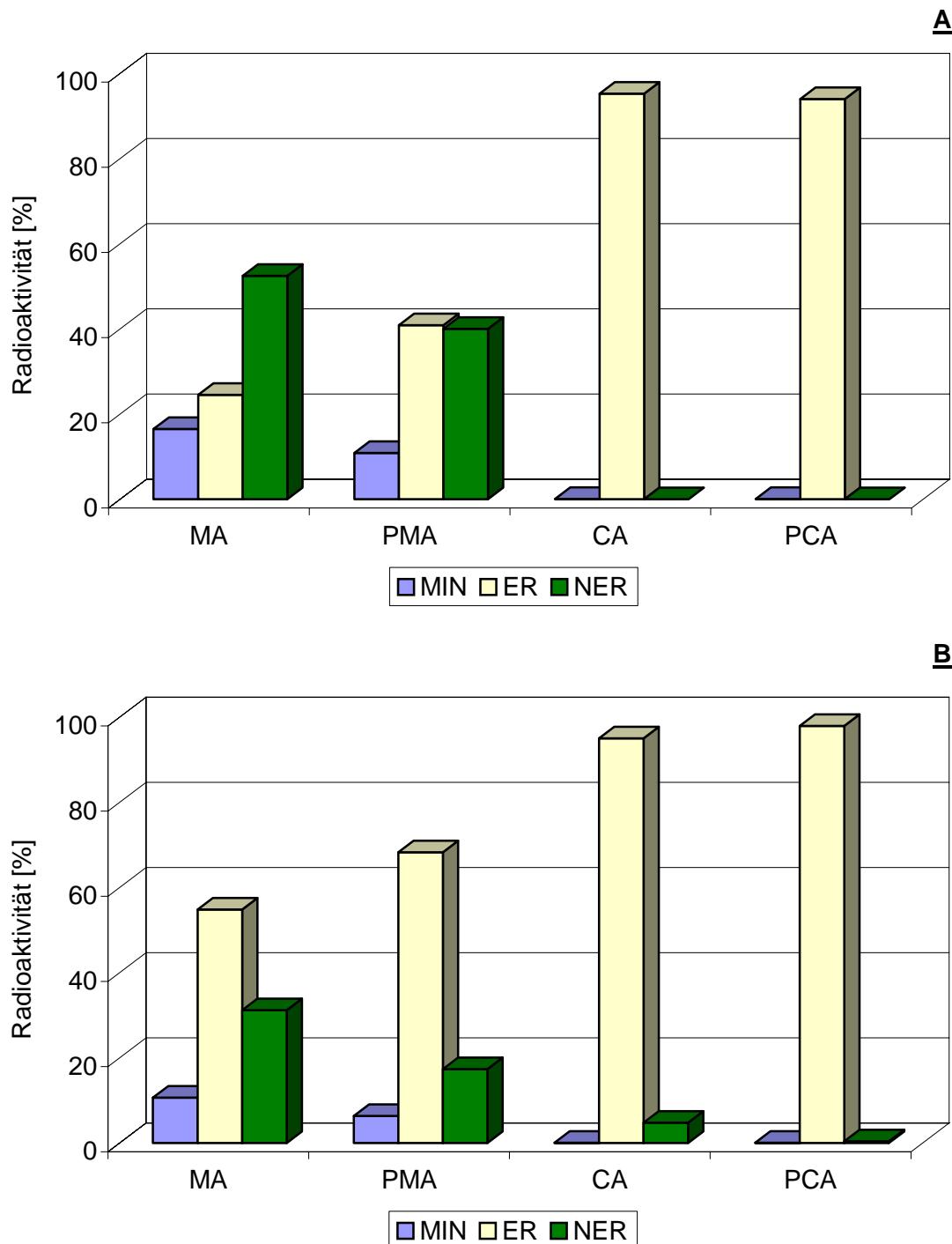


Abb. 5.7: Mikrobieller (MA), photoinduziert-mikrobieller (PMA), chemischer (CA) und photoinduziert-chemischer Abbau (PCA) von ^{14}C -Ibuprofen in **A:** tonigem Schluff und **B:** schluffigem Sand nach Standard-Applikation

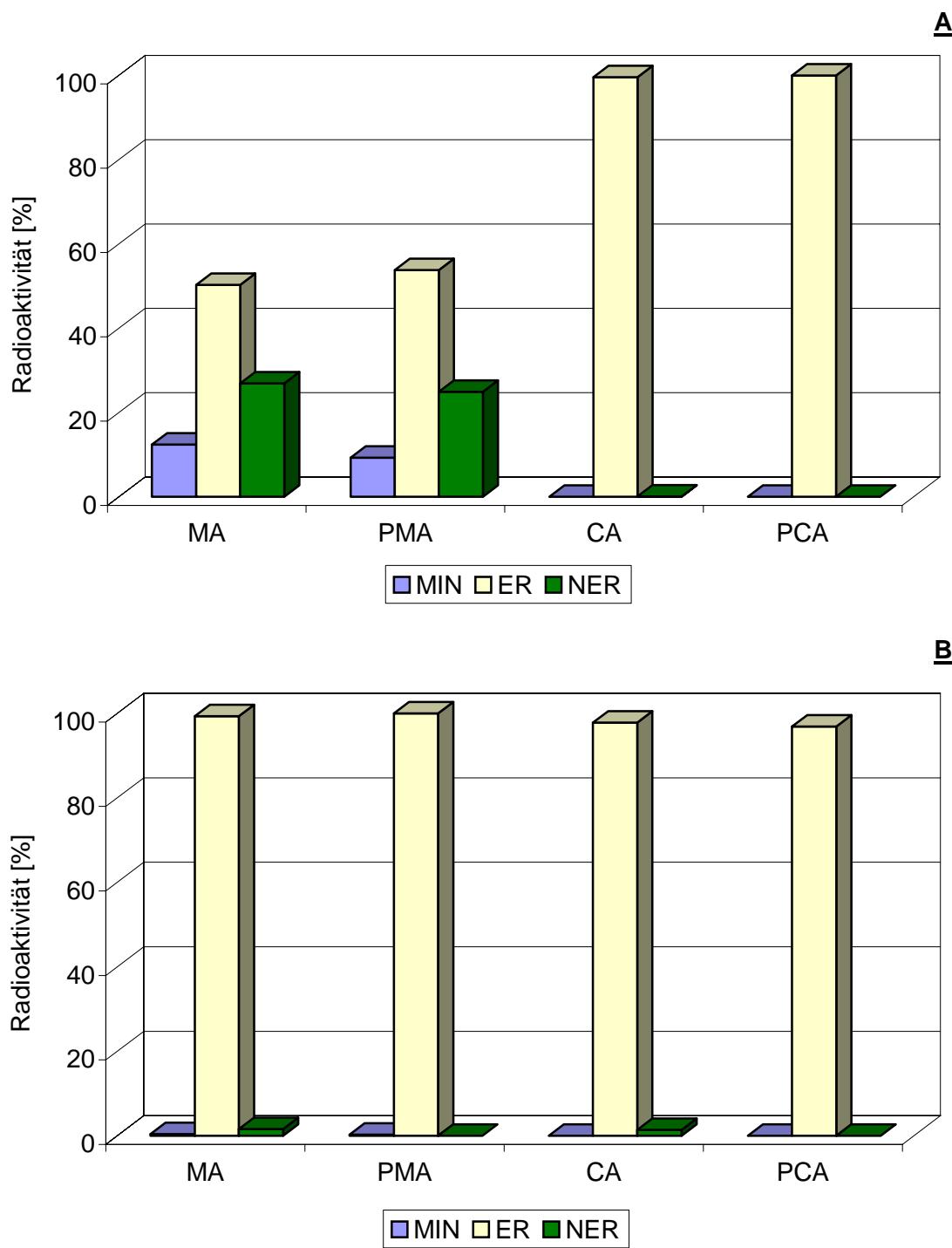


Abb. 5.8: Mikrobieller (MA), photoinduziert-mikrobieller (PMA), chemischer (CA) und photoinduziert-chemischer Abbau (PCA) von ^{14}C -Ketoprofen in **A:** tonigem Schluff und **B:** schluffigem Sand nach Standard-Applikation

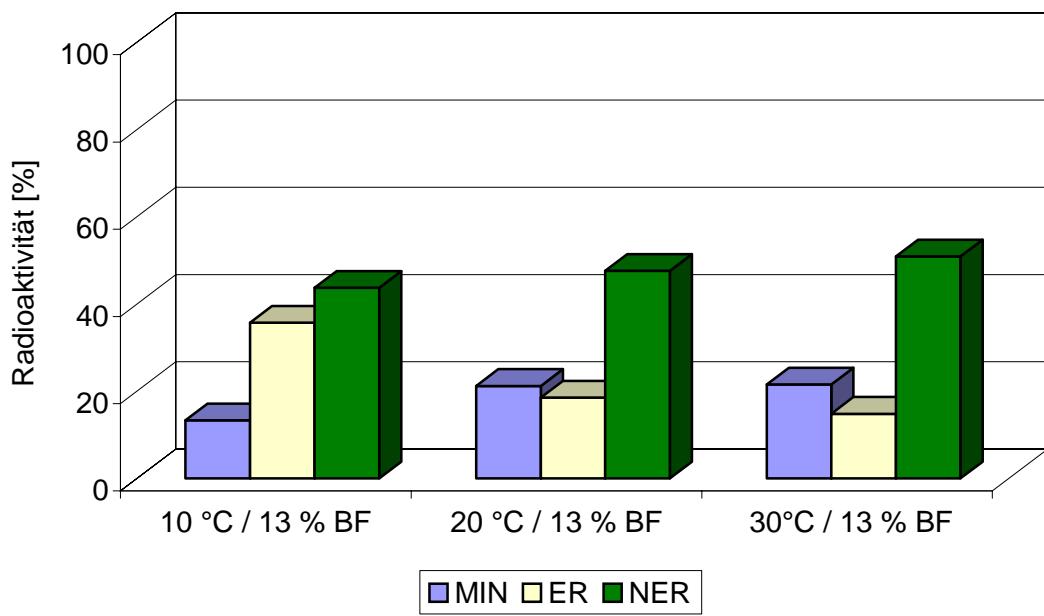


Abb. 5.9: Einfluss der Temperatur auf den mikrobiellen Abbau von ^{14}C -Ibuprofen in tonigem Schluff bei konstanter Bodenfeuchte

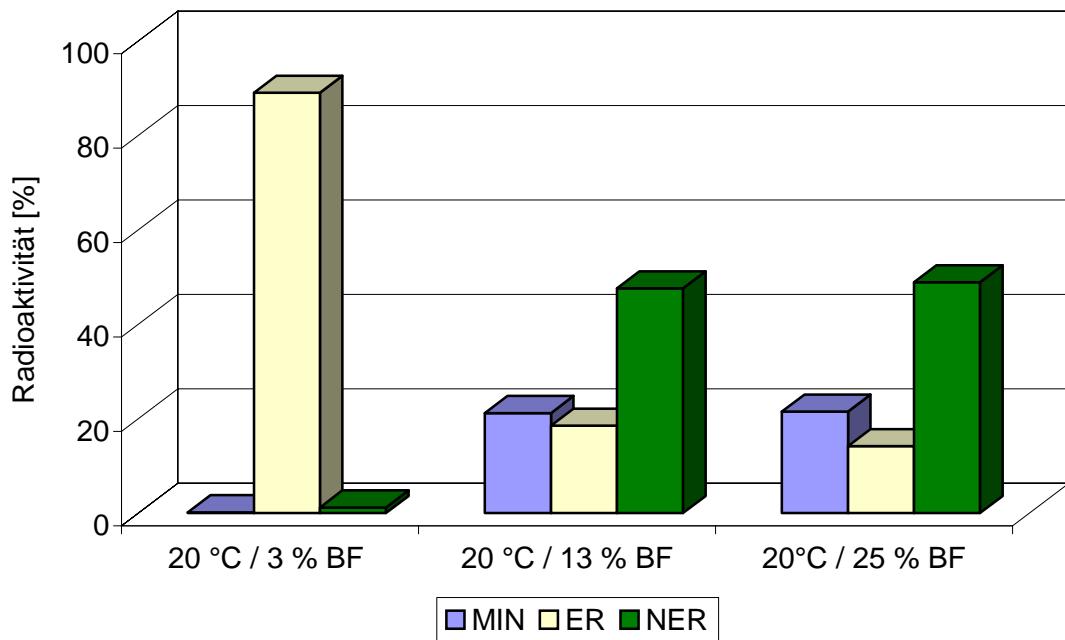


Abb. 5.10: Einfluss der Bodenfeuchte (BF) auf den mikrobiellen Abbau von ^{14}C -Ibuprofen in tonigem Schluff bei konstanter Temperatur

Einen wesentlich stärkeren Einfluss ging in diesen Dunklexperimenten über 7 Tage und konstanten 20 °C von der Bodenfeuchte aus. Wie aus **Abb. 5.10** hervorgeht, resultierte ähnlich wie beim Temperatureinfluss aus der Steigerung der Bodenfeuchte auf 25 % nur ein geringer Effekt auf die Rückstandsdynamik von ¹⁴C-Ibuprofen. Eine grundlegend andere Situation ergab sich aus der Absenkung der Bodenfeuchte auf 3 %, die aus der Lufttrocknung feldfrischer Bodenproben hervorging. Die hiermit einhergehende Inhibierung der Mikroorganismenaktivität bedingte eine deutliche Unterdrückung von Abbauprozessen, so dass Ibuprofen auch 7 Tage nach der Dotierung noch als applizierte Ausgangverbindung in der extrahierbaren Fraktion vorlag. Mit diesen zusätzlichen Tests wird zum einen die Bedeutung mikrobieller Abbauprozesse auf die Abbaubarkeit von Pharmaka-Rückständen in Böden unterstrichen. Zum anderen belegen diese Ergebnisse, dass die Abtrocknung der Bodenoberfläche in der Bestrahlungsapparatur einen größeren Einfluss als die Temperatur auf die Rückstandsdynamik ausübt.

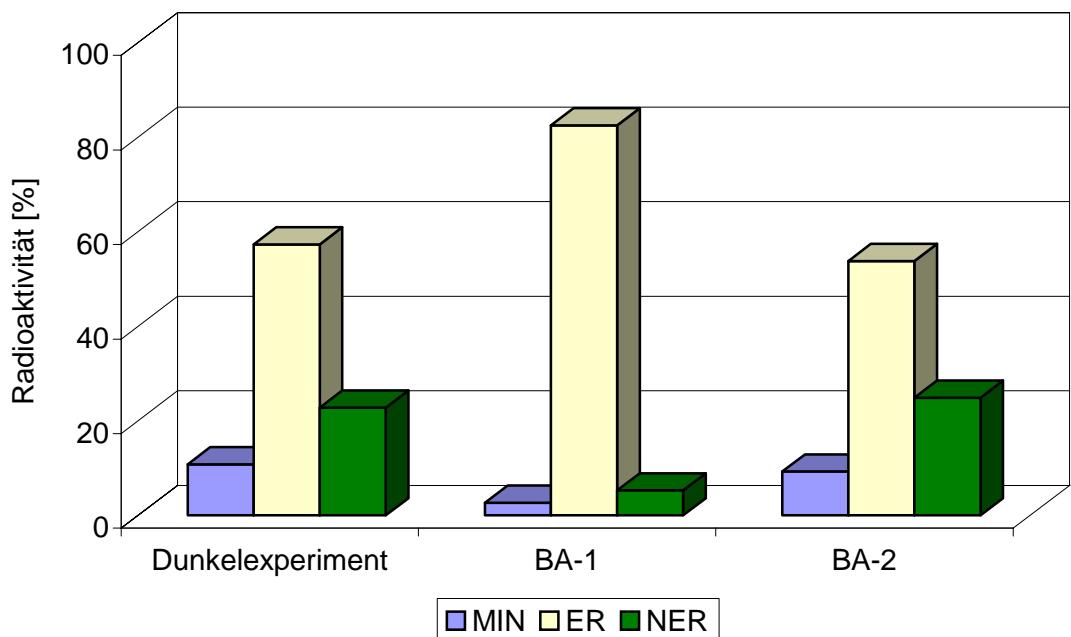


Abb. 5.11: Tests zum photoinduziert-mikrobiellen Abbau von ¹⁴C-Ketoprofen in den Bestrahlungsapparaturen BA-1 und BA-2 im Vergleich zum Dunklexperiment

Weiterentwicklung der Bestrahlungsapparatur

Für den Prototyp der Bestrahlungsapparatur (BA-0), mit dem noch erste Untersuchungen zum photoinduziert-mikrobiellen Abbau des Azol Fungizides Prochloraz durchgeführt wurden (Kreuzig, 1998, Höllrigl-Rosta et al., 1999), wurden in diesem Forschungsvorhaben 2 Stufen der Weiterentwicklung umgesetzt. Im ersten Schritt wurde ein abnehmbarer Probenbehälter eingebaut, der im zweiten Schritt zusätzlich mit einer unabhängigen Kühlung ausgestattet wurde, um so für diese Tests 50 g-Proben jeder Bodenart einsetzen und Temperatureinflüsse des Quecksilber-Mitteldruckstrahlers kompensieren zu können. Ersten vergleichenden Untersuchungen mit ¹⁴C-Diclofenac schlossen sich die mit ¹⁴C-Ketoprofen an. Die in **Abb. 5.11** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit der zusätzlichen Kühlung des Probenbehälters in der BA-2 die Bodenoberfläche weniger abtrocknet und damit die Mikroorganismenaktivität weniger inhibiert wird. Hieraus resultieren dann ähnlichere Radioaktivitätsverteilungen wie im Dunklexperiment. Im Gegensatz hierzu belegten die Tests in BA-1 anhand der höheren extrahierbaren Anteile von 83 %, dass Abbauprozesse deutlich eingeschränkt wurden. Diese Ergebnisse stehen damit in Einklang mit den Tests mit ¹⁴C-Diclofenac.

Im Richtlinienentwurf der OECD (2002b) zur Phototransformation von Chemikalien auf Bodenoberflächen wird ein Xenon-Strahler als Lichtquelle vorgesehen, um die Intensitätsverhältnisse des Sonnenlichtes realitätsnah nachzustellen. Aus diesem Grund wurde in der auch hier verwendeten Bestrahlungsapparatur BA-2 ein Xenon-Strahler exemplarisch für Tests zum photoinduzierten Abbau von ¹⁴C-Ibuprofen eingesetzt. Da dieser eine höhere Ausgangsleistung und damit auch eine höhere Energieabstrahlung hatte, wurde gegenüber dem Quecksilber-Mitteldruckstrahler die Wasserkühlung auf die effektivere Umluftkühlung mit Druckluft umgestellt. Im Vergleich beider Strahler zum parallel durchgeführten Dunklexperiment ergab sich für die Rückstandsdynamik dieser Substanz eine Abstufung (**Abb. 5.12**), nach der die höchste Freisetzung von ¹⁴C-Kohlendioxid und die höchste Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände im Dunklexperiment gefunden wurden, wogegen in den Bestrahlungsexperimenten nur geringfügige Intensitätsunterschiede der Radioaktivitätsverteilung auftraten. Aus Gründen der Vergleichbarkeit photoinduzierter Effekte auf den mikrobiellen bzw. chemischen Abbau der untersuchten Pharmaka beziehen sich im weiteren die Aussagen jeweils auf die Tests mit dem Quecksilber-Mitteldruckstrahler.

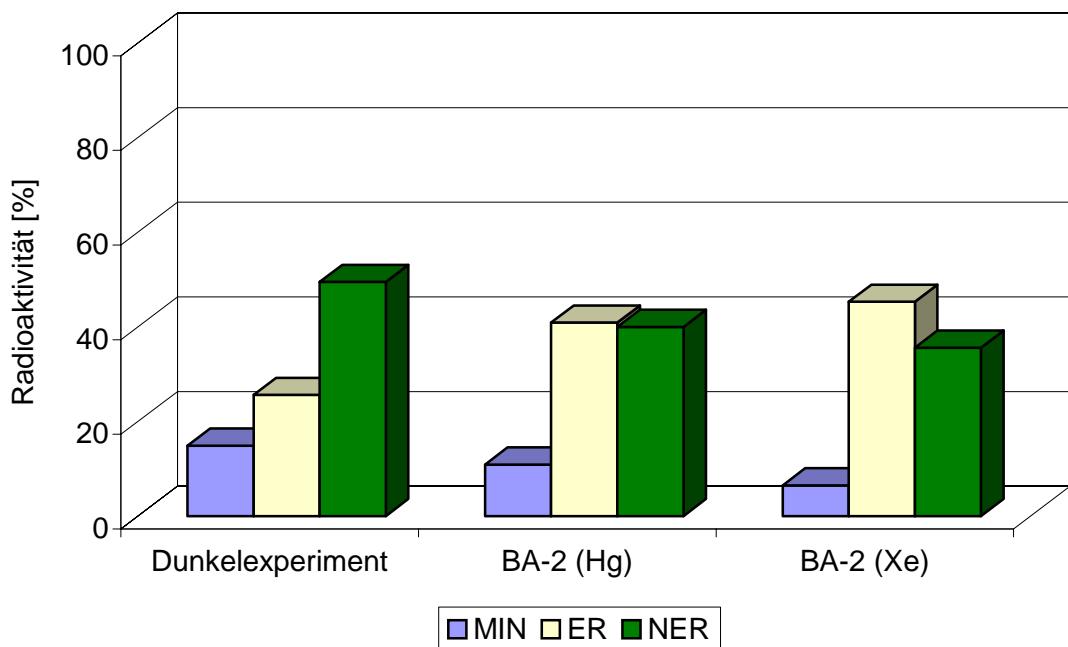


Abb. 5.12: Tests zum photoinduziert-mikrobiellen Abbau von ^{14}C -Ibuprofen in der Bestrahlungsapparaturen BA-2 mit Quecksilber-Mitteldruck- (Hg) bzw. Xenon-Strahler (Xe) im Vergleich zum Dunklexperiment

Stabilitätstests in Klärschlamm

In diesem Forschungsvorhaben wurde der Eintragspfad über kontaminierte Klärschlämme in Böden exemplarisch für ^{14}C -Ibuprofen und ^{14}C -Ketoprofen untersucht. Hierzu erfolgte die Alterung der Rückstände in einer 102 Tage dauernden Lagerung des kommunalen Klärschlammes. Die aus diesen Tests resultierende Radioaktivitätsverteilung zeigte eine weitgehende Übereinstimmung mit der in den Tests mit schluffigem Sand nach Standard-Applikation gefundenen Rückstandsdynamik (**Abb. 5.13**).

Dabei stieg die ^{14}C -Kohlendioxid-Freisetzung bis zum letzten Inkubationsintervall kontinuierlich an, ohne allerdings einen so hohen Anteil wie in dem untersuchten Boden zu erreichen. Die mit der sukzessiven Abnahme der Extrahierbarkeit einhergehenden Zunahme der nicht-extrahierbaren Rückstände erreichte nach 14 Tagen mit 53 % der anfangs applizierten Radioaktivität den höchsten Wert, um dann zum Versuchsende auf unter 30 % abzunehmen. Aus dieser Zweiphasigkeit war bei weiter steigenden Mineralisationsraten wiederum eine ^{14}C -Kohlendioxid-Freisetzung aus der nicht-extrahierbaren Fraktion anzunehmen. Da im Gegensatz zu Böden diese überwiegend auf

eine Einlagerung in die Biomasse zurückzuführen sein dürfte, war insgesamt mit einer höheren Verfügbarkeit bzw. Remobilisierung dieser Fraktion zu rechnen.

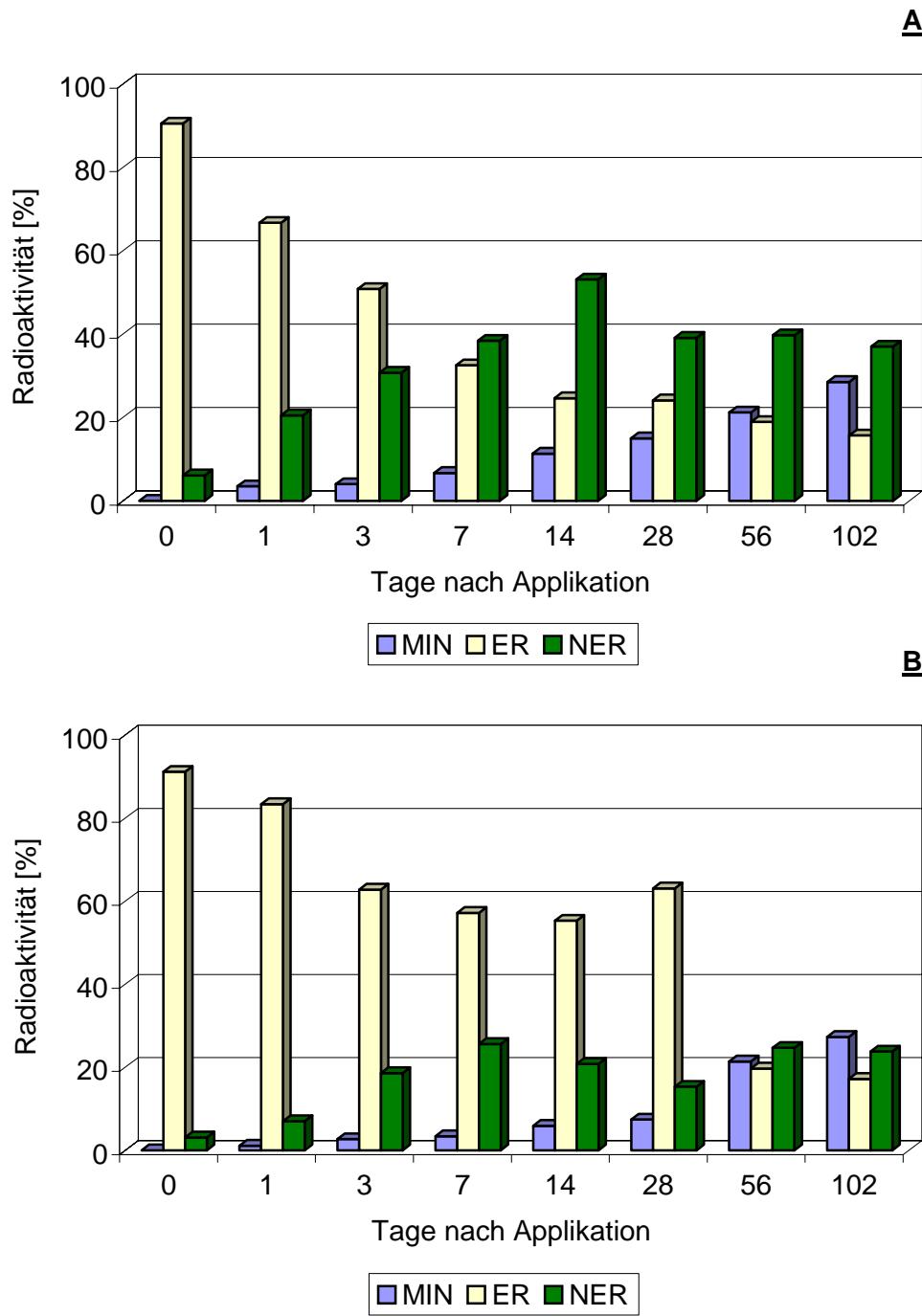


Abb. 5.13: Stabilitätstest von A: ^{14}C -Ibuprofen und B: ^{14}C -Ketoprofen in Klär- schlamm

Für ¹⁴C-Ketoprofen ergab sich eine sehr ähnliche Rückstandsdynamik im Klärschlamm, die mit einer geringeren Mineralisation und Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände charakterisiert werden konnte. Damit blieben die extrahierbaren Rückstände bis zu Tag 28 dominierend, um erst dann auf deutlich niedrigere Werte abzufallen.

Mikrobieller Abbau nach Testklärschlamm-Applikation

Auf der Basis der 7-tägigen Stabilitätstests wurde Testklärschlamm mit definiert gealterten ¹⁴C-Ibuprofen- und ¹⁴C-Ketoprofen-Rückständen hergestellt, der für die Dotierung der tonigen Schluffproben eingesetzt wurde. In der Serie von Batchexperimenten mit ¹⁴C-Ibuprofen wurden mit der Testklärschlamm-Applikation 33 % extrahierbare und 38 % nicht-extrahierbare Rückstände in die Bodenproben eingebracht. Von den extrahierbaren Anteilen entfielen dabei noch 13 % auf ¹⁴C-Ibuprofen als unveränderte Ausgangsverbindung.

Mit dem Einmischen des Testklärschlammes in die Bodenproben erfolgte eine sofortige Festlegung der Rückstände im Boden. Bereits ohne weitere Inkubation lagen in der Tag 0-Probe 19 % extrahierbare und 54 % nicht-extrahierbare Rückstände vor (**Abb. 5.14**). Die Festlegung von ¹⁴C-Ibuprofen-Rückständen in der Bodenmatrix ist von der bodeninhärenten Mikroorganismenaktivität abhängig, wie der Vergleich des Abbaus in mikrobiell aktiven und inaktiven Bodenproben zeigte. Aus der Geschwindigkeit und Intensität dieses Prozesses kann auf eine gesteigerte mikrobielle Aktivität geschlossen werden, die durch die mit der Klärschlammatrix eingebrachten leicht abbaubaren organischen Substanz weiter gesteigert wird. Nach 1-tägiger Inkubation stieg die nicht-extrahierbare Fraktion noch auf 60 % an, um dann bis zum Versuchsende abzufallen. Gleichzeitig nahm die Mineralisation in diesem Zeitraum sukzessive zu und bestimmte in der Tag 102-Probe mit 35 % die Rückstandssituation stärker als die nicht-extrahierbare Fraktion. Die extrahierbaren Anteile nahmen dagegen kontinuierlich von 19 % auf 8 % ab.

Unter dem Einfluss der Testklärschlamm-Applikation ergab sich auch für ¹⁴C-Ketoprofen, das mit dem Testklärschlamm noch zu 24 % als unveränderte Ausgangsverbindung appliziert wurde, eine Abnahme der Extrahierbarkeit, die allerdings weniger deutlich als für ¹⁴C-Ibuprofen ausfiel. Mit der Tag 7-Probe glich sich die Rückstandssituation sogar der im tonigen Schluff nach Standard-Applikation an, so dass Mineralisation und nicht-extrahierbare Rückstände mit 44 bzw. 34 % nach 102 Tagen dominierend waren. Die extrahierbare Fraktion war mit 3 % von untergeordneter Bedeutung. Diese Tests

verdeutlichen, dass die Rückstandsdynamik beider Phenylpropionsäure-Derivate vom Eintragspfad beeinflusst wurde.

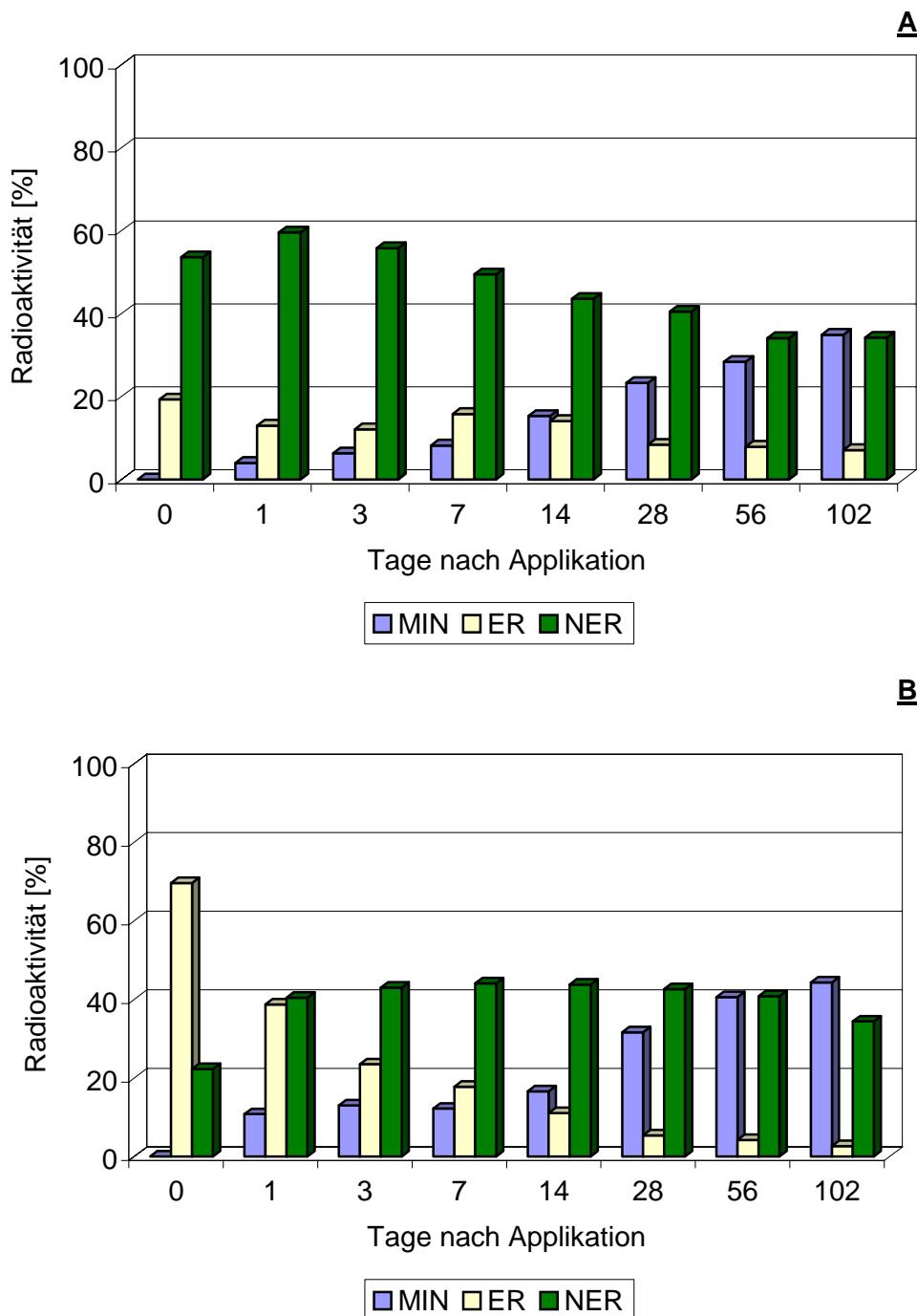


Abb. 5.14: Mikrobieller Abbau von A: ¹⁴C-Ibuprofen und B: ¹⁴C-Ketoprofen in toxischem Schluff nach Testklärschlamm-Applikation

Tab. 5.9: Radioaktivitätsbilanzen in den Laborbatchexperimenten zum mikrobiellen Abbau von ^{14}C -Ibuprofen in A: tonigem Schluff, B: schluffigem Sand, C: Klärschlamm, jeweils nach Standard-Applikation, und D: tonigem Schluff nach Testklärschlamm-Applikation

| <u>A:</u> | Tag 1 | Tag 7 | Tag 28 I | Tag 28 II | Tag 102 I | Tag 102 II |
|-------------------|-------|-------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| MIN [%] | 10 | 21 | 30 | 30 | 38 | 37 |
| ER [%] | 47 | 19 | 13 | 13 | 10 | 10 |
| NER [%] | 36 | 51 | 50 | 49 | 45 | 47 |
| Bilanz [%] | 93 | 91 | 93 | 92 | 93 | 94 |

| <u>B:</u> | Tag 1 | Tag 7 | Tag 28 I | Tag 28 II | Tag 102 I | Tag 102 II |
|-------------------|-------|-------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| MIN [%] | 2 | 18 | 37 | 37 | 48 | 47 |
| ER [%] | 96 | 42 | 29 | 29 | 23 | 23 |
| NER [%] | 3 | 41 | 36 | 34 | 32 | 31 |
| Bilanz [%] | 101 | 101 | 102 | 100 | 103 | 101 |

| <u>C:</u> | Tag 1 | Tag 7 | Tag 28 I | Tag 28 II | Tag 102 I | Tag 102 II |
|-------------------|-------|-------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| MIN [%] | 4 | 7 | 16 | 14 | 29 | 28 |
| ER [%] | 67 | 33 | 21 | 27 | 16 | 15 |
| NER [%] | 21 | 38 | 40 | 38 | 37 | 29 |
| Bilanz [%] | 92 | 78 | 77 | 79 | 82 | 72 |

| <u>D:</u> | Tag 1 | Tag 7 | Tag 28 I | Tag 28 II | Tag 102 I | Tag 102 II |
|-------------------|-------|-------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| MIN [%] | 4 | 8 | 22 | 25 | 35 | 35 |
| ER [%] | 13 | 16 | 8 | 9 | 7 | 8 |
| NER [%] | 60 | 50 | 39 | 42 | 36 | 32 |
| Bilanz [%] | 77 | 74 | 69 | 76 | 78 | 75 |

Mit der Einbeziehung des Abbauverhaltens von Humanpharmaka in Klärschlamm und der Testklärschlamm-Applikation als Eintragspfad für Humanpharmaka-Rückstände in Böden wurden zum ersten Mal Untersuchungen mit diesem experimentellen Design durchgeführt. Bezuglich der Herstellung von Testklärschlamm konnten aus Gründen der Praktikabilität nur kurzfristige Alterungsprozesse der Pharmaka-Rückstände während einer 7-tägigen Lagerung des Klärschlamms betrachtet werden. Dennoch wurde hier ein innovativer, umweltrelevanter Ansatz verfolgt, der dann im "Runoff-Projekt" auf Veterinärpharmaka-Rückstände in Gülle übertragen wurde (Kreuzig und Höltge, 2005, Kreuzig et al., 2005b).

Insgesamt auffällig war in diesen Testserien, dass sowohl in den Stabilitäts- als auch in den Abautests für ¹⁴C-Ibuprofen und ¹⁴C-Ketoprofen Bilanzverluste auftraten, die aus den Abautests in Böden nach Standard-Applikation in der Art nicht bekannt waren. Dieser Aspekt geht deutlich aus der Gegenüberstellung der Daten zur Qualitätssicherung in **Tab. 5.9** hervor. Nach der Applikation von ¹⁴C-Ibuprofen als Standardlösung zu den untersuchten Bodenproben ergab sich eine weitgehende Konstanz in den Bilanzen. Der Vergleich der parallel durchgeführten Tag 28- und Tag 102-Batchexperimente belegte darüber hinaus die in diesen Labortestsystemen erzielte Reproduzierbarkeit. Im Klärschlamm und im tonigen Schluff nach Testklärschlamm-Applikation war zwar ebenfalls die Reproduzierbarkeit gegeben, doch traten hier Bilanzverluste bis ca. 30 % auf. Diese könnten ggf. in der Aufarbeitung der Klärschlammproben begründet sein. Im letzten Arbeitsschritt vor der Verbrennung wird nämlich das extrahierte Probenmaterial im Exsikkator zur Entfernung des überschüssigen Lösungsmittels getrocknet, so dass hier ggf. Substanzverluste eine Rolle spielen. Nach einer Weiterentwicklung des Aufarbeitungsverfahrens konnten für ¹⁴C-Sulfamethoxazol und ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol diese Verluste vermieden werden (s. Kapitel 5.3.5).

Labortests zur Verlagerung von ¹⁴C-Ibuprofen in Böden

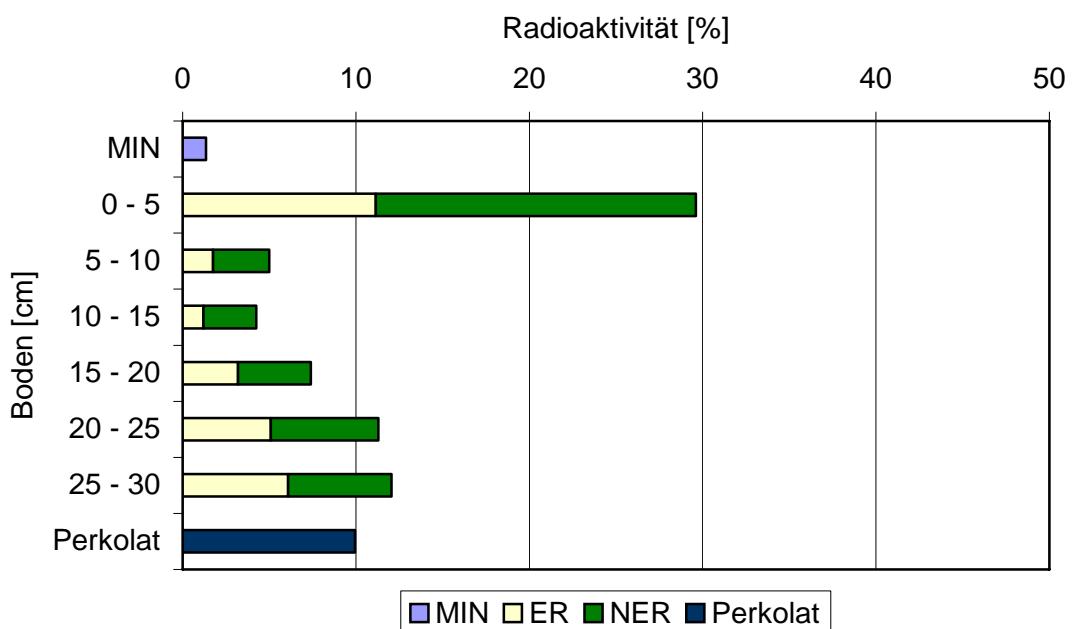
Für ¹⁴C-Ibuprofen fand der unter Laborbedingungen mögliche Methodenkatalog der Verlagerungstests Anwendung. In Ergänzung zu den ermittelten K_d-Werten wurden so Säulenexperimente mit gestörten Bodenproben und gesättigtem Wasserfluss sowie Laborlysimeterexperimente mit ungestörten Bodenkernen durchgeführt. Da bei allen Tests geschlossene Labortestsysteme eingesetzt wurden, konnte neben der Ermittlung der Perkolat-Kontamination eine Gesamtbilanz unter Berücksichtigung der Mineralisation sowie der Differenzierung zwischen extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Frak-

tionen in den tiefendifferenzierten Bodenproben aufgestellt werden.

Verlagerungstendenzen in Bodensäulen

In den Batch-Equilibrium-Experimenten zur Ermittlung der Boden/Wasser-Verteilungs-koeffizienten wurde mit K_d -Werten von 6 bzw. 18 L kg^{-1} für ^{14}C -Ibuprofen nach Standard-Applikation eine höhere Mobilität im schluffigen Sand als im tonigen Schluff festgestellt. In den anschließenden Säulenexperimenten ergaben sich für ^{14}C -Ibuprofen-Rückstände allerdings deutlich höhere Verlagerungstendenzen im tonigen Schluff (**Abb. 5.15**). So wurden 10 % der anfangs applizierten Radioaktivität im Perkolat nachgewiesen, während dieser Anteil wider Erwarten im Test mit schluffigen Sand nur 2 % betrug. Die erhöhte Verlagerungstendenz im Schluffboden spiegelte sich auch in der Kontamination der einzelnen Bodenschichten wider, die zwar hier von der 0-5 cm-Schicht erst einmal abnahm, dann aber sukzessive bis zur 25-30 cm-Schicht anstieg. Im schluffigen Sand wurden dagegen 46 % der applizierten Radioaktivität in der 0-5 cm-Schicht zurückgehalten, deren Anteil auf 0.5 % in der 25-30 cm-Schicht sank. In diesen Verlagerungstests war die im schluffigen Sand 10-fach höhere Mineralisation besonders auffällig, obgleich der tonige Schluff gemäß SIR-Messung den mikrobiell aktiveren Boden darstellte und hier in den Tests zum mikrobiellen Abbau prinzipiell die höheren Mineralisationsraten konstatiert wurden. Unter dem Einfluss des gesättigten Wasserflusses schien hier die bodeninhärente Mikroorganismenaktivität einer deutlichen Inhibierung zu unterliegen, die auch durch die zugunsten der extrahierbaren gegenüber der nicht-extrahierbaren Fraktion verschobenen Intensitätsverteilungen betont wurde. Auch dieser Aspekt ist ein Indiz für einen in der Säule auftretenden Inaktivierungsprozeß, der ohne die simultane Erfassung von Verlagerung und Abbau nicht hätte identifiziert werden können (Kreuzig et al., 2005b). Insgesamt stellen die Säulenexperimente damit gegenüber Freilandbedingungen ein sehr artificielles Testdesign dar. Aufgrund der hohen ^{14}C -Ibuprofen-Verlagerung im tonigen Schluff wurde in einem weiteren Ansatz mit schluffigen Tonboden aus Adenstedt (AD-A) ein Metaboliten-Screening möglich, für das die Analyten aus dem Perkolat mittels Festphasenextraktion angereichert und nach Derivatisierung zu korrespondierenden Methylestern mittels GC/MS analysiert wurden. Hier konnte Ibuprofen als unveränderte Ausgangsverbindung durch Retentionszeit- und Massenspektrenvergleich mit der authentischen Referenzchemikalie identifiziert und der Substanzdurchbruch mit 4 % beziffert werden. Mittels Spektrenvergleich ergaben sich hier auch Hinweise auf Hydroxy- und Carboxy-Ibuprofen.

A



B

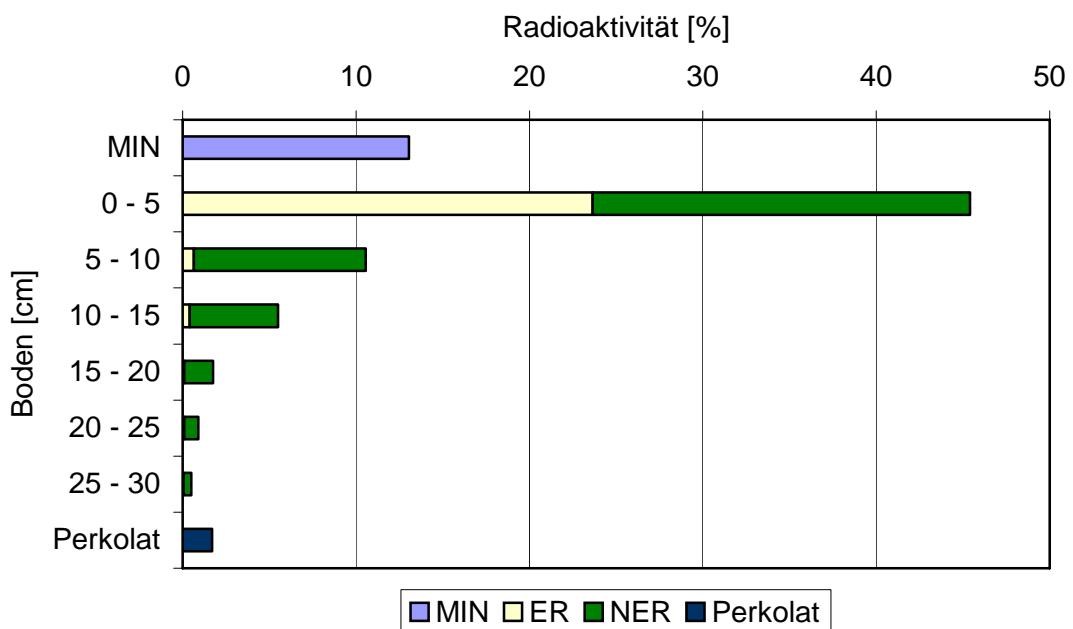


Abb. 5.15: Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Ibuprofen nach Standard-Applikation im Säulenexperiment mit A: tonigem Schluff und B: schluffigem Sand

In Ergänzung zu diesen Tests wurde analog der Methodenvorschrift der OECD (2002c) auch der Einfluss einer unterschiedlich zusammengesetzten Bodenlösung getestet. Als

"künstlicher" Regen wurde Calciumchlorid-Lösung eingesetzt, was den ^{14}C -Ibuprofen-Durchbruch auf 0.3 % reduzierte. Diese Ergebnisse zeigten, dass voraussichtlich durch das im ersten Ansatz verwendete demineralisierte Wasser als Eluent gelöster organischer Kohlenstoff aus der Huminstofffraktion stärker freigesetzt wurde, der infolge von Co-Sorption und Co-Transport für die stärkere Ibuprofen-Verlagerung ursächlich sein könnte (Kögel-Knabner et al., 1993, Kreuzig, 1998). Entsprechend der insgesamt niedrigeren Perkolat-Kontamination in den Tests mit schluffigem Sand konnte Ibuprofen im Perkolat nicht identifiziert werden. Diese Ergebnisse stimmen damit mit denen von Oppel (2002) und Oppel et al. (2004) überein, die Verlagerungstests mit ^{14}C -Ibuprofen und den Referenzböden EUROSOL 5 und LUFA 2.2 durchführten.

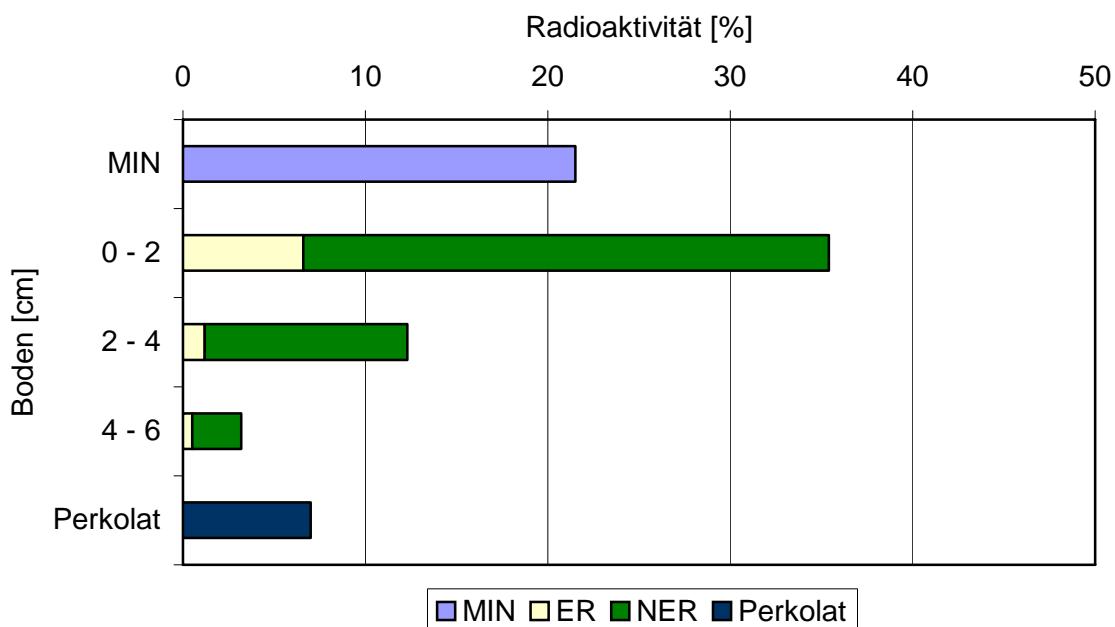


Abb. 5.16: Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Ibuprofen nach Standard-Applikation im Kleinlysimetertest mit tonigem Schluff vor Bodenbearbeitung in 28 Tagen

Verlagerungstendenzen in Bodenkernen

Die Tendenzen zu Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Ibuprofen in Säulenexperimenten mit tonigem Schluff konnten in Kleinlysimetertests, in denen ungestörte Bodenkerne (6 cm Höhe, 8.5 cm ID) eingesetzt und diskontinuierlich beregnet wurden, nicht bestätigt

werden. Im ersten Experiment, für das der Bodenkern auf dem Ackerstandort Neuenkirchen nach der Weizenernte, aber noch vor der Bodenbearbeitung zur Saatbettbereitung gestochen wurde, führte die Beregnung von 200 L m^{-2} in 28 Tagen zu einer Perkolat-Kontamination mit ^{14}C -Ibuprofen-Rückständen von 7 % (**Abb. 5.16**). Unter den Bedingungen des ungesättigten Wasserflusses erfolgte keine Inhibierung der Mikroorganismenaktivität, so dass in diesem Zeitraum eine ^{14}C -Kohlendioxid-Freisetzung von 22 % gemessen wurde. Über 30 % der ^{14}C -Ibuprofen-Rückstände verblieben in der 0-2 cm-Bodenschicht. Neben der mit zunehmender Bodentiefe abnehmenden Kontamination fiel auf, dass die Rückstände überwiegend in der nicht-extrahierbaren Fraktion auftraten. Im Gegensatz zu entsprechenden Säulentests spiegelte dieses Bild eine für mikrobiell aktive Böden typische Rückstandsdynamik von ^{14}C -Ibuprofen wider.

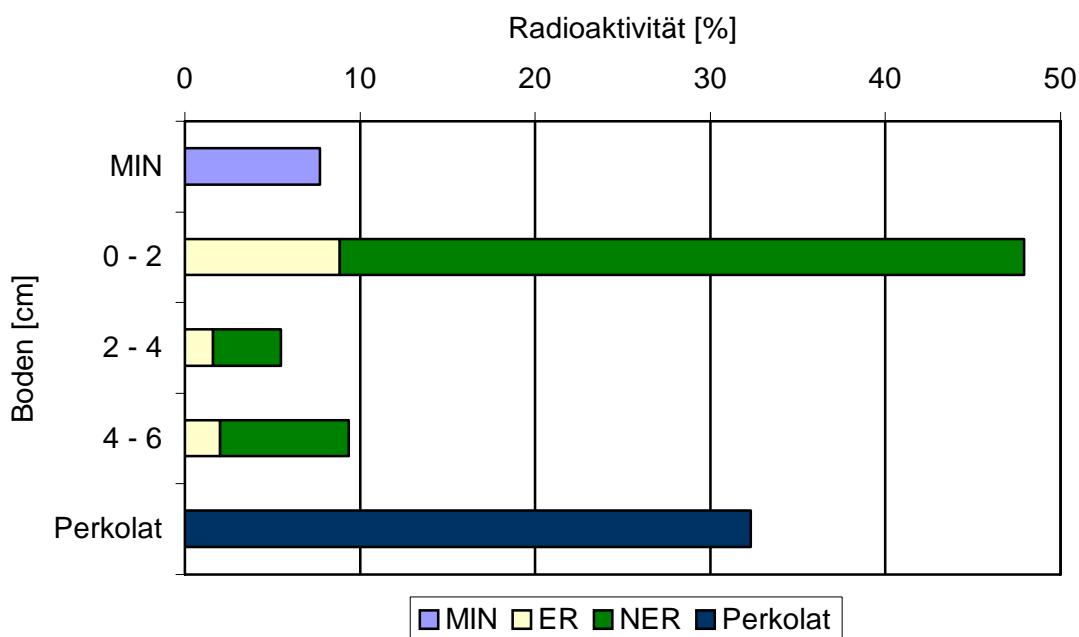


Abb. 5.17: Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Ibuprofen nach Standard-Applikation im Kleinlysimetertest mit tonigem Schluff nach Bodenbearbeitung in 14 Tagen

Weitere Tests zeigten die Bedeutung der am Standort zum Zeitpunkt der Probenahme vorherrschenden Bodenstruktur auf. Während in den ersten Tests Bodenkerne aus einer über eine Vegetationsperiode ausgebildeten Bodenstruktur herausgestochen

worden waren, erfolgte die Probenahme für vergleichende Tests nach der Bodenbearbeitung zur Saatbettbereitung. Wie in **Abb. 5.17** ersichtlich ist, wurden mehr als 30 % der anfangs applizierten Radioaktivität im Perkolat wiedergefunden, obgleich in diesen Bodenkernen aufgrund der Bodenbearbeitung schnell dränende Poren weitgehend zerstört waren und damit Matrixfluss die Transportprozesse bestimmen müßte. Auffällig war in diesen Tests die in den einzelnen Bodenschichten uneinheitliche Radioaktivitätsverteilung, die für die 4-6 cm-Schicht wieder einen Anstieg der Anteile auswies. Insgesamt deuteten vermehrt auftretende extrahierbare Rückstände und eine Mineralisation von < 10 % auch auf eine verminderte Mikroorganismenaktivität hin.

Im Gegensatz zu einer durch die K_d -Werte ausgewiesenen höheren Mobilität von ^{14}C -Ibuprofen im schluffigen Sand, ergaben sich bezüglich der Perkolat-Kontamination zwischen beiden Bodenarten keine wesentlichen Unterschiede. So belief sich diese im Test mit dem Sandboden auf 5 %, während mehr als 40 % der Rückstände in der 0-2 cm-Bodenschicht verblieben. Neben diesen Tests, in denen ^{14}C -Ibuprofen als Standardlösung auf die Bodenkerne appliziert wurde, wurde auch die Eintragssituation über kontaminierten Klärschlamm simuliert. Der eingesetzte Testklärschlamm beinhaltete ^{14}C -Ibuprofen-Rückstände, die in einer 7-tägigen Inkubation gealtert waren. Für beide untersuchten Bodenarten resultierte aus der Testklärschlamm-Applikation eine geringfügig verminderte Perkolat-Kontamination, wie es in **Abb. 5.18** für die Tests mit schluffigem Sand illustriert ist. Diese Tendenz konnte auch bereits aus den entsprechenden K_d -Werten abgelesen werden. Auffällig war ferner, dass unter dem Einfluss des Testklärschlammes geringere Mineralisationsraten festgestellt wurden.

Auf der Basis der K_d - bzw. K_{OC} -Werte wurde ^{14}C -Ketoprofen als die mobilste der untersuchten Substanzen ausgewiesen. Diese Tendenz spiegelte sich auch in den Kleinlysimetertests mit schluffigen Tonboden aus Adenstedt wider (**Abb. 5.19**). Danach wurden im vor der Bodenbearbeitung gestochenen Bodenkern 40 % der mit dem Radiotracer applizierten Radioaktivität im Perkolat wiedergefunden, während 38 % im Bodenkern verblieben und 10 % als ^{14}C -Kohlendioxid freigesetzt wurden. Ein verändertes Bild wurde für die Probenahme nach erfolgter Bodenbearbeitung aufgenommen. Hier wurde aufgrund der Zerstörung des über eine Vegetationsperiode ausgebildeten Porensystems der Austrag mit dem Perkolat auf 20 % der Ausgangsaktivität reduziert, während die Mineralisation auf 18 % anstieg. Die höchste Bodenkontamination konnte wiederum in der 0-2 cm-Bodenschicht festgestellt werden.

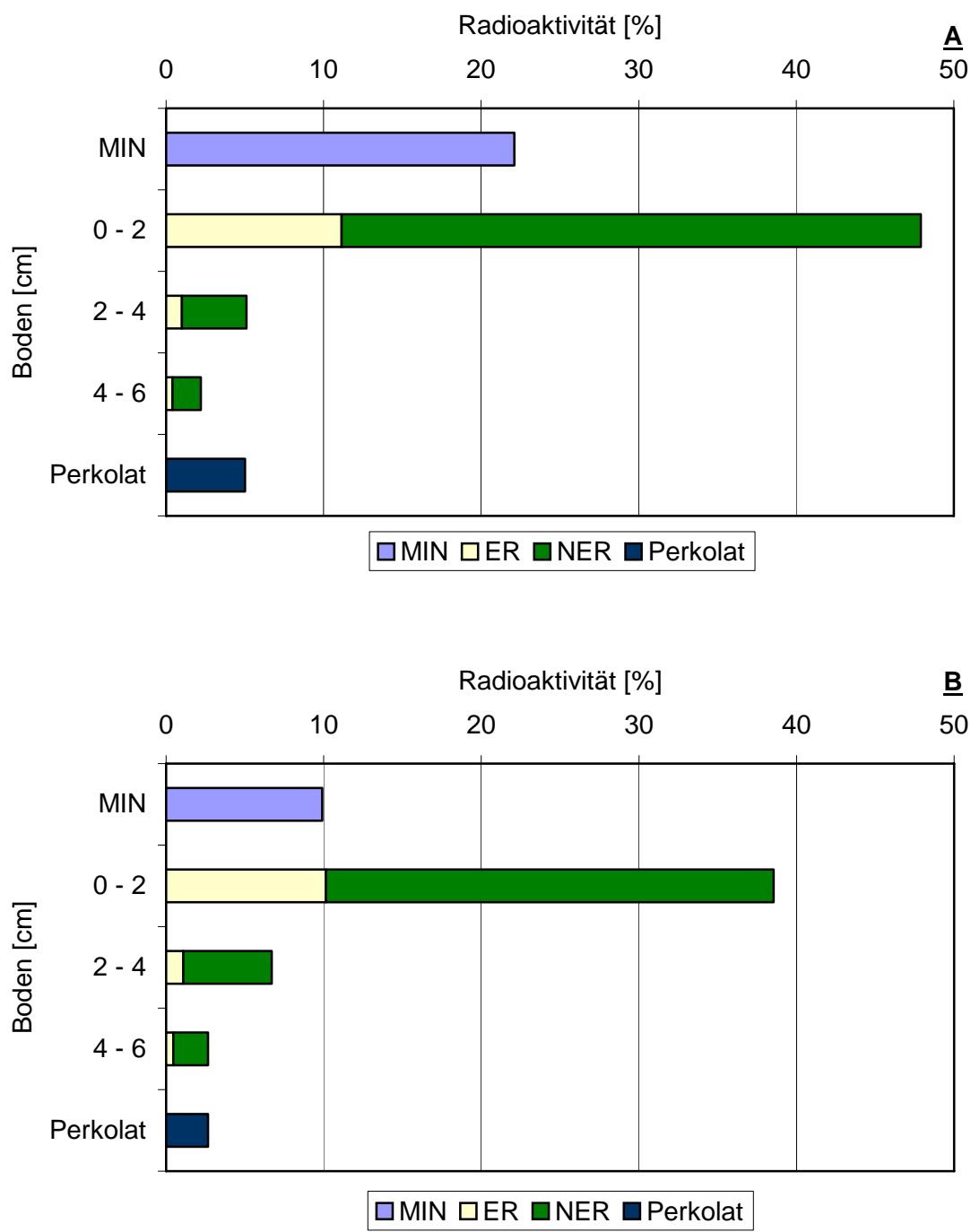


Abb. 5.18: Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Ibuprofen in Kleinlysimetertests mit schluffigem Sand nach A: Standard-Applikation und B: Testklär-schlamm-Applikation in 14 Tagen

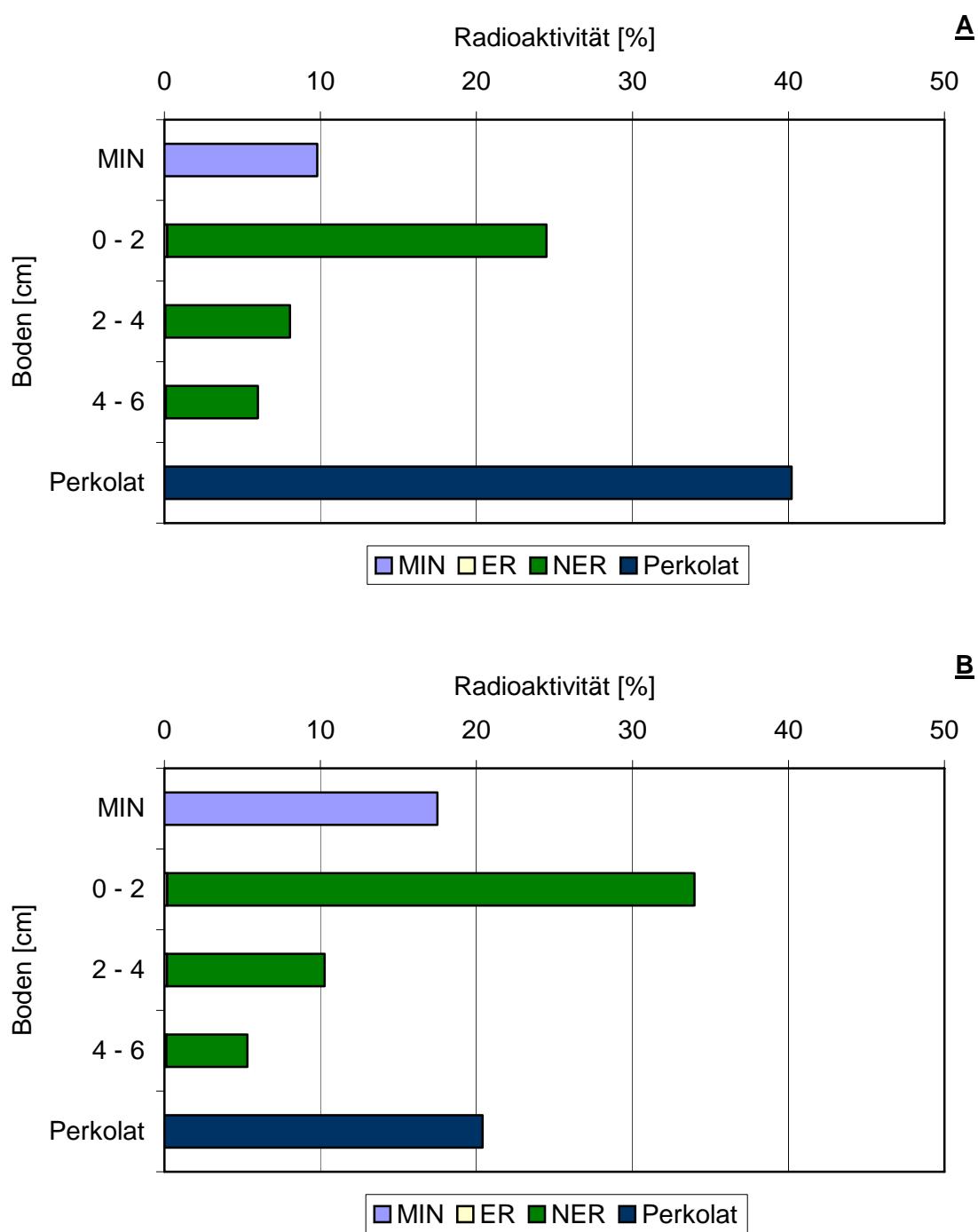


Abb. 5.19: Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Ketoprofen im Kleinlysimetertest mit schluffigen Ton (AD-A) in 14 Tagen nach Standard-Applikation; Entnahme der Bodenmonolithen A: vor und B: nach Bodenbearbeitung

Diese Ergebnisse vor und nach Bodenbearbeitung standen damit nicht mit den Verlagerungstendenzen von ^{14}C -Ibuprofen im Einklang. Zu berücksichtigen ist hier, dass die Entnahme der Bodenkerne an einem anderen Standort und zu einem anderem Zeitpunkt erfolgte. Somit könnte hier die Verlagerung durch Unterschiede in Bodentextur und -struktur beeinflusst worden sein. Für einen weiteren Einsatz der Kleinlysimeter-Tests wäre eine weitergehende Charakterisierung des Bodenzustandes zum Zeitpunkt der Probenahme unerlässlich.

Im Gegensatz zu ^{14}C -Ibuprofen wirkte sich in den Kleinlysimetertests die Testklärschlamm-Applikation für ^{14}C -Ketoprofen nur unwesentlich auf die Perkolat- und Bodenkontamination aus. Mit Radioaktivitätsanteilen von 33 % bzw. 42 % wurden hier annähernd die Werte wie nach Standard-Applikation ermittelt, während die Mineralisation auf 4 % abnahm (**Abb. 5.20**). Letztere Tendenz konnte auch für ^{14}C -Ibuprofen aufgezeigt werden.

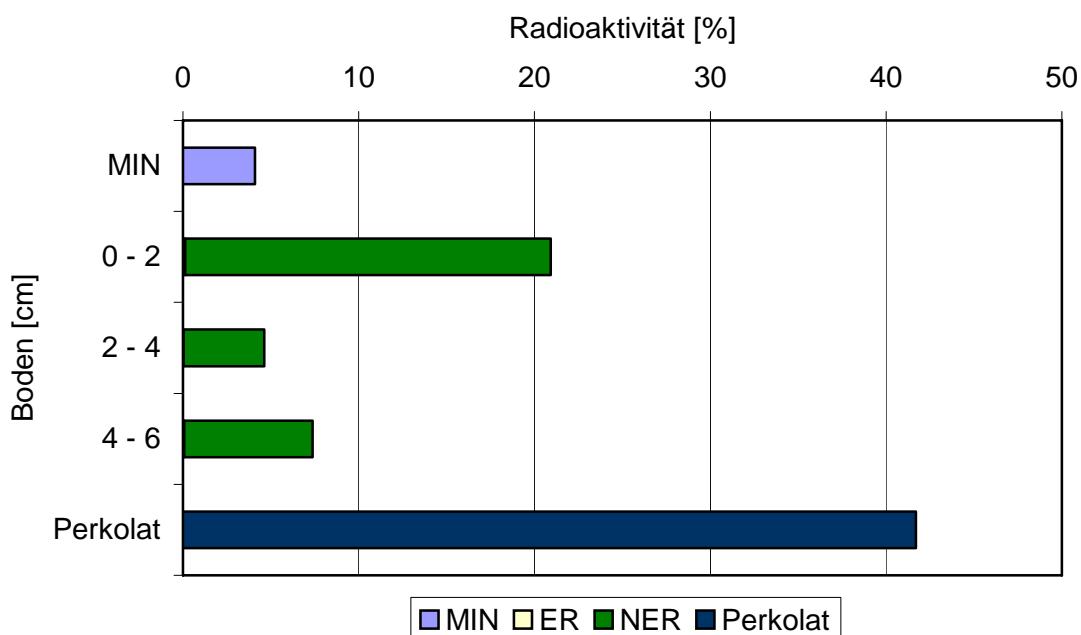


Abb. 5.20: Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Ketoprofen im Kleinlysimetertest mit schluffigen Ton (AD-A) vor Bodenbearbeitung und nach Testklärschlamm-Applikation in 14 Tagen

Neben den Kleinlysimetertests wurde abschließend auch ein Laborlysimeter mit einem

Bodenmonolithen mit 30 cm Höhe und 15 cm ID vom Standort Adenstedt (AD-A) eingesetzt, um die Fließstrecke eines 30 cm-mächtigen Ap-Horizontes berücksichtigen zu können. Aus **Abb. 5.21** geht hervor, dass hier ^{14}C -Ibuprofen-Rückstände nach Standard-Applikation eine deutlich geringere Verlagerungstendenz zeigten. Mehr als 60 % der mit dem Radiotracer applizierten Radioaktivität wurde in der 0-5 cm-Bodenschicht zurückgehalten, so dass die Kontamination der folgenden Schichten mit zunehmender Bodentiefe abnahm. Insgesamt wurde die Rückstandssituation durch nicht-extrahierbare Rückstände dominiert, so dass für ^{14}C -Ibuprofen-Rückstände nur ein Durchbruch von 3 % zu verzeichnen war. Hieraus kann in Analogie zu den ermittelten K_d -Werten abgeleitet werden, dass die für ^{14}C -Ibuprofen im Säulenexperiment mit tonigen Schluff ermittelte Verlagerungstendenz deutlich überschätzt wird.

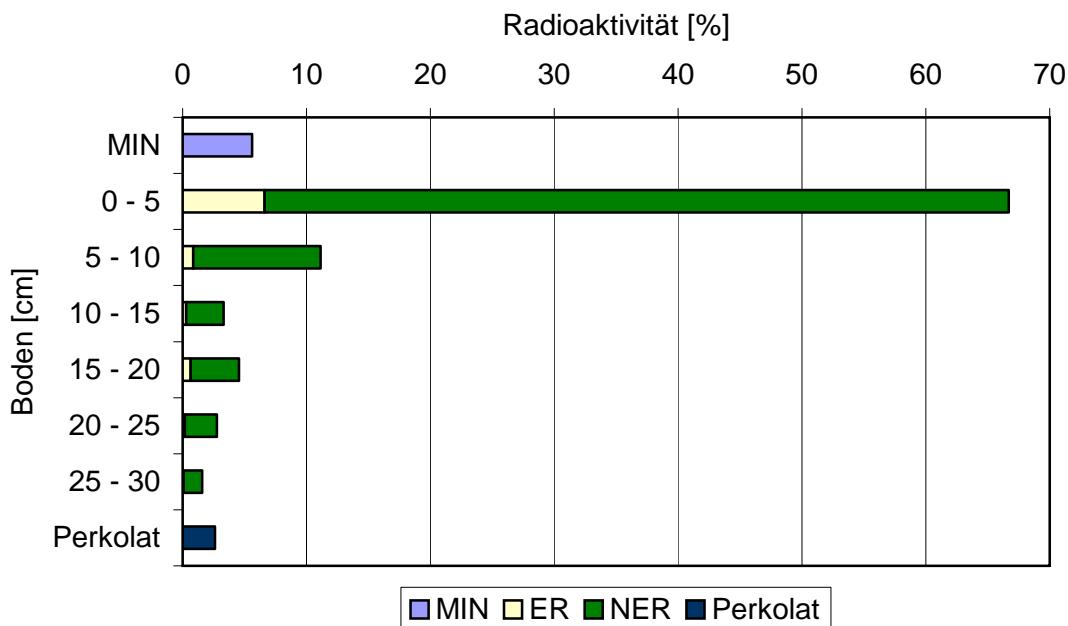


Abb. 5.21: Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Ibuprofen im Laborlysimeter mit schluffigen Ton (AD-A) nach Standard-Applikation in 28 Tagen

Die vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den Kleinlysimetertests und dem Laborlysimetertest verdeutlicht darüber hinaus, dass für eine Abschätzung der Grundwassergefährdung die Länge der Fließstrecke im Lysimetertestsystem von großer Bedeutung ist. Im Falle einer abzuschätzenden Grundwasserkontamination sind

Untersuchungen in Labortestsystemen schließlich in Freilandstudien zu validieren. Dass Laborlysimetertestsysteme, in denen Verlagerung und Abbau als gleichzeitig auftretende Prozesse erfasst werden, zuverlässige Ergebnisse erbringen können, belegen die Untersuchungen zu Sulfonamiden im "Runoff-Projekt" (Kreuzig und Höltge, 2005).

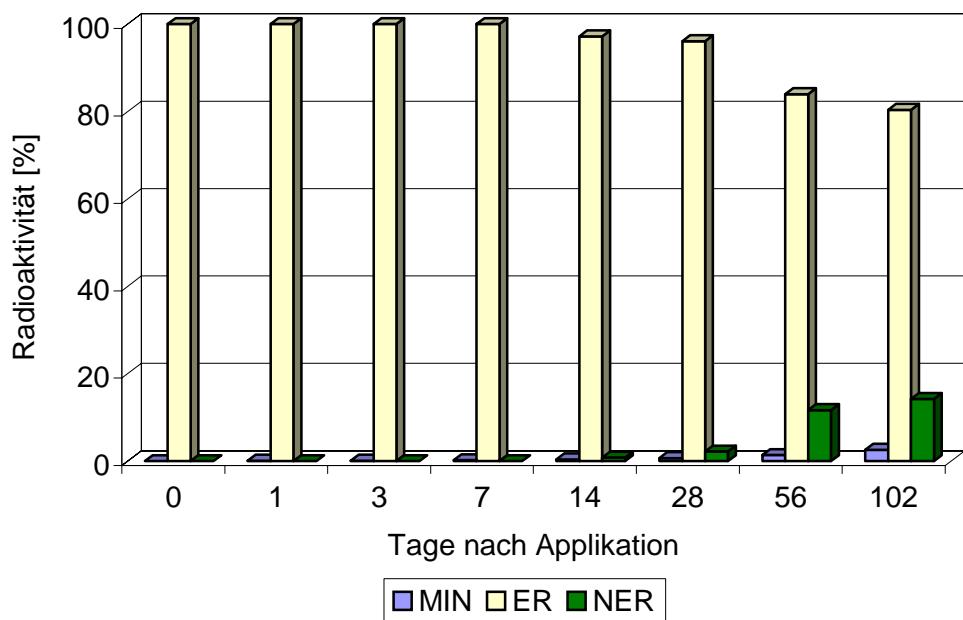
5.3.3 Diazepam

Mikrobieller Abbau nach Standard-Applikation

Das zur Gruppe der basischen 1,4-Benzodiazepine gehörende Diazepam unterliegt im menschlichen Metabolismus einer raschen Demethylierung und Hydroxylierung, aus der das ebenfalls als Psychopharmakon wirksame Oxazepam hervorgeht (Mutschler, 1991, Roth und Fenner, 1994). Aufgrund dieser pharmakokinetischen Kenntnisse und der Tatsache, dass die ^{14}C -Markierung in der Methylgruppe des Diazepin-Ringes vorliegt, an der die Demethylierung erfolgt, war auch mit einem weitgehenden Abbau und einer schnellen Freisetzung von ^{14}C -Kohlendioxid im Boden zu rechnen.

Die Langzeittests zur mikrobiellen Abbaubarkeit wiesen ^{14}C -Diazepam dagegen als eine persistente Umweltchemikalie in Böden aus. Die Rückstandssituation während der gesamten Inkubationsperiode wurde in beiden untersuchten Böden durch das Auftreten extrahierbarer Rückstände bestimmt (**Abb. 5.22**). Innerhalb von 102 Tagen nahm diese Fraktion in beiden Böden von 100 % auf annähernd 80 % ab. Die daraus nach Timme et al. (1986) berechneten DT_{50} -Werte beliefen sich auf deutlich > 100 Tage. Von der extrahierten Radioaktivität entfielen dabei durchschnittlich 96 % auf Diazepam als unveränderte Ausgangsverbindung. Die insgesamt nur geringfügige Abnahme der Extrahierbarkeit wurde erst nach 14-tägiger Inkubation von der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände begleitet, die sukzessive anstieg und zum Versuchsende höchste Werte von 14 % bzw. 19 % erreichte. Im gesamten Untersuchungszeitraum wurden nur sehr niedrige Mineralisationsraten ermittelt, die nach 102 Tagen 3 % im Schluff- und nur 1 % im Sandboden betrugen und damit auch die Persistenz dieser Substanz betonten. Im Gegensatz zum menschlichen Metabolismus scheinen die bodeninhärenten Mikroorganismen nicht ausreichend über Enzymsysteme zu verfügen, die Abbauprozesse von Diazepam schnell katalysieren können.

A



B

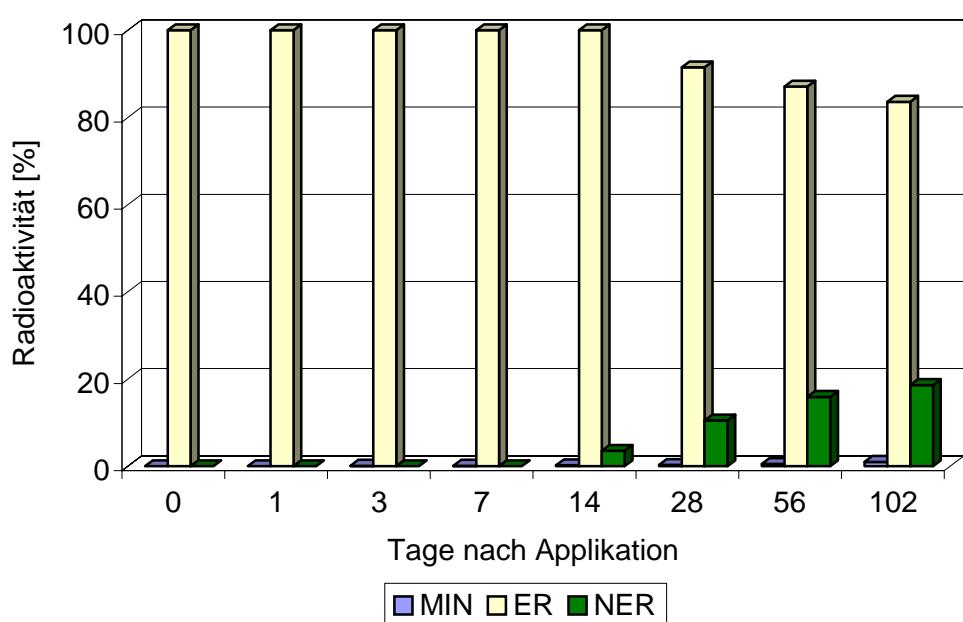
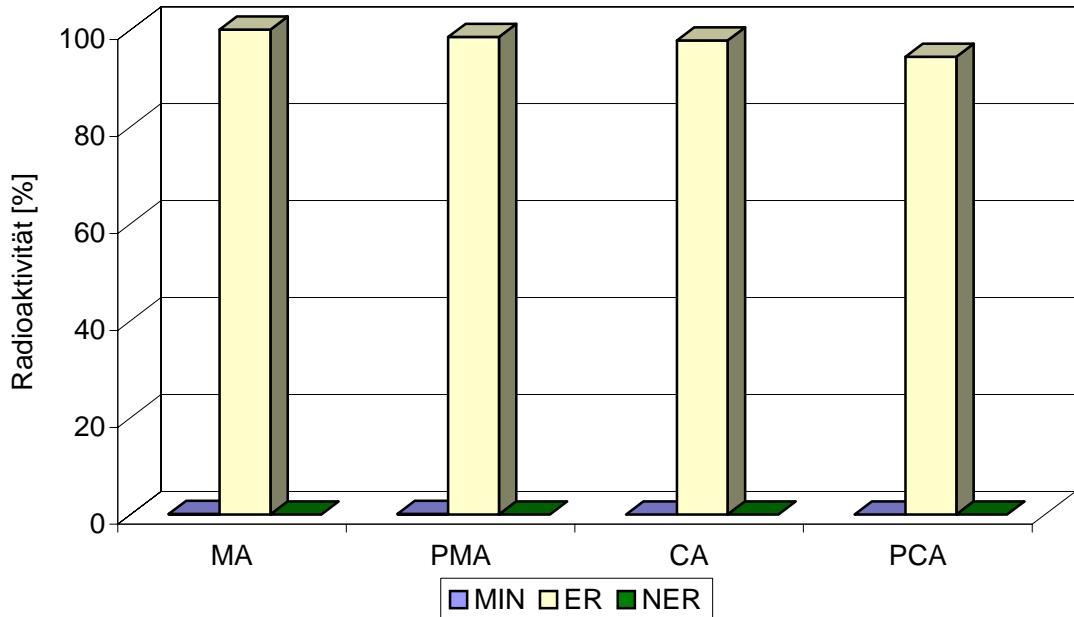


Abb. 5.22: Mikrobieller Abbau von ^{14}C -Diazepam in A: tonigem Schluff und B: schluffigem Sand nach Standard-Applikation

A



B

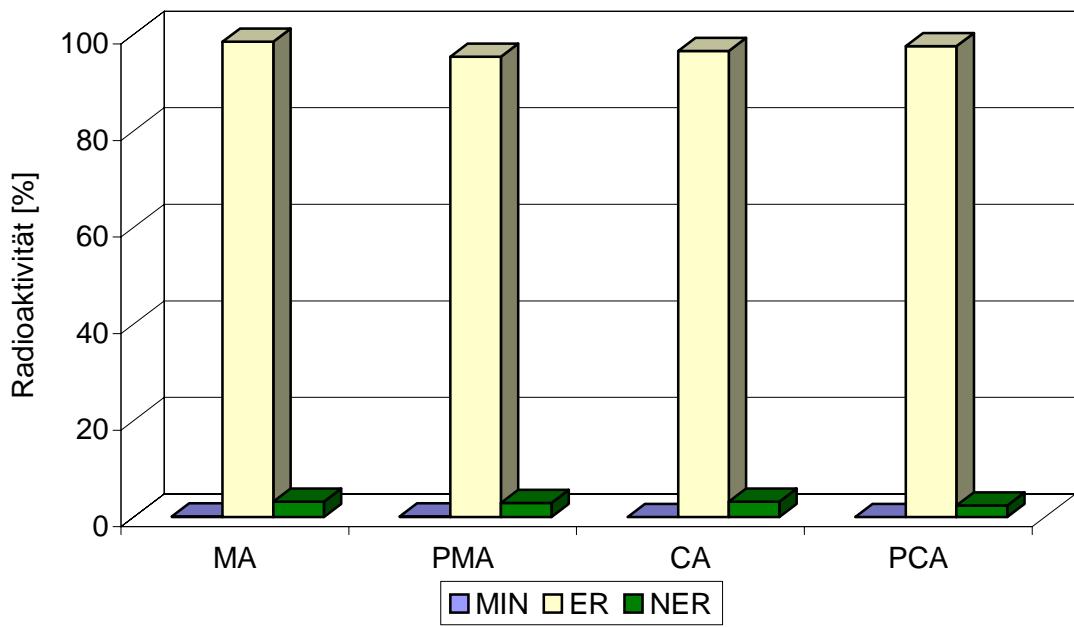


Abb. 5.23: Mikrobieller (MA), photoinduziert-mikrobieller (PMA), chemischer (CA) und photoinduziert-chemischer Abbau (PCA) von ^{14}C -Diazepam in **A: tonigem Schluff und **B:** schluffigem Sand nach Standard-Applikation**

Kurzzeittests zum mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbau

Die bereits in den Langzeittests konstatierte Persistenz von ^{14}C -Diazepam in Böden wurde auch in den Kurzzeittest dadurch widergespiegelt, dass die hier ermittelte Radioaktivitätsverteilung durch das Auftreten der applizierten Ausgangsverbindung in der extrahierbaren Fraktion dominiert wurde (**Abb. 5.23**). Insgesamt traten für das Rückstandsverhalten von ^{14}C -Diazepam in mikrobiell aktiven oder inkativen Bodenproben weder bei Inkubation im Dunkeln noch unter Bestrahlung relevante Unterschiede auf.

Kleinlysimetertests zur Verlagerung von ^{14}C -Diazepam

Die für ^{14}C -Diazepam nach Standard-Applikation im tonigen Schluff aus Neuenkirchen sowie im schluffigen Sand aus Nienwohlde ermittelten Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten wiesen zwar keine erhöhte Mobilität und damit keine kritisch zu bewertenden Verlagerungstendenzen aus. Doch waren sie zum einen dadurch auffällig, dass sie die höhere, ggf. pH-Wert bedingte, Sorption im Sandboden zeigten. Zum anderen ergaben sich nach Testklärschlamm-Applikation niedrigere K_d -Werte, die auf eine durch die Klärschlammatrix bedingte höhere Mobilität hindeuteten.

Zur Überprüfung dieser Mobilitätstendenzen wurden deshalb exemplarisch Kleinlysimetertests mit ungestörten Bodenkernen und ungesättigtem Wasserfluss durchgeführt. Da zum Zeitpunkt der Probenahme am Standort Neuenkirchen bereits die Bodenbearbeitung zur Saatbettbereitung erfolgt war, wurden die Bodenproben am Standort Adenstedt gestochen. Um die Ergebnisse aus diesen Kleinlysimetertests schließlich auf eine korrespondierende Datenbasis beziehen zu können, wurden parallel Batch-Equilibrium- und Abbaustests mit dem Adenstedter Boden (AD-A) vorangestellt.

Nach Standard-Applikation zeigte sich in diesem schluffigen Ton, dass 31 % der applizierten Radioaktivität im Perkolat vorlagen, obgleich der für diesen Boden ermittelte K_d -Wert von 24 L kg^{-1} auf keine höhere Mobilität hinwies. Ein Anteil von 35 % der applizierten Radioaktivität verblieb in der 0-2 cm-Bodenschicht überwiegend in Form nicht-extrahierbarer Rückstände (**Abb. 5.24**). In den tieferen Bodenschichten lag eine deutlich geringere Kontamination vor, doch überwog auch hier jeweils die nicht-extrahierbare Fraktion. In den parallel durchgeführten Abbauprozessen dagegen lagen die ^{14}C -Diazepam-Rückstände überwiegend in der extrahierbaren Fraktion vor, auf die nach 14 Tagen 88 % entfielen. Hieraus lässt sich deutlich ablesen, dass die Rückstandsdynamik von ^{14}C -Diazepam im schluffigen Ton auch unmittelbar vom Versuchsgesetz abhängig ist. Ferner wird hierdurch betont, dass Verlagerung und Abbau als

gleichzeitig ablaufende konzentrationsbestimmende Prozesse auch in Labortests unbedingt berücksichtigt werden müssen.

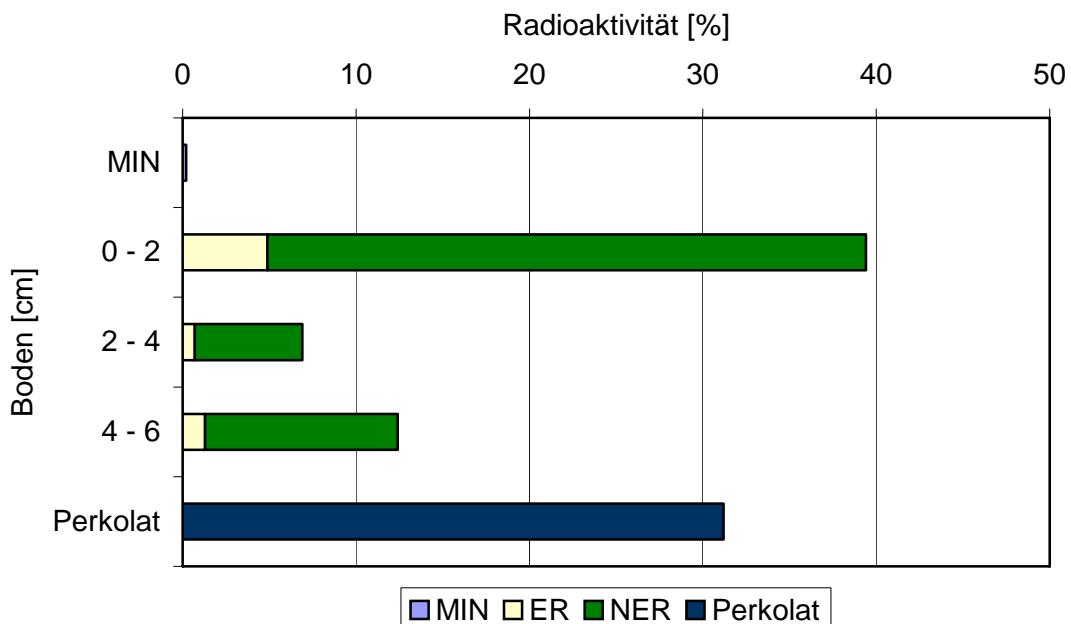


Abb. 5.24: Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Diazepam nach Standard-Applikation im Kleinlysimetertest mit schluffigem Ton (AD-A) in 14 Tagen

Nach Testklärschlamm-Applikation, mit der fast ausschließlich ^{14}C -Diazepam trotz 7-tägiger Alterung der Rückstände als unveränderte Ausgangsverbindung dotiert wurde, trugen die nicht-extrahierbaren Rückstände mit Anteilen von 24 % in den Abbau- und mit 50 % in der 0-2 cm-Schicht des Kleinlysimetertests vermehrt zu Bodenkontamination bei. Bei letzteren resultierte hieraus insgesamt eine verminderte Kontamination des Perkolates, in dem gegenüber dem Test nach Standard-Applikation nur noch 11 % der applizierten Radioaktivität nachgewiesen wurden (**Abb. 5.25**). Dabei indizierte der in den Batch-Equilibrium-Tests nach Testklärschlamm-Applikation auf 8 L kg^{-1} verringerte K_d -Wert eine höhere Mobilität von ^{14}C -Diazepam-Rückständen unter Einfluss der Klärschlammatrix. Aus dieser Gegenüberstellung lässt sich ableiten, dass die Ermittlung von Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten zwar Tendenzen über die Mobilität in Böden widerspiegelt, aus diesen aber nicht zwangsläufig Rückschlüsse auf die tatsächliche Verlagerung gezogen werden können.

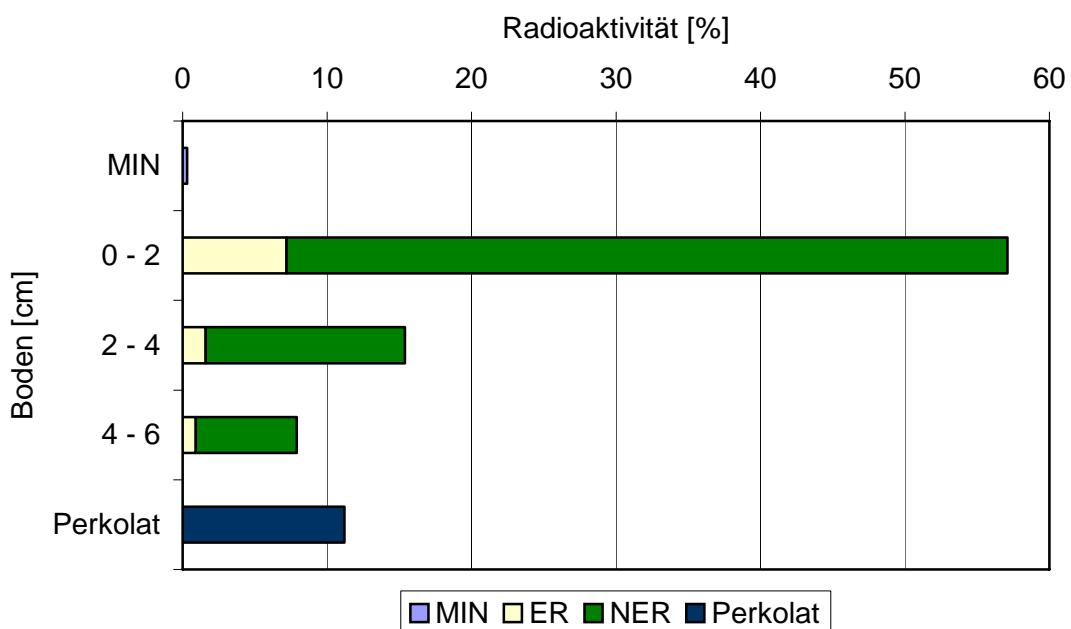


Abb. 5.25: Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Diazepam nach Testklärschlamm-Applikation im Kleinlysimetertest mit schluffigem Ton (AD-A) in 14 Tagen

5.3.4 Paracetamol und Strukturanaloga

Mikrobieller Abbau von ^{14}C -Paracetamol nach Standard-Applikation

Wie in den vorangestellten Tests zur Extraktionseffizienz verschiedener organischer Lösungsmittel zeigte sich für ^{14}C -Paracetamol auch in den Tests zum mikrobiellen Abbau eine hohe Affinität zur Bodenmatrix. So wurde die mit dem Radiotracer applizierte Radioaktivität bereits Stunden nach der Dotierung überwiegend in der nicht-extrahierbaren Fraktion wiedergefunden. Im tonigen Schluff stiegen die nicht-extrahierbaren Anteile innerhalb eines Tages auf den höchsten Wert von 96 % an, um dann sukzessive auf einen Anteil von 90 % nach 102 Tagen abzufallen (**Abb. 5.26**). Gleichzeitig ging damit eine Abnahme der mit Ethylacetat extrahierbaren Anteile von 9 % nach der Dotierung auf einen Endwert von 0.4 % sowie ein Anstieg der Mineralisation von 2 % auf 12 % einher. Damit liegt der Schluss nahe, dass ^{14}C -Kohlendioxid mit zunehmender Inkubationszeit aus der nicht-extrahierbaren Fraktion freigesetzt wurde.

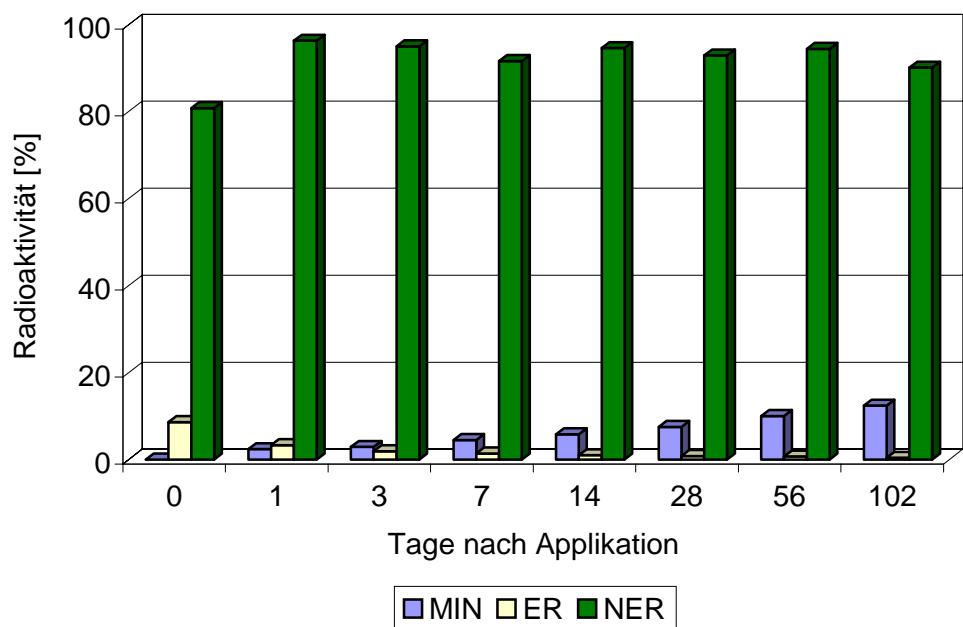
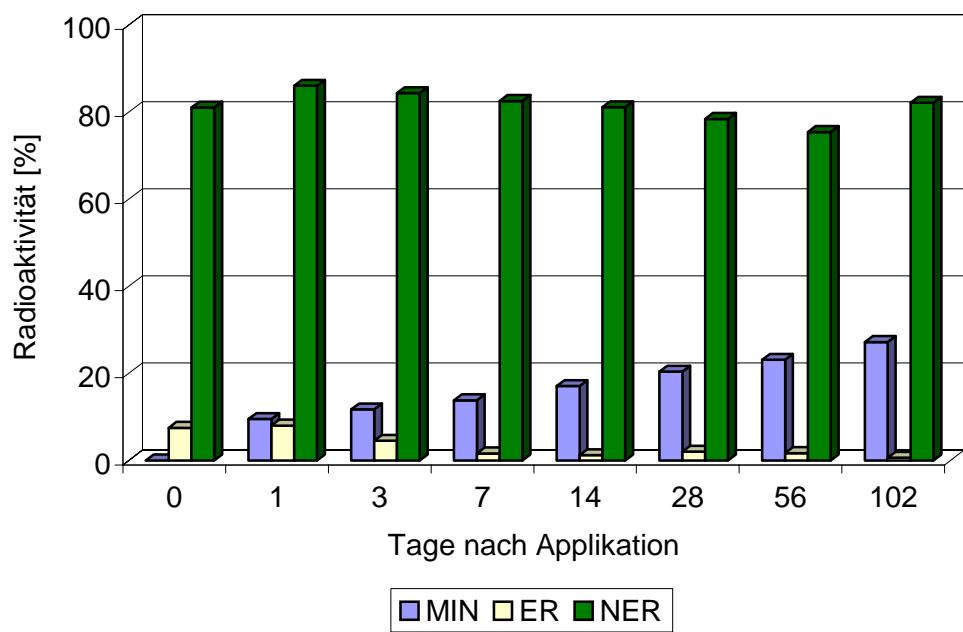
A**B**

Abb. 5.26: Mikrobieller Abbau von ^{14}C -Paracetamol in **A: tonigem Schluff und **B:** schluffigem Sand nach Standard-Applikation**

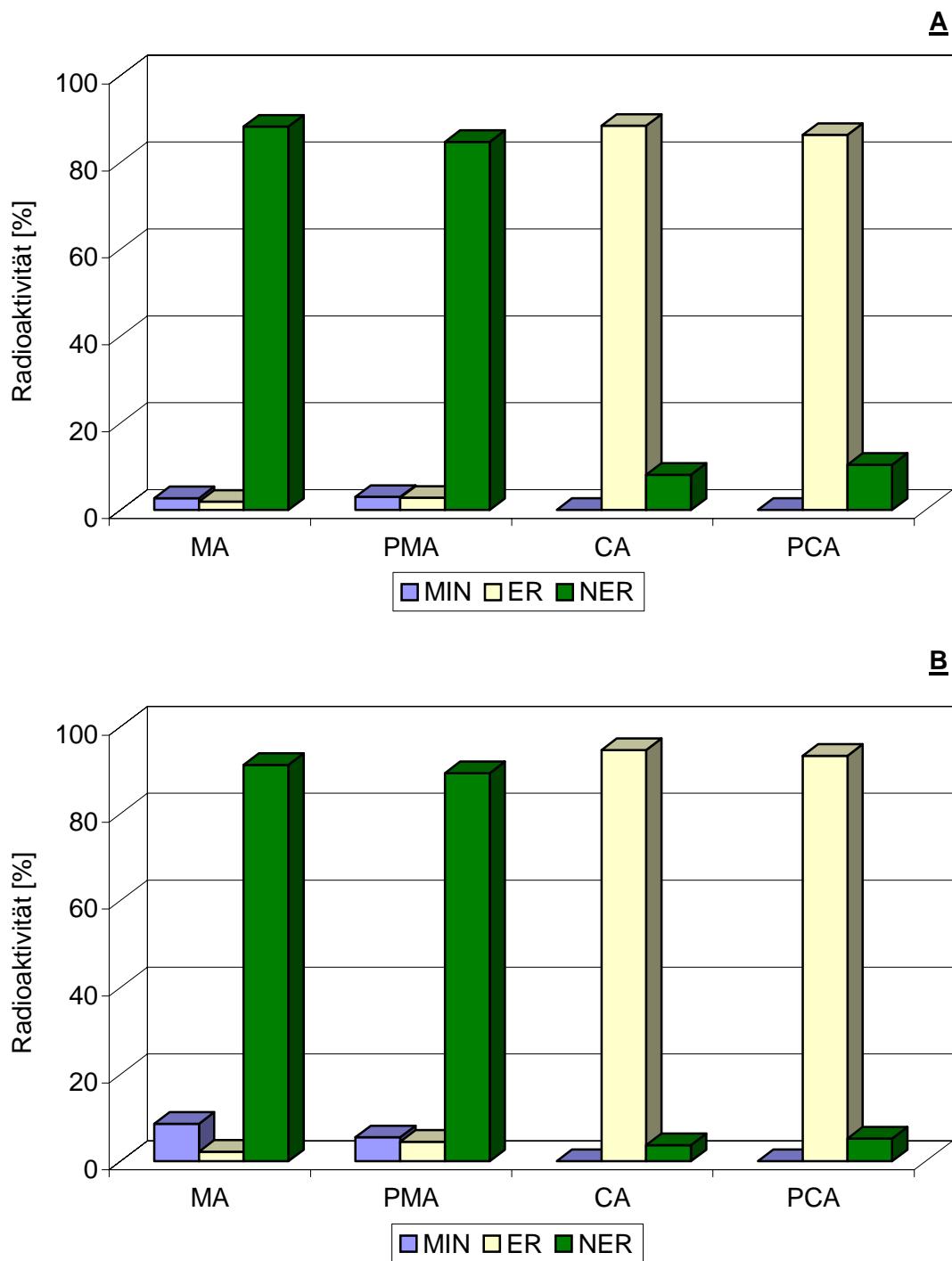


Abb. 5.27: Mikrobieller (MA), photoinduziert-mikrobieller (PMA), chemischer (CA) und photoinduziert-chemischer Abbau (PCA) von ^{14}C -Paracetamol in **A: tonigem Schluff und **B:** schluffigem Sand nach Standard-Applikation**

Im schluffigen Sand zeigte sich eine ähnliche Rückstandssituation, bei der der Höchstwert nicht-extrahierbarer Anteile nach 1-tägiger Inkubation von 86 % auf 81 % in 102 Tagen abnahm. Hier wurde eine insgesamt deutlich höhere Mineralisation ermittelt, deren Rate zum Versuchsende 28 % betrug. Die extrahierbaren Anteile waren wiederum von untergeordneter Bedeutung.

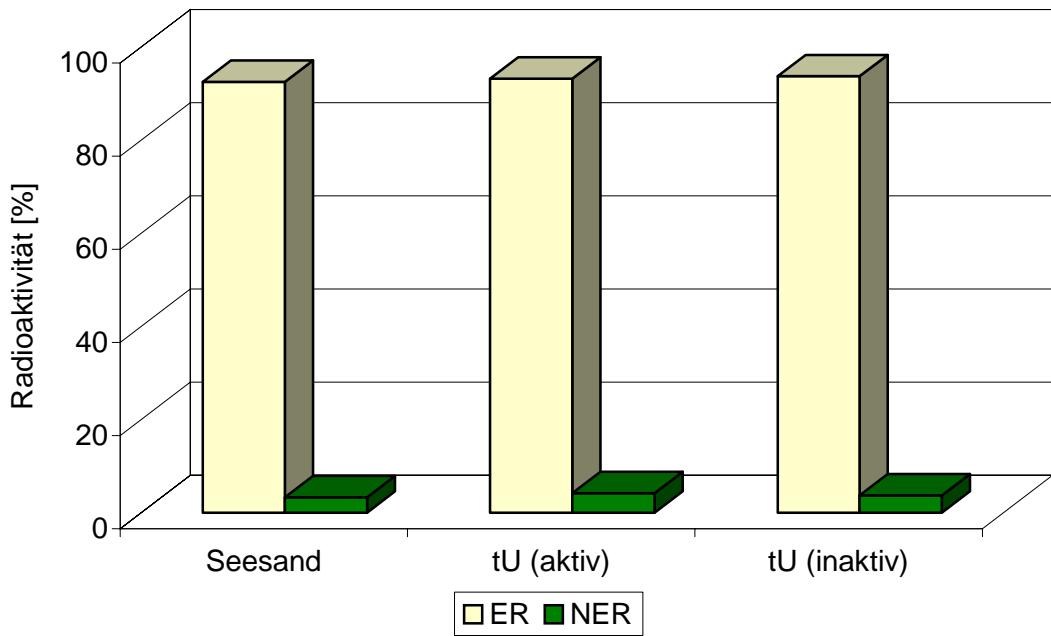
Kurzzeittests zum mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbau

Der Einsatz mikrobiell aktiver und inaktiver Bodenproben verdeutlichte in den Kurzzeittests, dass die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände als eine Funktion des mikrobiellen Abbaus anzusehen ist und nicht ausschließlich auf die Sorption an die Bodenmatrix verstanden werden kann (**Abb. 5.27**). So beliefen sich die nicht-extrahierbaren Anteile im mikrobiell aktiven tonigen Schluff und schluffigen Sand auf über 80 %, wobei die Inkubation im Dunkeln bzw. unter Bestrahlung keinen entscheidenden Unterschied erbrachte. Im Gegensatz hierzu wurden nach Inaktivierung der Bodenproben im Autoklaven nur durchschnittlich 7 % der Rückstände in der Matrix festgelegt, so dass über 90 % der Radioaktivität mit Ethylacetat extrahiert werden konnten. Im anschließenden Metaboliten-Screening wurde in den Extrakten ausschließlich ¹⁴C-Paracetamol als unveränderte Ausgangsverbindung gefunden, woraus sich ableiten lässt, dass die Sorption für die Festlegung von ¹⁴C-Paracetamol-Rückständen in der Bodenmatrix von geringerer Bedeutung ist.

Mikrobieller Abbau der strukturanalogen Verbindungen ¹⁴C-Phenacetin und ¹⁴C-p-Kresol

Zur weitergehenden Charakterisierung der auffälligen Rückstandsdynamik von ¹⁴C-Paracetamol in Böden wurden die strukturanalogen Verbindungen ¹⁴C-Phenacetin und ¹⁴C-p-Kresol in die Tests zur Extraktionseffizienz und mikrobiellen Abbaubarkeit einbezogen. Hier galt es, anhand der strukturspezifischen Unterschiede zu untersuchen, inwieweit Acetamido- oder Hydroxy-Substituent für die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände ursächlich waren.

A



B

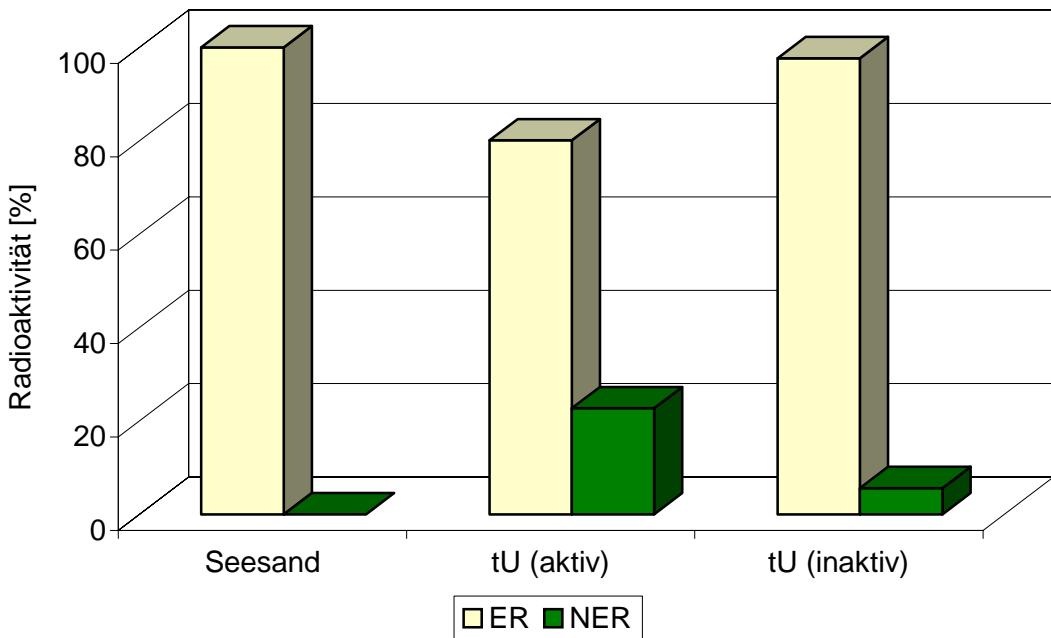


Abb. 5.28: Tests zur Extraktionseffizienz von Ethylacetat für A: ^{14}C -Phenacetin und B: ^{14}C -p-Kresol aus Seesand und mikrobiell aktivem bzw. inaktivem tonigen Schluff (tU)

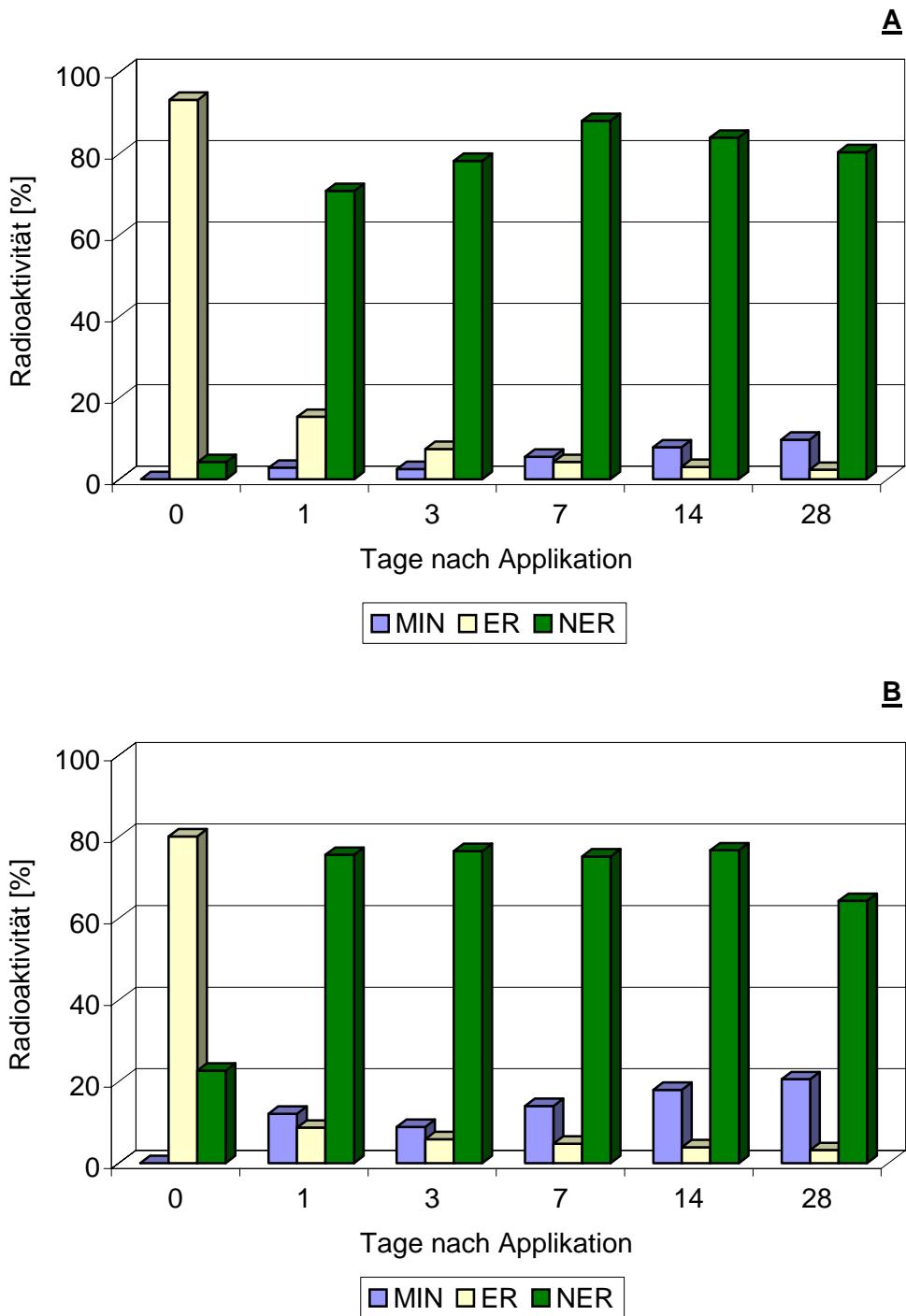


Abb. 5.29: Mikrobieller Abbau von A: ^{14}C -Phenacetin und B: ^{14}C -p-Kresol in tonigem Schluff nach Standard-Applikation

In ersten Extraktionstests wurden diese Strukturanaloga zu Seesand sowie mikrobiell

aktivem und inaktivem tonigen Schluff dotiert und mittels Ethylacetat extrahiert. Im Seesand und mikrobiell inaktivem Schluffboden wurden erwartungsgemäß mehr als 90 % der Rückstände freigesetzt (**Abb. 5.28**). Im Vergleich hierzu wurde in den Ansätzen mit den mikrobiell aktiven Bodenproben die Extrahierbarkeit von ¹⁴C-p-Kresol durch die Affinität zur Bodenmatrix um 22 % vermindert, während für ¹⁴C-Phenacetin keine stärkere Festlegung in der Bodenmatrix konstatiert werden konnte.

In den Tag 0-Proben der Tests zur mikrobiellen Abbaubarkeit wurden zwar erwartungsgemäß die Ergebnisse der vorangestellten Extraktionstests bestätigt. Doch bereits nach 1-tägiger Inkubation wurde die Rückstandsdynamik beider Substanzen durch die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände dominiert. Unterschiede zeichneten sich nur in den jeweiligen Intensitätsverteilungen ab.

Aus **Abb. 5.29** ergibt sich danach, dass ¹⁴C-p-Kresol schneller, aber insgesamt weniger stark der Festlegung unterlag. Im Untersuchungszeitraum von 28 Tagen wurde ferner mit 21 % die höchste Mineralisationsrate dieser Testserie ermittelt. ¹⁴C-Phenacetin nahm unter den 3 untersuchten Strukturanaloga eine Mittelstellung ein.

Aus diesen zusätzlichen Tests mit den Strukturanaloga lässt sich ableiten, dass ¹⁴C-Paracetamol sowohl über den Acetamido- wie auch über den Hydroxy-Substituenten mit der Bodenmatrix in Wechselwirkung treten kann, um in Abhängigkeit von der bodeninhärenten mikrobiellen Aktivität im Extraktionstest und im Batchexperiment sehr schnell in die nicht-extrahierbare Fraktion überführt zu werden. Da diese unerwartet hohe Affinität zur Bodenmatrix bereits unmittelbar nach der Dotierung des Radiotracers erfolgte, schien Paracetamol selbst als die applizierte Ausgangsverbindung und nicht als ein Umwandlungsprodukt der Festlegung in der Bodenmatrix zu unterliegen.

Tests zur Remobilisierung nicht-extrahierbarer ¹⁴C-Paracetamol-Rückstände

Aus dieser Annahme heraus stellt sich die Frage, wie stark diese Festlegung ist und ob unter einer Milieuänderung mit einer Remobilisierung zu rechnen ist. Die Tests zur Extraktionskraft verschiedener organischer Lösungsmittel deuteten daraufhin, dass zwar unmittelbar nach der Dotierung mit Ethanol die höchste Effizienz erzielt, mit zunehmender Alterung der Rückstände in den Abbaustests dieser Vorteil gegenüber Ethylacetat allerdings kompensiert wurde (s. Kapitel 5.2). Selbst die Nachextraktion der zuvor mit Ethylacetat behandelten Tag 102-Bodenproben mit salzaurem Methanol setzte nur weitere 9 % der Radioaktivität frei, so dass im tonigen Schluff 80 % und im schluffigen Sand 63 % als nicht-extrahierbare Rückstände verblieben.

In ersten Tests zur Remobilisierung wurden Aliquote der getrockneten Extraktionsrückstände aus den Tag 102-Proben mit Belebtschlamm bzw. mit demineralisiertem Wasser versetzt und im Dunkeln bei 20 ± 1 °C für weitere 28 Tage inkubiert. In dieser Zeit wurden 3 % der noch in den Bodenproben vorliegenden Radioaktivität als ^{14}C -Kohlenstoffdioxid freigesetzt; SIR-Messungen zeigten auch in den Ansätzen mit demineralisiertem Wasser eine für diese Umsetzungen ausreichende mikrobielle Aktivität an. Da nur 0.4 % der Rückstände einer Extraktion zugänglich wurden, schien mit der Bildung nicht-extrahierbarer ^{14}C -Paracetamol-Rückstände eine starke, weitgehend irreversible Fixierung an die Bodenmatrix zu erfolgen.

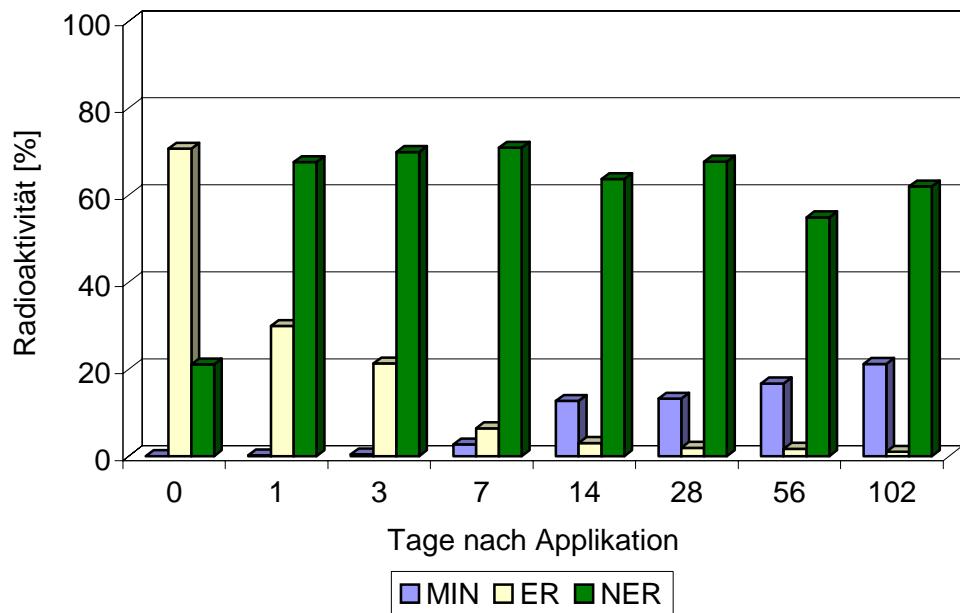


Abb. 5.30: Stabilitätstest von ^{14}C -Paracetamol in Klärschlamm

Tests zur Stabilität in Klärschlamm

Im Gegensatz zum mikrobiellen Abbau von ^{14}C -Paracetamol in tonigem Schluff ergeben die Stabilitätstests in Klärschlamm Veränderungen in der Rückstandsdynamik. So betrug unmittelbar nach der Dotierung des Radiotracers die Extraktionseffizienz noch 71 %, die innerhalb der nächsten beiden Tage auf 21 % abfiel. Nach 102 Tagen wurden nur noch 1 % der anfangs dotierten Radioaktivität extrahiert (**Abb. 5.30**). Für die Extrakte der ersten 7 Tage konnte aufgrund der erhöhten Radioaktivitätskonzentration

das Metaboliten-Screening durchgeführt werden.

In **Abb. 5.31** ist ersichtlich, dass ^{14}C -Paracetamol als unveränderte Ausgangsverbindung noch nach 1 Tag die Hauptkomponente mit einem relativen Anteil von 94 % darstellt, aber hier bereits von 3 Abbauprodukten begleitet wurde. Nach 7 Tagen betrug der relative ^{14}C -Paracetamol-Anteil in den RTLC-Chromatogrammen nur noch 30 %, womit der Anteil der applizierten Ausgangsverbindung in der extrahierbaren Fraktion auf 2 % der anfangs dotierten Paracetamol-Konzentration abnahm.

Mit der Abnahme der Extrahierbarkeit ging zwangsläufig die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände einher. Im Gegensatz zu den Abautests im Boden erfolgte diese allerdings nicht sofort nach der Dotierung. So war ein Anstieg von 21 % auf 68 % nach 1 Tag zu verzeichnen, der sich noch sukzessive bis zur Tag 7-Probe fortsetzte. Dieser Höchstwert von 71 % fiel dann bis zum Abschluss der Inkubation auf 62 % ab. Bei gleichzeitig kontinuierlich ansteigender Mineralisation auf insgesamt 21 % nach 102 Tagen zeichnete sich hier wiederum eine ^{14}C -Kohlendioxid-Freisetzung aus der nicht-extrahierbaren Fraktion ab.

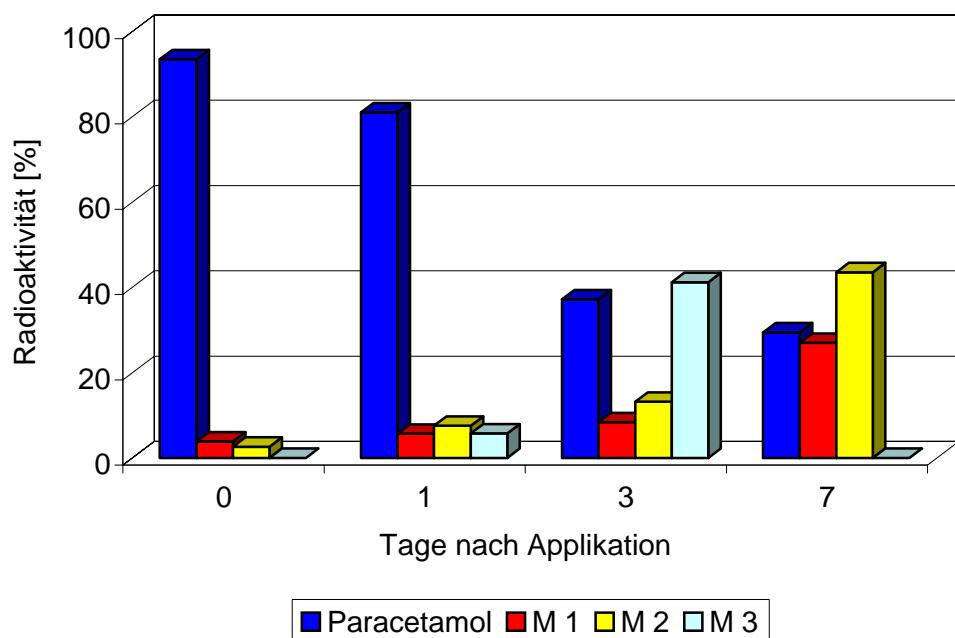


Abb. 5.31: Relative Radioaktivitätsverteilung in den RTLC-Chromatogrammen für ^{14}C -Paracetamol und korrespondierende Metaboliten in Klärschlamm

Mikrobieller Abbau nach Testklärschlamm-Applikation

Zur Simulation des Paracetamol-Eintrages in Böden durch kontaminierten Klärschlamm wurden auch Abbaustests nach Testklärschlamm-Applikation durchgeführt, mit dem über 7 Tage gealterte ^{14}C -Paracetamol-Rückstände in die Bodenproben eingebracht wurden. Im tonigen Schluff erfolgte erneut eine spontane Festlegung der Rückstände in der Bodenmatrix. Da die Bildung dieser nicht-extrahierbaren ^{14}C -Paracetamol-Rückstände nachweislich auf die bodeninhärente mikrobielle Aktivität zurückzuführen war und mit der Testklärschlamm-Applikation leicht abbaubare organische Substanz in die Bodenprobe eingebracht wurde, war mit einer Intensivierung der Mikroorganismenaktivität zu rechnen, aus der diese weitergehende Festlegung der Rückstände resultierte. Es blieb allerdings auch zu berücksichtigen, dass mit den in 7 Tagen gealterten Rückständen im Testklärschlamm nur 6 % extrahierbare und bereits über 70 % an die Klärschlammatrix fixierte Rückstände in das Labortestsystem eingebracht wurden.

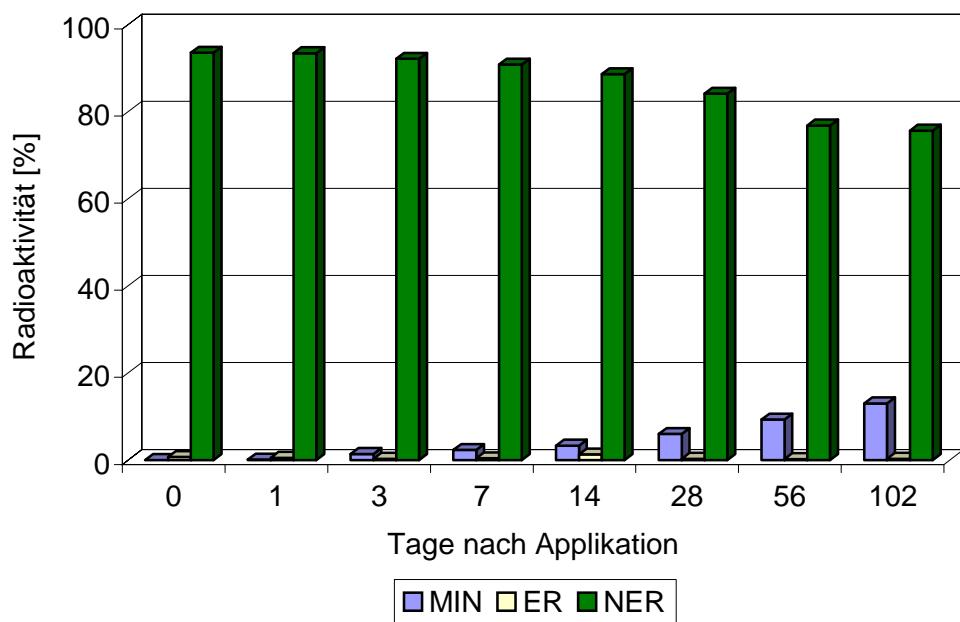


Abb. 5.32: Mikrobieller Abbau von ^{14}C -Paracetamol in tonigem Schluff nach Testklärschlamm-Applikation

Auffällig war die aus **Abb. 5.32** ersichtliche kontinuierliche Abnahme der nicht-extra-

hierbaren Rückstände von anfangs 94 % auf 76 % nach 102 Tagen, mit der ein kontinuierlicher Anstieg der Mineralisation auf schließlich 13 % verbunden war. Deutlich wurde in diesen Untersuchungen damit auch, dass die Rückstandsdynamik von ¹⁴C-Paracetamol von Standard- und Testklärschlamm-Applikation und damit vom Eintragspfad beeinflusst wurde.

5.3.5 Sulfamethoxazol und Acetyl-Sulfamethoxazol

In diese Untersuchungen zum Rückstandsverhalten von Humanpharmaka in Böden wurde auch das Sulfonamid Sulfamethoxazol zusammen mit dem korrespondierenden Metaboliten Acetyl-Sulfamethoxazol einbezogen. Von besonderem Interesse waren hier die Fragen nach der hydrolytisch bedingten Rückbildung von Sulfamethoxazol aus dem Metaboliten in Boden und Klärschlamm sowie nach den strukturspezifischen Einflüssen beider Substanzen auf deren Rückstandsdynamik. Da diese experimentellen Ansätze die direkte Schnittstelle zum "Runoff-Projekt" darstellen, erfolgten die Abbau- und Verlagerungstests mit dem schluffigen Tonboden aus Adenstedt (AD-A, siehe Kapitel 3).

Mikrobieller Abbau nach Standard-Applikation

In den Tests zum mikrobiellen Abbau in schluffigem Ton zeigte sich, dass die Rückstandsdynamik von ¹⁴C-Sulfamethoxazol und ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol durch eine kontinuierliche Abnahme der Extrahierbarkeit und damit mit einer Festlegung in der Bodenmatrix als nicht-extrahierbare Rückstände gekennzeichnet wurde (**Abb. 5.33**).

In 28 Tagen nach Dotierung der Standardlösungen nahmen so die extrahierbaren Fraktionen auf 18 % bzw. 16 % ab, während die nicht-extrahierbaren Anteile einen Wert von 70 % überschritten, der in der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln ein Ausschlusskriterium für deren Zulassung darstellen kann (BBA, 1992). Die in diesem Zulassungsverfahren angewendeten Persistenzkriterien beziehen ferner eine Mineralisation von < 5 % in 100 Tagen ein (BBA, 1998), so dass diesbezüglich beide Sulfonamid-Derivate mit Mineralisationsraten von 2 % bzw. 3 % als persistent einzustufen sind.

Neben der Betrachtung der Radioaktivitätsverteilungen war das Metaboliten-Screening für eine detailliertere Charakterisierung des Rückstandsverhaltens dieser beiden Substanzen von entscheidender Bedeutung (**Abb. 5.34**).

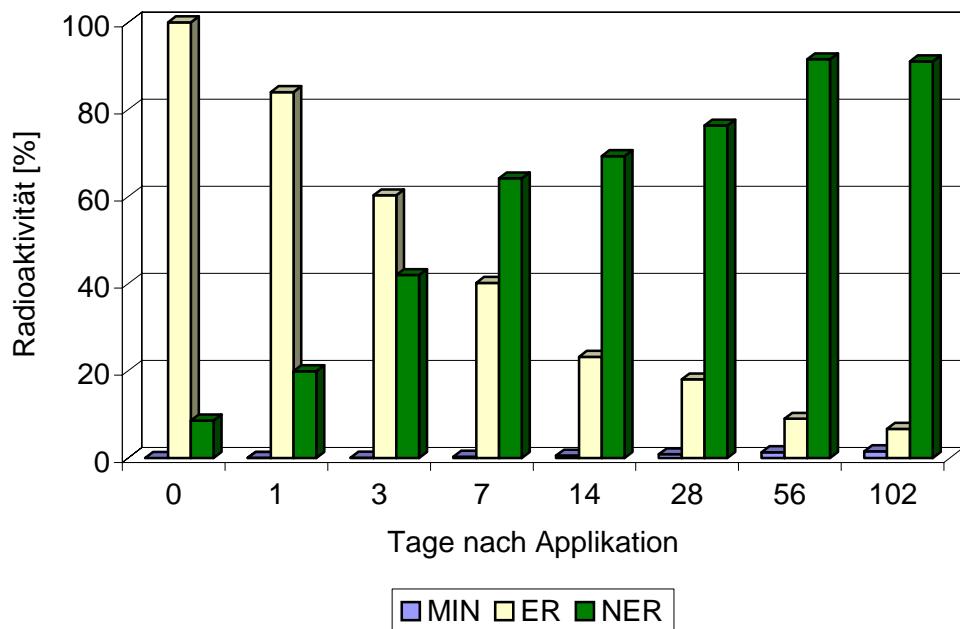
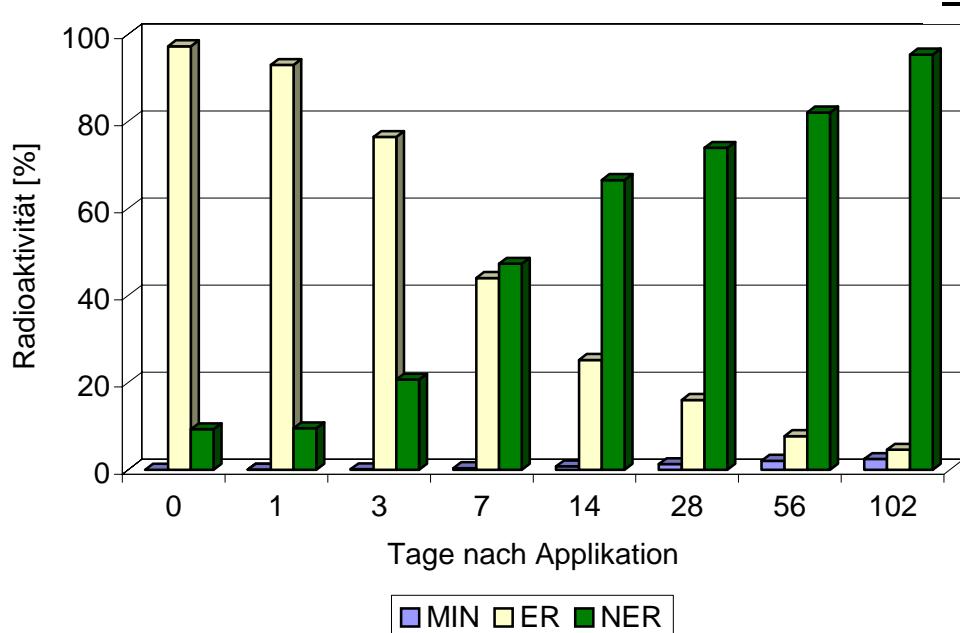
A**B**

Abb. 5.33: Mikrobieller Abbau von A: ^{14}C -Sulfamethoxazol und B: Acetyl-Sulfamethoxazol (B) in schluffigem Ton (AD-A) nach Standard-Applikation

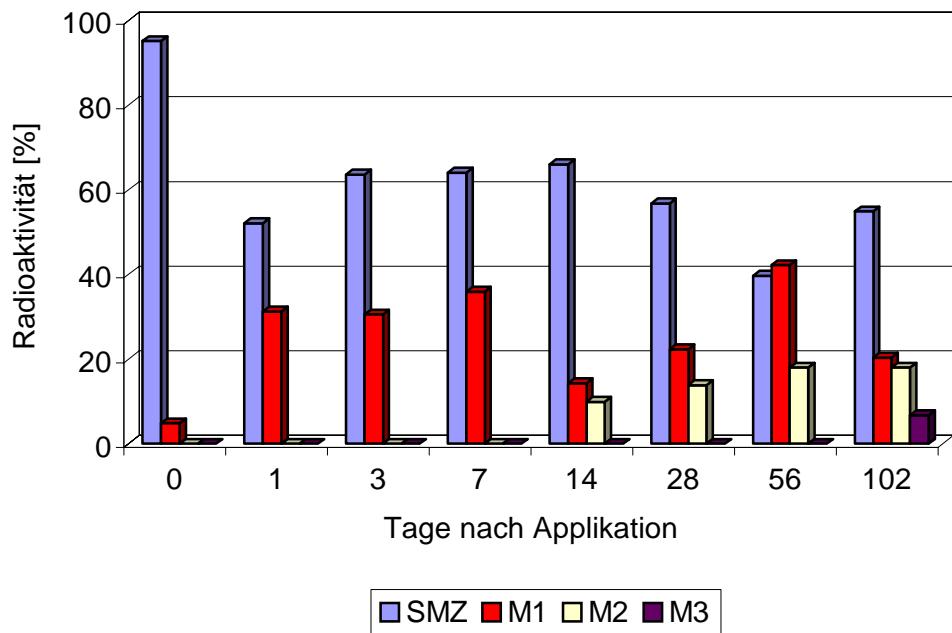
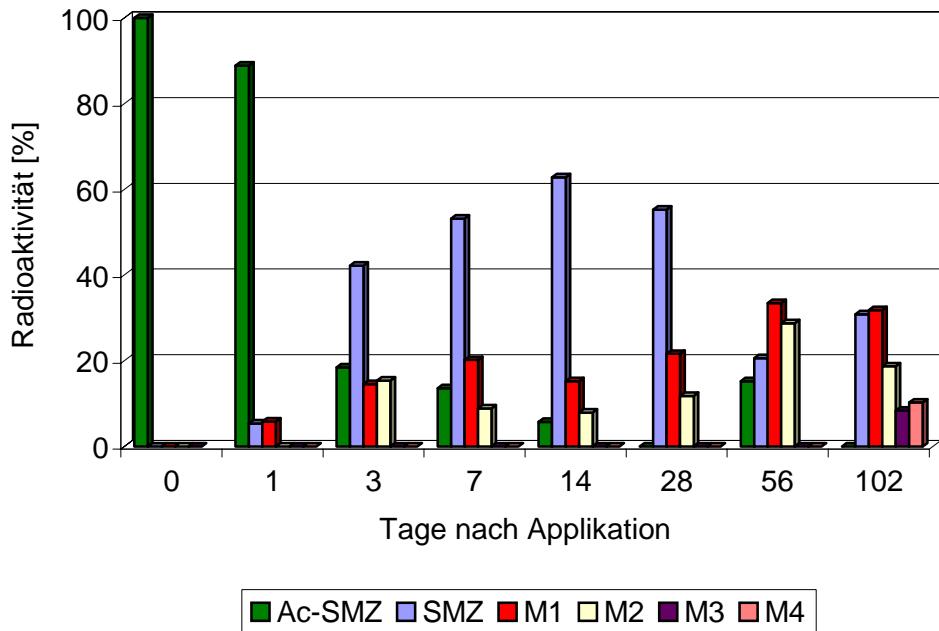
A**B**

Abb. 5.34: Metaboliten-Screening der Ethylacetat-Extrakte aus den Tests zum mikrobiellen Abbau von A: ^{14}C -Sulfamethoxazol und B: ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol in schluffigem Ton (AD-A)

Im 102-tägigen Untersuchungszeitraum der Batchexperimente mit ^{14}C -Sulfamethoxazol war die applizierte Ausgangsverbindung die dominierende Komponente in den Extrakt-

ten. Bereits in den ersten Tagen wurde für die Ausgangsverbindung eine deutliche Abnahme der Radioaktivitätskonzentration konstatiert, mit der die Bildung von 3 nicht identifizierten Metaboliten einherging, so dass zum Versuchsende noch über 50 % der in den Extrakten gemessenen Radioaktivität auf Sulfamethoxazol entfielen.

In den Batchexperimenten mit ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol konnte die hydrolytische Umwandlung in ¹⁴C-Sulfamethoxazol eindeutig belegt werden. So wurde für das applizierten ¹⁴C-Acetyl-Sulfonamidderivat eine rasche Konzentrationsabnahme gefunden, mit der eine kontinuierliche Zunahme an ¹⁴C-Sulfamethoxazol bis über 50 % der extrahierten Radioaktivität innerhalb der ersten 14 Tage einherging. Danach traten Abbauprozesse von ¹⁴C-Sulfamethoxazol in den Vordergrund, so dass zum Versuchsende in den Extrakten nur noch 31 % auf diese Substanz zurückzuführen waren. Im Metaboliten-Screening wurden darüber hinaus insgesamt 4 nicht identifizierte Umwandlungsprodukte detektiert, von denen 3 Produkte gemäß R_F-Werte-Vergleich in beiden Batchexperimentsequenzen auftraten.

Stabilitätstests in Klärschlamm

Die Stabilitätstests von ¹⁴C-Sulfamethoxazol und ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol in Klärschlamm spiegelten wiederum eine hohe Affinität dieser Substanzen zur Probenmatrix wider. Insbesondere für ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol erfolgte eine rasche Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände. Bereits unmittelbar nach der Dotierung betrug dieser Anteil 18 % und nach 7 Tagen bereits 40 % (**Abb. 5.35**). Zum Versuchsende nach 72 Tagen glichen sich die Intensitätsverhältnisse für beide Sulfonamidderivate an.

Das Metaboliten-Screening der Ethylacetat-Extrakte der Klärschlammproben ergab im Vergleich zu dem der Bodenproben ein weniger einheitliches Bild. Für ¹⁴C-Sulfamethoxazol konnte hier wiederum eine rasche Konzentrationsabnahme verzeichnet werden. Im Gegensatz zu den Abautests in Böden war hier auffällig, dass weitere Umwandlungsprodukte auch schon unmittelbar nach der Applikation festzustellen waren. In den ersten 30 Tagen blieb Sulfamethoxazol die überwiegende Komponente, während nach 72 Tagen die Rückstandssituation überwiegend von den Metaboliten bestimmt wurde. Letzteres trat im Ansatz von ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol noch deutlicher in den Vordergrund. In den ersten beiden Inkubationsintervallen konnte die Rückbildung von Sulfamethoxazol aus dem Acetyl-Derivat zwar eindeutig nachvollzogen werden, doch spielten beide Substanzen im weiteren Untersuchungszeitraum keine Rolle mehr, da hier ausschließlich weitere Umwandlungsprodukte nachweisbar waren.

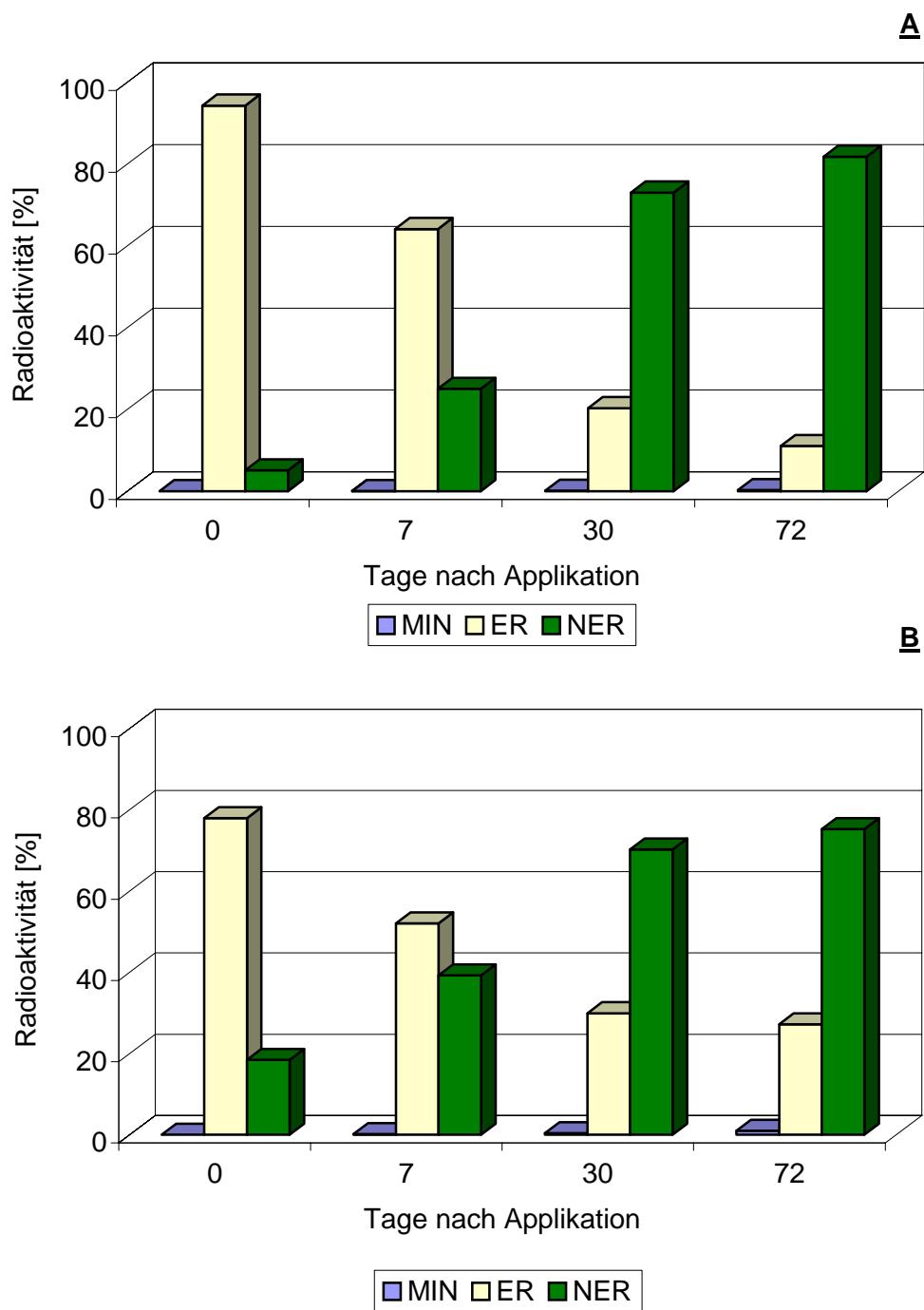


Abb. 5.35: Stabilitätstests von A: ^{14}C -Sulfamethoxazol und B: ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol in Klärschlamm

Mikrobieller Abbau nach Testklärschlamm-Applikation

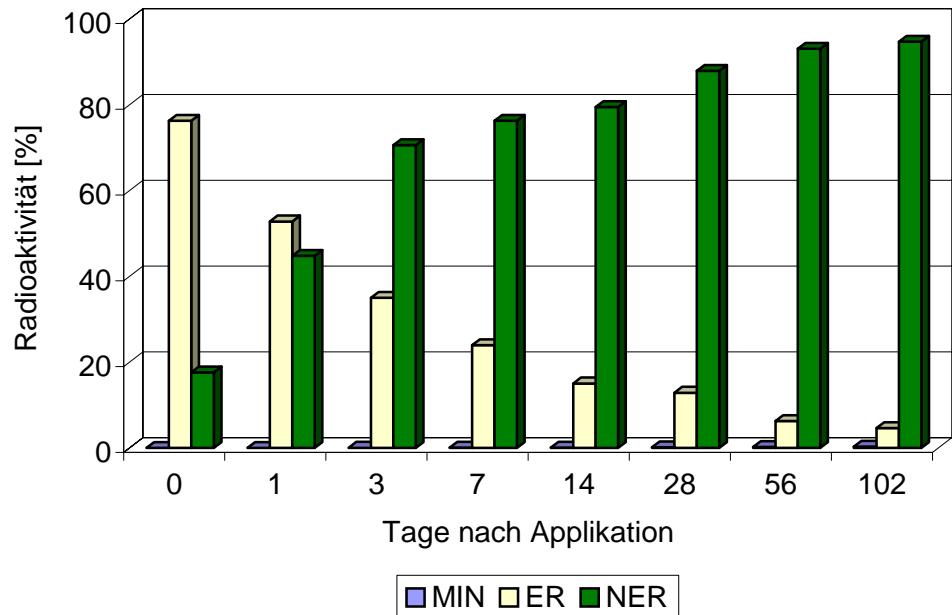
Auf der Basis dieser Stabilitätstests in Klärschlamm wurde Testklärschlamm mit 7 Tage gealterten ^{14}C -Sulfamethoxazol- und ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol-Rückständen hergestellt und zur Dotierung der zu untersuchenden Bodenproben verwendet. Bedingt durch diesen Alterungsprozess während der Klärschlamm Lagerung wurden damit zum einen 31 % der anfangs applizierten ^{14}C -Sulfamethoxazol-Konzentration und zum anderen 5 % der ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol-Konzentration zu den Bodenproben dotiert. Im letzteren Ansatz wurden gleichzeitig mit der Zugabe von ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol auch aus dessen hydrolytischer Spaltung hervorgegangenes ^{14}C -Sulfamethoxazol dotiert, dessen Anteil bezogen auf die anfangs zum Klärschlamm dotierte ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol-Menge 8 % betrug.

Aus den in **Abb. 5.36** dargestellten Radioaktivitätsverteilungen ist im Vergleich zur Standard-Applikation für beide Ansätze eine noch schnellere Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände zu verzeichnen. Nach der Applikation definiert in Klärschlamm gealterter ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol-Rückstände ist ferner auffällig, dass die Abnahme extrahierbarer Anteile durch eine steigende Mineralisation überkompensiert wird, die nur mit einer ^{14}C -Kohlendioxid-Freisetzung aus der nicht-extrahierbaren Fraktion zu erklären ist. In diesen Batchexperimenten wurden so insgesamt 11 % der mit dem Testklärschlamm applizierten Rückstände als ^{14}C -Kohlendioxid freigesetzt.

Während in den Ethylacetat-Extrakten aus den ^{14}C -Sulfamethoxazol-Abbautests nach Testklärschlamm-Applikation stets ein Anteil an ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol von 7-15 % vorhanden war, dessen Auftreten zwar mittels zweitem RTLC-Laufmittel abgesichert, allerdings nicht erklärt werden konnte, ergab das Metaboliten-Screening dieser Extrakte eine vollständige Umwandlung von ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol in ^{14}C -Sulfamethoxazol und in weitere, bereits in den Stabilitätstests gefundene Umwandlungsprodukte.

Nachdem für ^{14}C -Ibuprofen in den Stabilitätstests in Klärschlamm und in den Abbau- tests nach Testklärschlamm-Applikation Bilanzverluste aufgetreten waren, wurde die Analysenmethode für diese Probenmatrices weiterentwickelt. Basierend auf den Erfahrungen mit den Göllematrices im "Runoff-Projekt" wurde der Trocknungsschritt der bereits extrahierten Klärschlammproben modifiziert. So wurden die noch lösungsmittel- feuchten Proben mit Seesand vermischt, woraus schließlich nach Zerkleinerung und Aliquotierung homogenere Teilproben für die Verbrennung im Oxidizer hervorgingen.

A



B

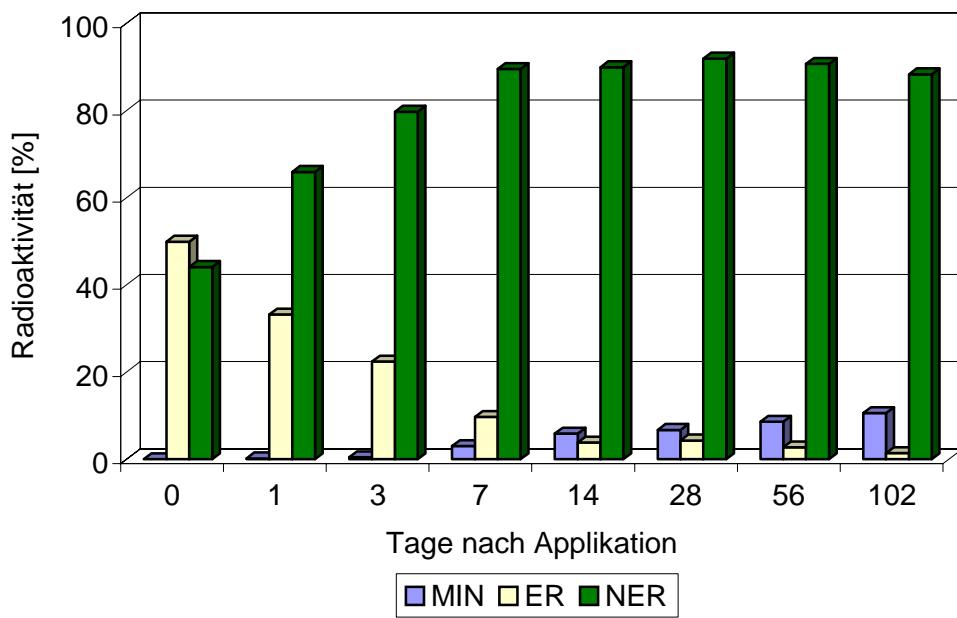


Abb. 5.36: Mikrobieller Abbau von **A:** ^{14}C -Sulfamethoxazol und **B:** ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol in schluffigem Ton (AD-A) nach Testklärschlamm-Applikation

Tab. 5.10: Radioaktivitätsbilanzen in den Laborbatchexperimenten zum mikrobiellen Abbau von ^{14}C -Sulfamethoxazol (SMZ) und ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol (A-SMZ) in A: Klärschlamm und B: tonigem Schluff (AD-A) nach Testklärschlamm-Applikation

| SMZ: <u>A</u> | Tag 0 | Tag 7 | Tag 30 | Tag 72 |
|----------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| MIN [%] | --- | 0.2 | 0.3 | 1 |
| ER [%] | 78 | 52 | 30 | 27 |
| NER [%] | 18 | 39 | 70 | 75 |
| Bilanz [%] | 96 | 91 | 100 | 103 |

| SMZ: <u>B</u> | Tag 0 | Tag 7 | Tag 28 | Tag 102 |
|----------------------|--------------|--------------|---------------|----------------|
| MIN [%] | --- | 3 | 7 | 11 |
| ER [%] | 50 | 10 | 4 | 1 |
| NER [%] | 44 | 90 | 92 | 88 |
| Bilanz [%] | 94 | 103 | 103 | 100 |

| A-SMZ: <u>A</u> | Tag 0 | Tag 7 | Tag 30 | Tag 72 |
|------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| MIN [%] | --- | 0.02 | 0.1 | 0.3 |
| ER [%] | 94 | 64 | 20 | 11 |
| NER [%] | 5 | 25 | 73 | 82 |
| Bilanz [%] | 99 | 89 | 93 | 93 |

| A-SMZ: <u>B</u> | Tag 0 | Tag 7 | Tag 28 | Tag 102 |
|------------------------|--------------|--------------|---------------|----------------|
| MIN [%] | --- | 0.04 | 0.2 | 0.3 |
| ER [%] | 76 | 24 | 13 | 5 |
| NER [%] | 18 | 76 | 88 | 93 |
| Bilanz [%] | 94 | 100 | 101 | 98 |

Für die extrahierbare Fraktion, die vielfach in unterschiedlich gefärbten Extrakten vorlag, wurde die für die Flüssigszintillationszählung eingeführte externe Korrektur für mögliche Löscheffekte (Farb-Quench) weiter optimiert. In der Summe dieser Maßnahmen zur Methodenentwicklung und Qualitätssicherung ergaben sich die in **Tab. 5.10** exemplarisch aufgelisteten Radioaktivitätsbilanzen für ¹⁴C-Sulfamethoxazol und ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol, die mit im Mittel 97 % denen der Tests nach Standard-Applikation entsprachen.

Kurzzeittests zum mikrobiellen, chemischen und photoinduziertem Abbau

In Ergänzung zu den 102-tägigen Batchexperimenten zur mikrobiellen Abbaubarkeit wurden zusätzlich 3-tägige Kurzzeittests in der Bestrahlungsapparatur durchgeführt. Der Einsatz mikrobiell aktiver und inaktiver Bodenproben definierte diesbezüglich die Differenzierung zwischen mikrobiellen bzw. chemischen Abbauprozessen. Aus den in **Abb. 5.37** dargestellten Radioaktivitätsbilanzen ließen sich allerdings keine eindeutigen photoinduzierten Einflüsse auf die Abbaubarkeit beider untersuchter Substanzen ableiten. Es zeigte sich für die Ansätze nach Testklärschlamm-Applikation, dass die Rückstandsdynamik sowohl bei Inkubation im Dunkeln als auch unter Bestrahlung überwiegend durch die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände bestimmt wurde. Nach Standard-Applikation traten dagegen in mikrobiell aktiven Bodenproben überwiegend extrahierbare Rückstände auf.

Eine detaillierte Charakterisierung des Abbauverhaltens ermöglichte hier erst das Metaboliten-Screening (**Abb. 5.38**). Während in allen mikrobiell aktiven Bodenproben Metaboliten vermehrt in Erscheinung traten, wurde die Metaboliten-Bildung in mikrobiell inaktiven Bodenproben des Sulfamethoxazol-Ansatzes vermindert und in denen des Acetyl-Sulfamethoxazol-Ansatzes sogar gänzlich unterdrückt. Aus letzterem ließ sich damit ableiten, dass die hydrolytische Rückbildung des ¹⁴C-Acetyl-Derivates zu ¹⁴C-Sulfamethoxazol unmittelbar von der bodeninhärenten mikrobiellen Aktivität abhängt. Weiterhin ergab sich aus der Gegenüberstellung der Tests zum mikrobiellen und zum photoinduziert-mikrobiellen Abbau eine geringere Umwandlung des applizierten ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol, die auf eine durch die Bestrahlung bedingte Abtrocknung der Bodenoberfläche und damit verminderte mikrobielle Aktivität in der Bodenprobe zurückzuführen sein könnte.

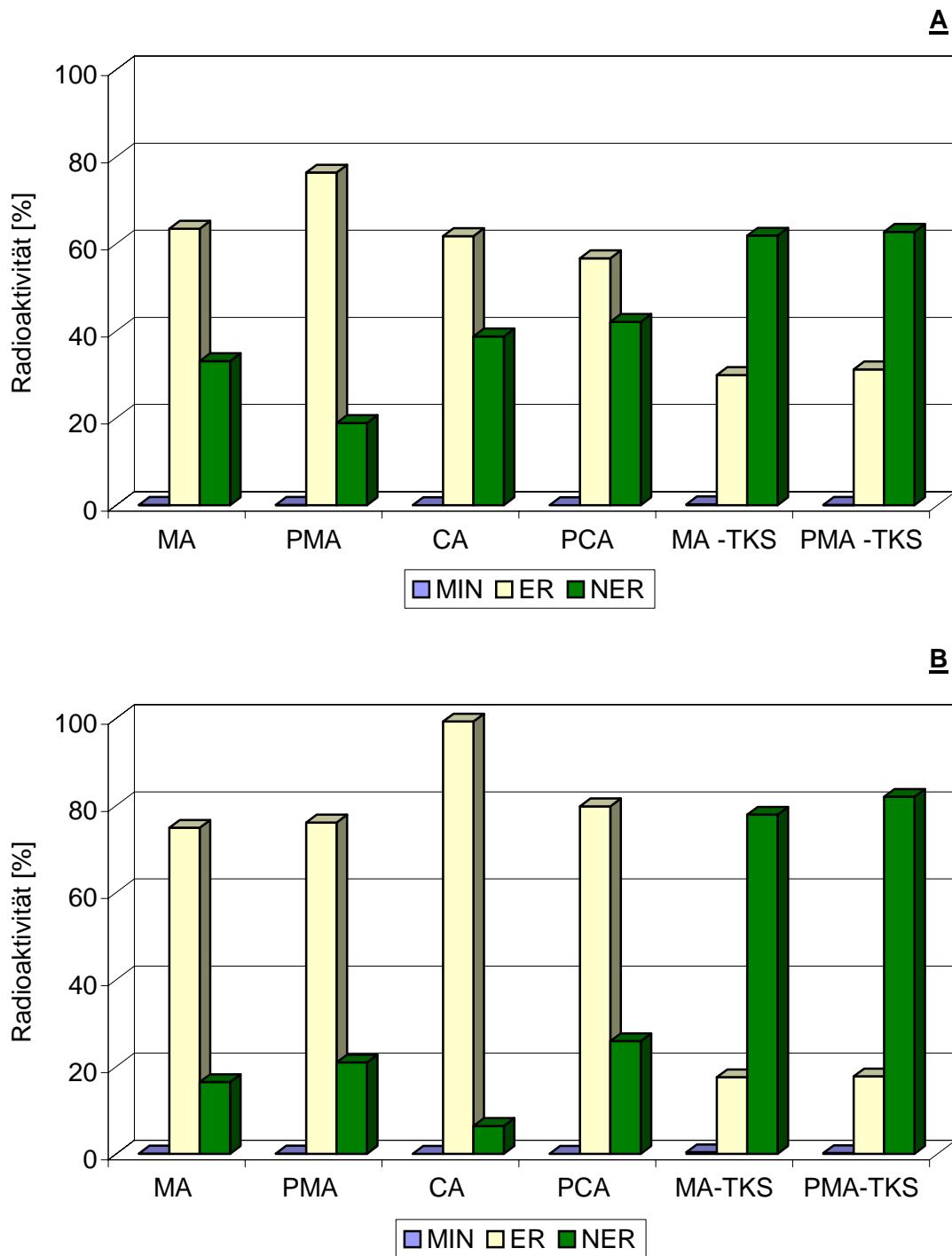


Abb. 5.37: Mikrobieller (MA), chemischer (CA), photoinduziert-mikrobieller (PMA) und photoinduziert-chemischer (PCA) Abbau von A: ^{14}C -Sulfamethoxazol und B: ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol in schluffigem Ton (AD-A) nach Standard- und Testklärschlamm-Applikation (TKS)

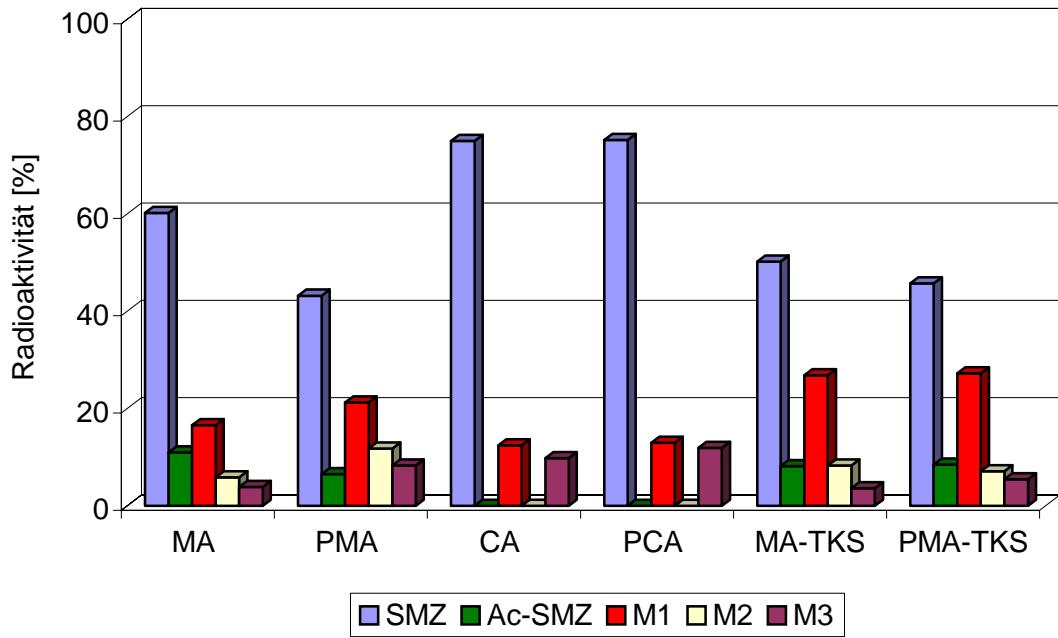
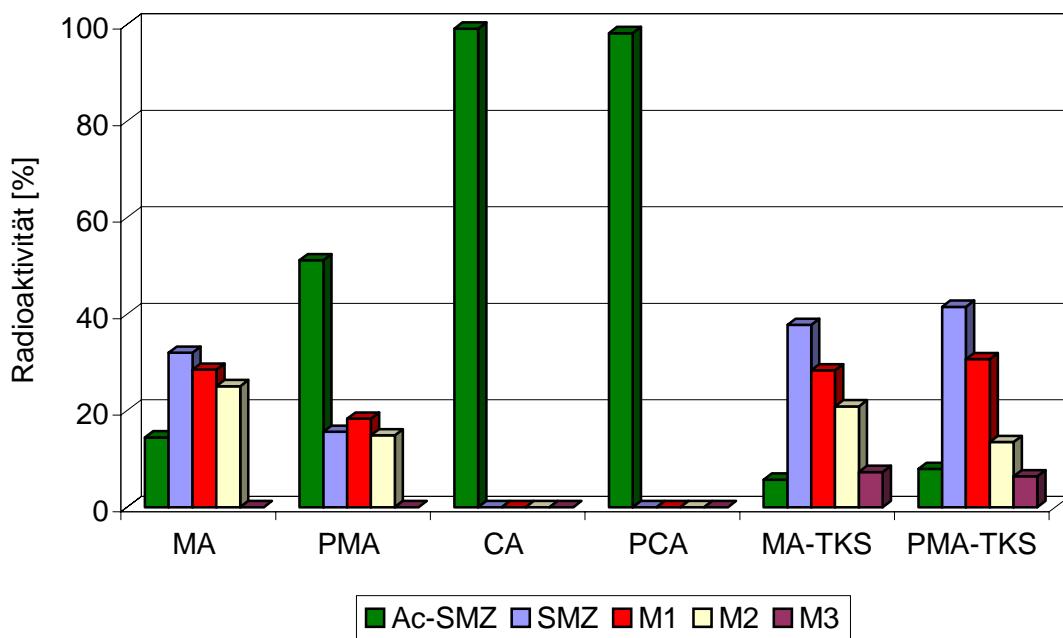
A**B**

Abb. 5.38: Metaboliten-Screening in den Ethylacetat-Extrakten von A: ^{14}C -Sulfamethoxazol und B: ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol nach Standard- und Testklärschlamm-Applikation (TKS) in schluffigem Ton (AD-A)

Kleinlysimetertests zur Verlagerung von ^{14}C -Sulfamethoxazol

Aus den für beide Sulfonamid-Derivate ermittelten Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten ließ sich bei $K_d < 5 \text{ L kg}^{-1}$ eine erhöhte Mobilität in Böden ableiten. Dabei führte die Applikationstechnik der zu untersuchenden Substanzen als Standardlösung oder Testklärschlamm zu keinen wesentlichen Unterschieden. Zur Überprüfung dieser ersten Abschätzung wurden zur Ermittlung von Verlagerungstendenzen in ungestörten Bodenproben Kleinlysimetertests durchgeführt, in denen 100 L m^{-2} diskontinuierlich auf Bodenkerne von 6 cm Höhe und 8.5 cm ID innerhalb von 14 Tagen verregnet wurden, um so einen ungesättigten Wasserfluss zu gewährleisten.

Nach Standard-Applikation von ^{14}C -Sulfamethoxazol auf Bodenkerne, die am Untersuchungsstandort Adenstedt aus der gewachsenen Ackerkrume nach der Weizenernte entnommen wurden, fanden sich 14 % der anfangs applizierten Radioaktivität im Perkolat wieder, von der 10 % auf die Ausgangsverbindung entfielen. Die höchste Bodenkontamination ließ sich in der 0-2 cm-Bodenschicht nachweisen, die überwiegend in Form nicht-extrahierbarer Rückstände vorlag (**Abb. 5.39**).

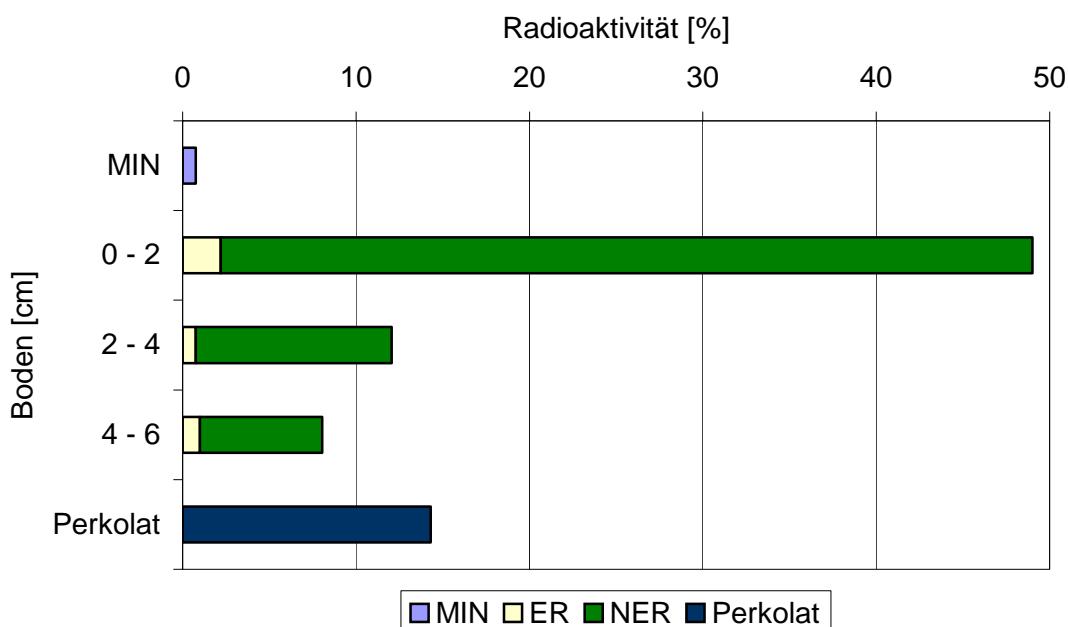


Abb. 5.39: Kleinlysimetertest zu Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Sulfamethoxazol nach Standard-Applikation in schluffigem Ton (AD-A) vor Bodenbearbeitung

Mit zunehmender Bodentiefe nahmen die Rückstände dann deutlich ab. Entsprechend den Tests zum mikrobiellen Abbau spielte auch hier die Mineralisation für die Rückstandsdynamik eine untergeordnete Rolle. Von entscheidender Bedeutung zeigte sich dagegen die Bodenstruktur zum Zeitpunkt der Probenentnahme. Diesen Aspekt belegten Kleinlysimetertests mit Bodenkernen, die erst nach der Bodenbearbeitung zur Saatbettbereitung gestochen wurden. Hier konnte ^{14}C -Sulfamethoxazol als unveränderte Ausgangsverbindung zu annähernd 30 % im Perkolat wiedergefunden werden, die aus einer stärkeren Auswaschung aus der 0-2 cm-Bodenschicht resultierte (**Abb. 5.40**). Diese Verlagerungstendenz steht damit in Einklang mit der von ^{14}C -Ibuprofen.

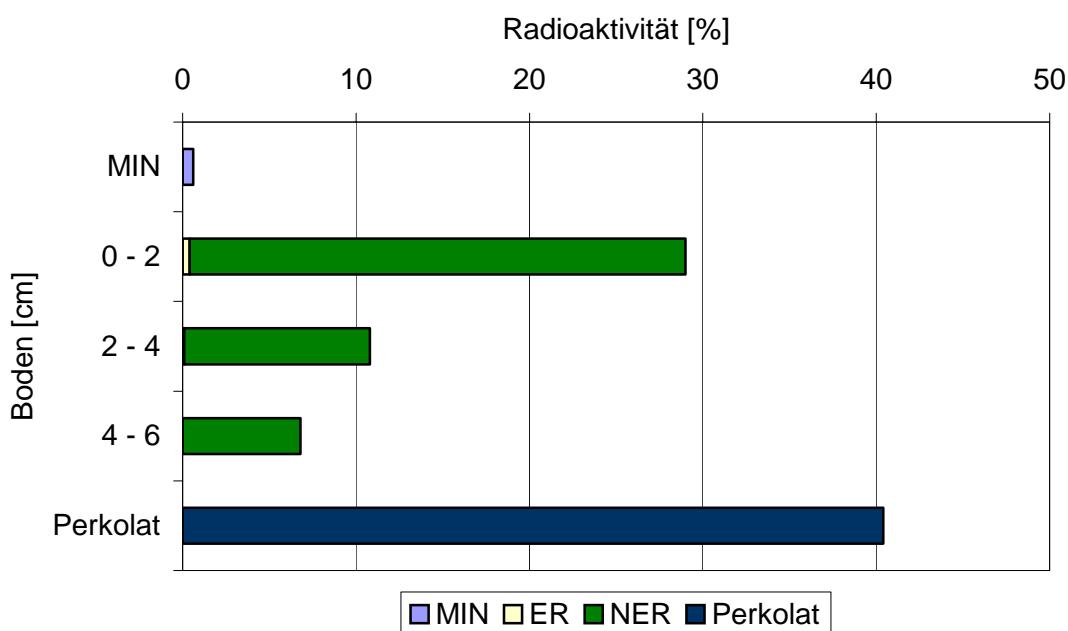


Abb. 5.40: Kleinlysimetertest zu Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Sulfamethoxazol nach Standard-Applikation in schluffigem Ton (AD-A) nach Bodenbearbeitung

Der Bodenkern vom Grünlandstandort nahm bezüglich der Verlagerung von ^{14}C -Sulfamethoxazol, das zu 20 % als unveränderte Ausgangsverbindung im Perkolat nachweisbar war, eine Mittelstellung zwischen den Tests mit den Ackerproben unterschiedlicher Bodenstruktur ein (**Abb. 5.41**). Auffällig war hier eine insgesamt gleichmäßigere Verteilung von ^{14}C -Sulfamethoxazol-Rückständen im Tiefenprofil, die mit insgesamt

höheren Anteilen an extrahierbaren Rückständen einherging.

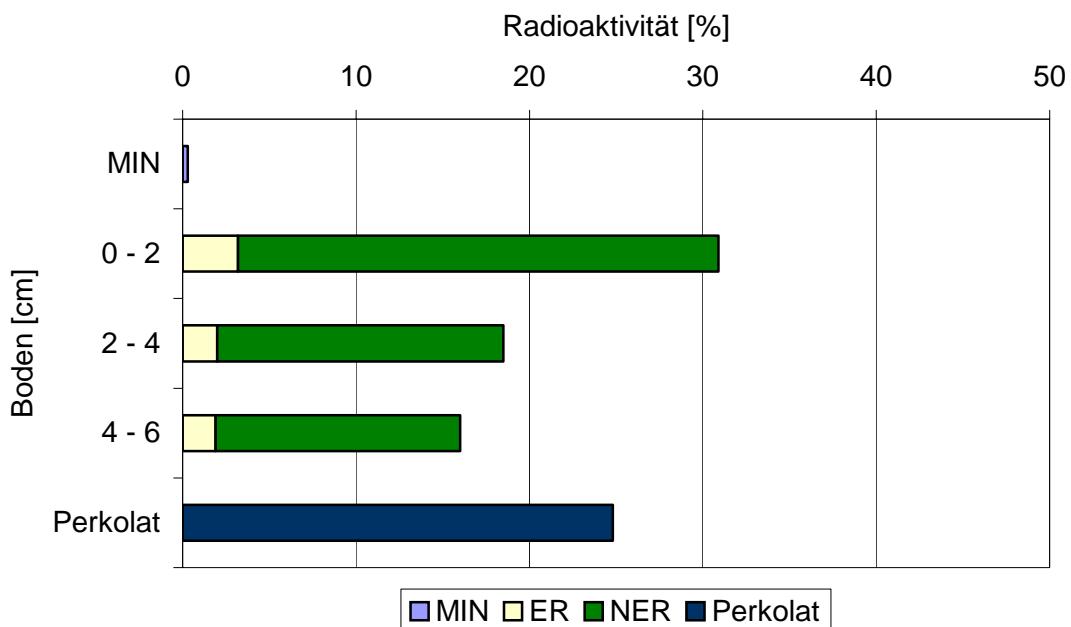


Abb. 5.41: Kleinlysimetertest zu Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Sulfamethoxazol nach Standard-Applikation in schluffigem Ton des Grünlandstandortes (AD-G)

Im Vergleich zu dem nach der Bodenbearbeitung entnommenen Bodenkern, auf den ^{14}C -Sulfamethoxazol als Standardlösung dotiert wurde, konnten nach Testklärschlamm-Applikation annähernd identische Radioaktivitätsmengen im Perkolat gefunden werden (**Abb. 5.42**). Das Metaboliten-Screening ergab, dass das Perkolat noch 23 % ^{14}C -Sulfamethoxazol als unveränderte Ausgangsverbindung enthielt, womit eine insgesamt beträchtliche Verlagerungstendenz unter diesen Versuchsbedingungen vorliegt. Bei wenig differierenden K_d -Werten nach Standard- bzw. Testklärschlamm-Applikation ließ sich diese beträchtliche Verlagerungstendenz nicht unmittelbar aus den Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten ablesen (s. **Tab. 5.3**). Zwar ist aus dem Verlagerungsverhalten in den Kleinlysimetertests ein Eintrag von Sulfamethoxazol in Grundwasserleiter mit geringen Flurabstand nicht auszuschließen, doch müssten müssten diese Tendenzen für eine detaillierte Gefährdungsabschätzung mittels Lysimeter-Tests unter Freilandbedingungen bzw. direkt in Freilandstudien validiert werden. Dage-

gen ist nach Testgülle-Applikation für Sulfonamide im schluffigen Tonboden, der im "Runoff-Projekt" unter Freilandbedingungen untersucht wurde, keine unmittelbare Gefährdung einer Grundwasserkontamination abzuleiten (Kreuzig und Höltge, 2005).

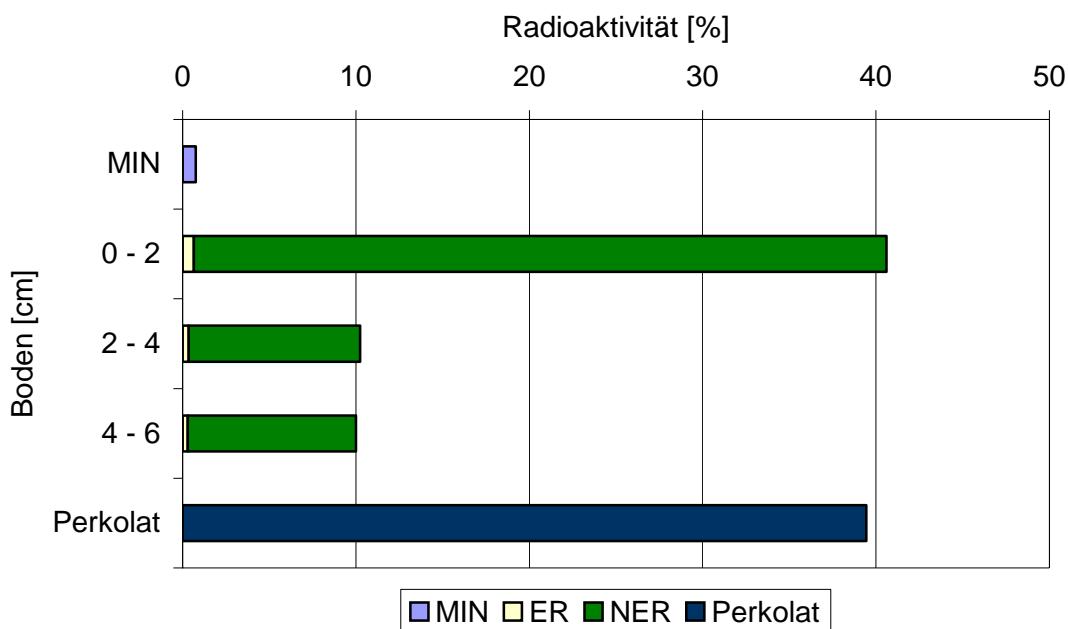


Abb. 5.42: Kleinlysimetertest zu Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Sulfamethoxazol nach Testklärschlamm-Applikation in schluffigem Ton (AD-A) nach Bodenbearbeitung

Kleinlysimetertests zur Verlagerung von ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol

In weiteren Laborlysimetertests wurden für ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol nach Standard-Applikation stärkere Verlagerungstendenzen als für ^{14}C -Sulfamethoxazol festgestellt. Mit der insgesamt geringeren Bodenkontamination und der verminderten Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände in den 3 untersuchten Schichten des Bodenkernes ging ein Durchbruch der applizierten Radioaktivität von 44 % einher (**Abb. 5.43**). Mittels Metaboliten-Screening wurde ein ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol-Anteil von 16 % ermittelt. Darüber hinaus konnten auch 23 % ^{14}C -Sulfamethoxazol im Perkolat nachgewiesen werden, womit deutlich belegt wurde, dass auch in diesen Laborlysimetertests Verlagerung und Abbau als konzentrationsbestimmende Prozesse gleichzeitig auftreten.

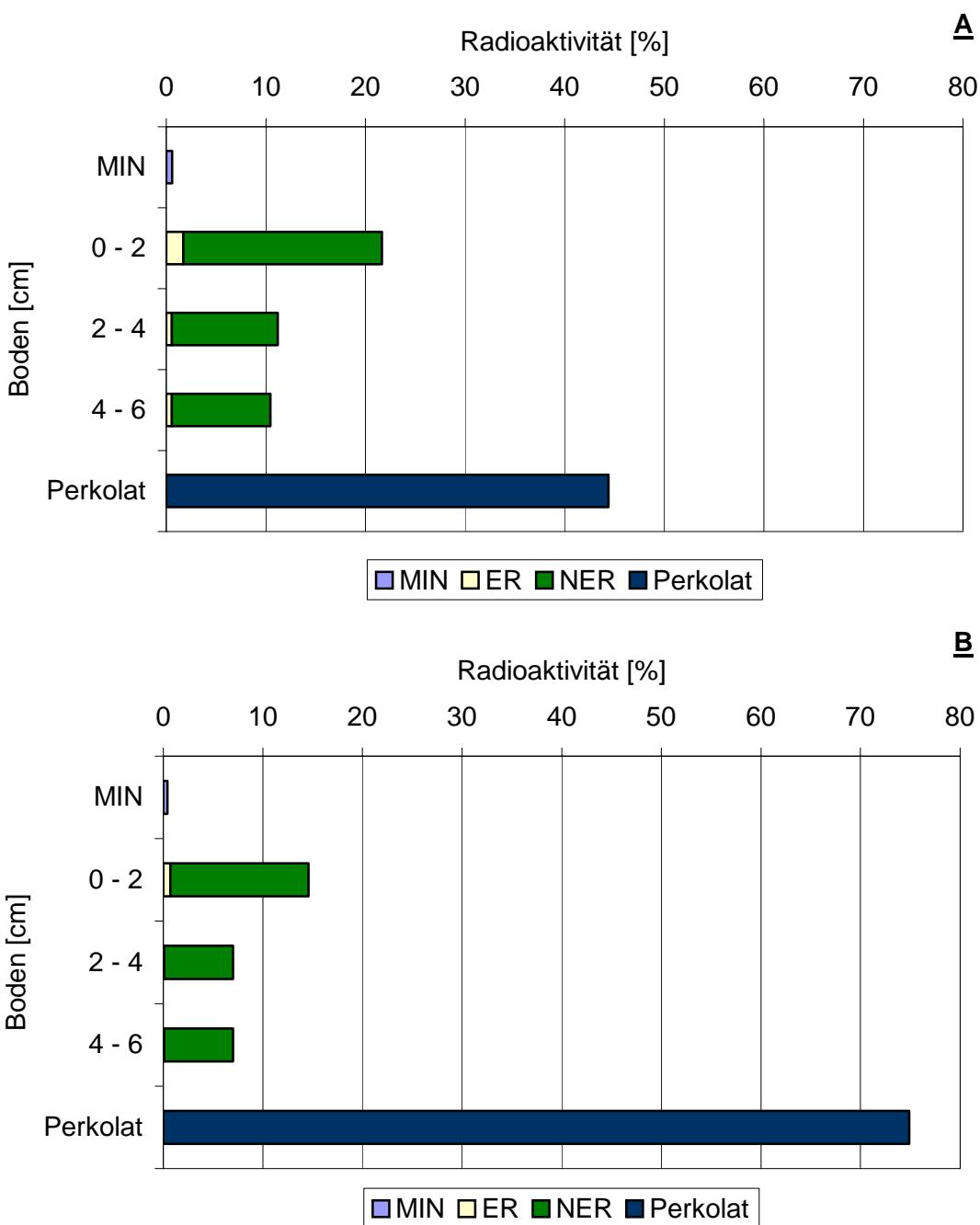


Abb. 5.43: Kleinlysimetertest zu Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol nach Standard-Applikation in schluffigem Ton (AD-A) **A: vor und **B:** nach Bodenbearbeitung**

Für nach der Bodenbearbeitung zur Saatbettbereitung entnommene Bodenkerne stieg der Durchbruch von ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol und ^{14}C -Sulfamethoxazol auf 13

bzw. 62 % in Bezug auf die anfangs mit ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol applizierte Radioaktivität an. Da die Bodenbearbeitung mit einer Zerstörung von schnell dränender Poren, die sich während einer Vegetationsperiode ausbilden, einhergeht, scheint diese Verlagerung auf einen intensivierten Matrixfluss zurückzuführen zu sein. Da aus dem Metaboliten-Screening zu den Stabilitätstests von ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol in Klärschlamm hervorging, dass diese Substanz in der 7-tägigen Inkubationperiode vollständig deacyliert wurde, handelte es sich bei diesen Laborlysimetertest eigentlich ebenfalls um Verlagerungsuntersuchungen von ^{14}C -Sulfamethoxazol unter Klärschlamm-einfluss, bei denen diese Substanz nur in deutlich niedrigerer Konzentration eingesetzt wurde. Es ergaben sich in diesem Versuchsansatz bereits bekannte Verlagerungstendenzen (**Abb. 5.44**), so dass hiermit die Verlagerungstendenzen von ^{14}C -Sulfamethoxazol nach Testklärschlamm-Applikation bestätigt wurden.

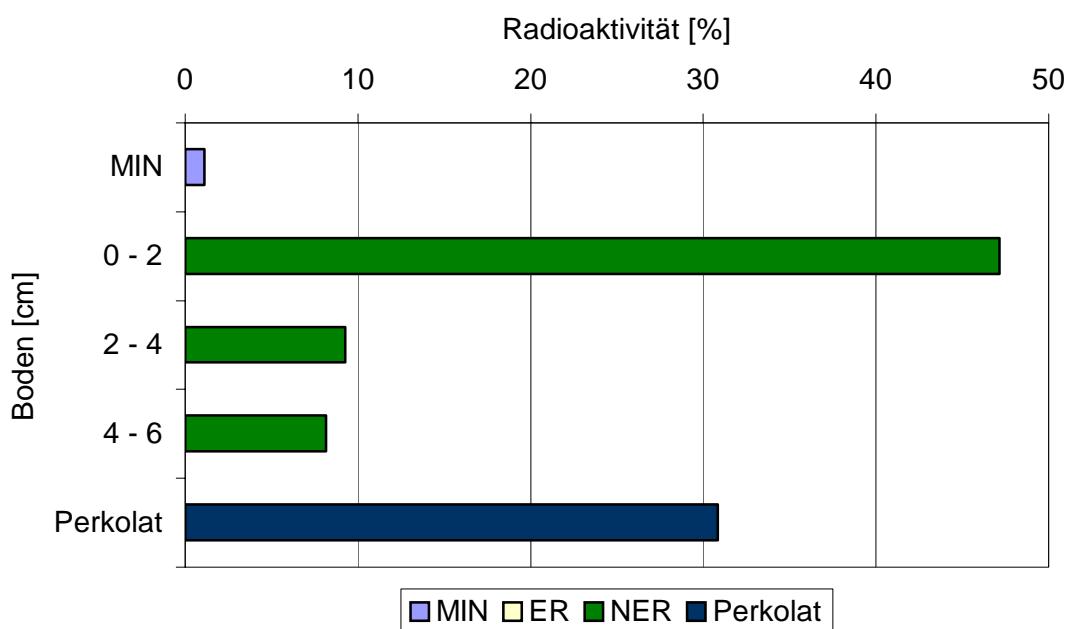


Abb. 5.44: Kleinlysimetertest zu Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol nach Testklärschlamm-Applikation in schluffigem Ton (AD-A) nach Bodenbearbeitung

Auffällig war jedoch, dass bei der Analyse der Perkolate mittels Radiodünnschicht-chromatographie die im Test-Klärschlamm vorhanden Umwandlungsprodukte nicht

mehr detektierbar waren, sondern der Hauptanteil der im Perkolat enthalten Radioaktivität (31 %) als ^{14}C -Sulfamethoxazol (26 %) identifiziert werden konnte. Somit schien eine stärkere Sorption der Umwandlungsprodukte an die Bodenmatrix aufzutreten, während ^{14}C -Sulfamethoxazol in tiefere Bodenschichten verlagerbar war. ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol war hier nicht mehr nachweisbar.

Bei der Applikation der ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol-Standardlösung auf einen Bodenkern vom Grünlandstandort zeichnete sich eine dem ^{14}C -Sulfamethoxazol nahezu identische Radioaktivitätsverteilung ab. Die Radioaktivität im Perkolat betrug in Bezug zur applizierten Ausgangsaktivität 25 % (**Abb. 5.45**). Die Anteile von Acetyl-Sulfamethoxazol und Sulfamethoxazol waren 11 % bzw. 13 %. Auch der Gesamtanteil von > 50 % nicht-extrahierbarer Rückstände, die sich zu annähernd 30 % in der 0-2 cm-Bodenschicht wiederfanden und der Rest sich gleichmäßig auf den restlichen Bodenkern verteilte, stimmte mit den bereits für ^{14}C -Sulfamethoxazol beschriebenen Untersuchungsergebnissen überein.

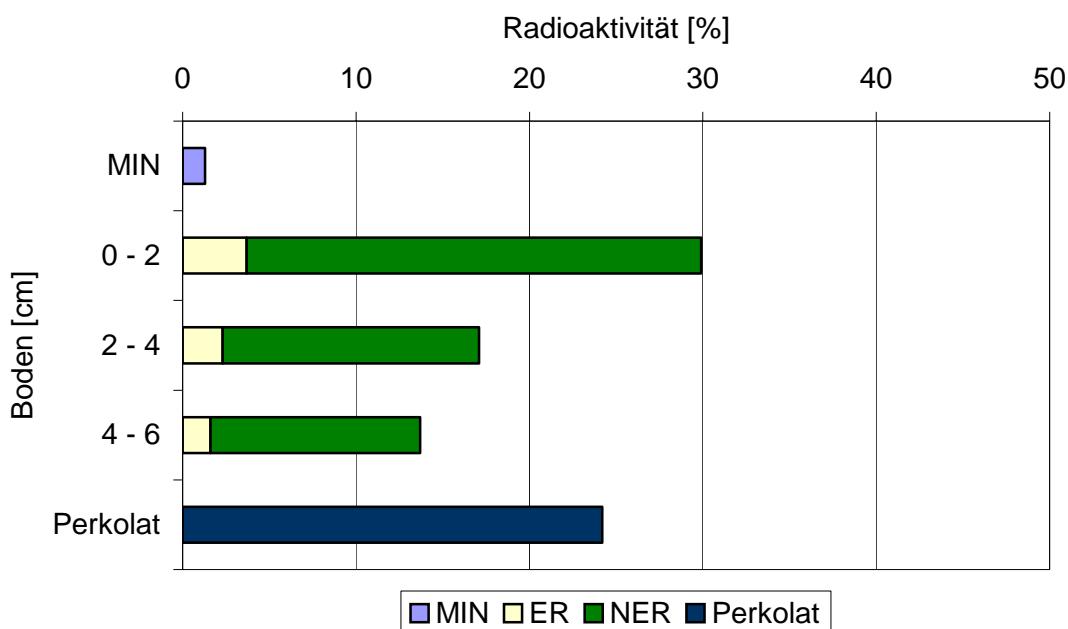


Abb. 5.45: Kleinlysimetertest zu Verlagerung und Abbau von ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol nach Standard-Applikation in schluffigem Ton (AD-G)

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Einsatz von Labortestsystmen

Nach der Identifizierung von Pharmaka-Rückständen als neue Klasse von Umweltchemikalien war es eine konsequente Fortsetzung der in den 1990er Jahren durchgeführten Monitoringprogramme, auch das Rückstandsverhalten ausgewählter Human- und Veterinärpharmaka in verschiedenen Umweltkompartimenten eingehender zu untersuchen. Im UFOPLAN 1999 des Umweltbundesamtes erfolgte so die Ausschreibung des Forschungsvorhabens "Verhalten von in der Umwelt vorkommenden Pharmaka und ihren Metaboliten in Testsystemen für den aquatischen Bereich und Boden anhand ausgewählter Vertreter des Human- und Tierbereiches", das in den Teilprojekten "Modellsystem Wasser/Sediment" (UBA-FKZ 299 67 401) und "Modellsystem Boden" (UBA-FKZ 201 67 401/02)[#] bearbeitet wurde.

Im hier dargestellten "Boden-Projekt" wurde zugrundegelegt, dass Rückstände von Humanpharmaka über kontaminiertes Oberflächenwasser oder kontaminierte Klärschlämme in Böden eingetragen werden. Die Betrachtung der Veterinärpharmaka und deren Eintrag in Böden über kontaminierte Wirtschaftsdünger erfolgt dagegen im Forschungsvorhaben "Untersuchungen zum Abflussverhalten von Veterinärpharmaka bei Ausbringung von Gülle auf Ackerland und Weide" (UBA-FKZ 20267435)^{##}. Die zeitnahe Bearbeitung dieser beiden Projekte im Institut für Ökologische Chemie und Abfallanalytik, Technische Universität Braunschweig, ermöglichte, Labortestsystme für ein mehrstufiges Untersuchungskonzept zu entwickeln, in dem Abbau und Sorption als konzentrationsbestimmende Prozesse für die eingesetzten Substanzen in Böden betrachtet wurden.

Auf der Basis von Standardtestsystmen, wie sie auch im gesetzlichen Zulassungsvorhaben von Pflanzenschutzmitteln vorgeschrieben sind, wurden im ersten Ansatz Basisdaten zur mikrobiellen Abbaubarkeit und zu Adsorption/Desorption in 2 Böden deutlich unterschiedlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften erarbeitet. Hieraus ließen sich erste Tendenzen zur Persistenz und Mobilität in den untersuchten Böden abschätzen.

Im zweiten spezifischeren Ansatz wurden zusätzlich chemische und photoinduzierte

[#] kurz: "Boden-Projekt"

^{##} kurz: "Runoff-Projekt"

Abbauprozesse erfasst. Während anhand der erst genannten Labortests unter Einsatz mikrobiell inaktiver Bodenproben die Bedeutung der bodeninhärenten Mikroorganismen auf die Rückstandsdynamik von Pharmaka-Rückständen abgeleitet werden kann, wird in den zweiten unter Verwendung einer Bestrahlungsapparatur auch der Einfluss photochemischer Umwandlungen in Böden berücksichtigt und somit die Übertragbarkeit von Labor- auf Freilandbedingungen erhöht. Dieses gilt auch für die Verlagerungstests in Bodensäulen, Bodenkernen bzw. Bodenmonolithen, die in Ergänzung der Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten durchgeführt wurden. Da hierfür zum ersten Mal geschlossene Labortestsysteme eingesetzt wurden, gelang es unter Laborbedingungen, Verlagerung und Abbau als gleichzeitig auftretende Prozesse in Böden zu erfassen.

Im dritten Ansatz fand der Eintragspfad über kontaminierte Klärschlämme besondere Berücksichtigung, dem für die exemplarisch untersuchten Substanzen Stabilitätstests in Klärschlamm vorgeschaltet waren. Auf dieser Basis wurde Testklärschlamm^{###} hergestellt, der dann in den Abautests mit Böden eingesetzt wurde. Da aus diesem Alterungsprozess neben der applizierten Ausgangsverbindung^{####} auch Abbau- bzw. Umwandlungsprodukte sowie in der Klärschlammatrix festgelegte Rückstände hervorgehen, wird in diesem hier erstmals angewendeten Versuchsdesign die sich aus der Klärschlamm Lagerung resultierende Gesamtrückstandssituation einer Substanz betrachtet. Außerdem sind auf diesem Wege auch Einflüsse der Klärschlammatrix auf Abbau- und Verlagerungsprozesse erfassbar, die sich nach einer ausschließlichen Applikation der Substanz als Standardlösung der Betrachtung entziehen.

Rückstandsverhalten der untersuchten pharmazeutischen Substanzen

Da Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, Diazepam, Paracetamol, Sulfamethoxazol und Acetyl-Sulfamethoxazol als ¹⁴C-markierte Radiotracer Anwendung fanden, wurden alle Labortests unter Berücksichtigung von Mineralisation sowie Bildung extrahierbarer und

^{###} "Testklärschlamm" bezeichnet Klärschlammproben, die mit jeweils einer ¹⁴C-markierten pharmazeutischen Substanz dotiert und für 7 Tage zur kurzfristigen Alterung der Rückstände gelagert wurde.

^{####} In der Ergebnisdarstellung zum Metaboliten-Screening werden die jeweiligen Ausgangsverbindungen explizit mit z.B. "¹⁴C-Ibuprofen als unveränderte Ausgangsverbindung" ausgewiesen. Die Bezeichnungen z.B. "¹⁴C-Ibuprofen-Rückstände" bzw. "% der applizierten Radioaktivität" beziehen sich auf die Gesamtrückstände, ohne dass hier zwischen Ausgangsverbindung und Umwandlungsprodukten differenziert wurde.

nicht-extrahierbarer Rückstände bilanziert. Damit konnten die in der Pflanzenschutzmittelzulassung festgelegten Persistenzkriterien $DT_{90} > 100$ Tage, Mineralisation < 5 % und Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände > 70 % in 100 Tagen für die Beurteilung des Rückstandsverhaltens der pharmazeutischen Substanzen herangezogen werden.

Für **^{14}C -Diclofenac** wiesen die ermittelten K_d -Werte in tonigem Schluff und im schluffigen Sand mit 10 bzw. 8 L kg⁻¹ eine geringe Mobilität aus, die nach Testklärschlamm-Applikation##### geringfügig erhöht wurde. Die mikrobielle Abbaubarkeit unterschied sich dagegen in beiden Böden deutlich. Während ^{14}C -Diclofenac im tonigen Schluff nicht-extrahierbare Rückstände von > 70 % in 100 Tagen bildete, wurde die Rückstandssituation im Sandboden durch die extrahierbare Fraktion, in der ^{14}C -Diclofenac als unveränderte Ausgangsverbindung bis zur Tag 56-Probe identifiziert wurde, dominiert. Hieraus berechnete sich ein DT_{50} -Wert von 2 Tagen. Bezüglich der Gesamtmineralisation ergaben sich kaum Unterschiede. Der zweiphasige Verlauf der Mineralisationsraten im Test mit tonigem Schluff deutete auf eine Freisetzung von ^{14}C -Kohlenstoff aus der nicht-extrahierbaren Fraktion hin. Da die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände ausschließlich in den Batchexperimenten mit mikrobiell aktiven Bodenproben im Dunkeln und unter Bestrahlung auftraten, sind diese als Funktion des mikrobiellen Abbaus und nicht als Funktion der Sorption an die Bodenmatrix anzusehen. Auffällig war ferner, dass das als photosensitive Substanz eingestufte Antiphlogistikum unter Bestrahlung in Boden keinem stärkeren Abbau unterlag und hier dieselben Umwandlungsprodukte wie in den Dunkelexperimenten nachweisbar waren.

Die Strukturanaloga **^{14}C -Ibuprofen** und **^{14}C -Ketoprofen** zeigten in den untersuchten Böden eine ähnliche Rückstandsdynamik. Unabhängig von der Applikation als Standardlösung oder Testklärschlamm war ^{14}C -Ketoprofen mit $K_d < 6$ L kg⁻¹ die insgesamt mobilste der untersuchten Substanzen. In den Abautests nach Standard-Applikation nahm die Extrahierbarkeit von ^{14}C -Ibuprofen in beiden Böden deutlich schneller ab. Zum Ende der Untersuchungszeiträume glich sich die jeweilige Rückstandssituation wieder stark an. Mit Werten jeweils um 40 % für Mineralisation und Bildung nicht-

Mit der "Testklärschlamm-Applikation" wurden ^{14}C -markierte Pharmaka-Rückstände, bestehend aus der jeweiligen Ausgangsverbindung und die während der Klärschlammierung gebildeten Umwandlungsprodukte sowie die nicht-extrahierbaren Rückstände, in diesen Batch-Equilibrium-Tests appliziert. Damit beziehen sich die hier ermittelten K_d -Werte auf die Gesamtrückstandssituation (z.B. ^{14}C -Ibuprofen-Rückstände).

extrahierbarer Rückstände sind beide Phenylpropionsäure-Derivate als leicht abbaubar in Böden einzustufen. Das betonten auch DT₅₀-Werte < 1 bzw. 3 Tage. In den Kurzzeit-tests ergab sich ein ähnliches Bild wie für ¹⁴C-Diclofenac. Mineralisation und nicht-extrahierbare Rückstände wurden überwiegend in Ansätzen mit mikrobiell aktiven Bodenproben festgestellt, wobei beide Prozesse im mikrobiell aktiveren tonigen Schluff verstärkt auftraten. Das verdeutlichten auch die Tests zum Abbau von ¹⁴C-Ibuprofen, in denen Bodenfeuchte und Temperatur variiert wurden. Insbesondere eine Austrocknung des Bodens, mit der eine Inhibierung der Mikroorganismentätigkeit einherging, führte zu einem stark verminderten Abbau. Der Temperatureinfluss war nicht relevant.

In den Stabilitätstests beider Substanzen im Klärschlamm ergaben sich ähnliche Bilder wie für den Abbau im schluffigen Sand. Die Applikation von Testklärschlamm, in denen beide Ausgangsverbindungen noch zu 13 % bzw. 24 % neben mehreren nicht identifizierten Metaboliten vorlagen, führte dagegen zu einer wesentlich schnelleren Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände, aus denen allerdings zum Versuchsende hin wieder ¹⁴C-Kohlendioxid freigesetzt wurde.

In den Säulen- und Laborlysimetertests unterlagen die ¹⁴C-Ibuprofen-Rückstände entgegen der auf K_d-Werten basierten Abschätzung der Verlagerung. Säulentestsysteme erwiesen sich insbesondere für den Einsatz von Schluffböden als sehr artifiziell, weil hier die Verlagerung gegenüber den Laborlysimetertests weit überschätzt wird. Die simultane Erfassung von Verlagerung und Abbau unterstreicht diesen artifiziellen Charakter dadurch, dass infolge des gesättigten Wasserflusses die Mineralisation durch Inhibierung der Mikroorganismentätigkeit stark eingeschränkt wurde. In den Kleinlysimetertests ist die Verlagerung von ¹⁴C-Ibuprofen-Rückstände unmittelbar abhängig von der Bodenstruktur während der Probenahme. Bei Verlängerung der Fließstrecke auf 30 cm im Laborlysimetertest erfolgt nur noch ein Durchbruch der anfangs mit dem Radio-tracer applizierten Radioaktivität von 3 %, so dass insgesamt für ¹⁴C-Ibuprofen-Rückstände eine geringe Verlagerungstendenz konstatiert wurde. Für ¹⁴C-Ketoprofen spiegelten sich dagegen die durch K_d-Werte ausgewiesene mäßige Mobilität auch im Verlagerungsverhalten in den Kleinlysimetertests wider.

¹⁴C-Diazepam zeigte als einzige basische Substanz ein von den anderen abweichendes Rückstandsverhalten. Obgleich das 1,4-Benzodiazepin-Derivat im menschlichen Metabolismus einem schnellen Abbau unterliegt, wird es von mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Prozessen in Böden kaum angegriffen. DT₉₀ > 100 Tage und

Mineralisationsraten < 5 % belegen, dass diese Substanz in Böden mikrobiell nur schwer abbaubar ist. Eine geringe Mobilität in Böden ließ sich aus K_d -Werten von 13 bzw. 20 L kg⁻¹ für tonigen Schluff bzw. schluffigen Sand ablese. Ein Einfluss durch die Klärschlammmatrix konnte in den Kleinlysimetertests entgegen der durch K_d -Werte abgeschätzten Tendenz nicht nachgewiesen werden.

Auch **¹⁴C-Paracetamol** nimmt eine Sonderstellung ein. Im Gegensatz zum ¹⁴C-Diazepam steht hier allerdings die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände im Vordergrund, die unmittelbar nach der Dotierung, aber nur in mikrobiell aktiven Böden auftritt. Bereits innerhalb der ersten Tage nach Applikation wurden mehr als 80 % der applizierten Radioaktivität in der Bodenmatrix festgelegt. Aufgrund dieses kurzen Zeitraumes schien diese hohe Affinität zur Bodenmatrix unmittelbar von ¹⁴C-Paracetamol als unveränderte Ausgangsverbindung auszugehen. Danach nahmen die nicht-extrahierbaren Anteile geringfügig ab. Damit gingen bis zum Versuchsende ansteigende Mineralisationsraten einher, so dass sich hier die Frage nach Bindungsstärke und Remobilisierung dieser Fraktion stellte. Da von den nicht-extrahierbaren Rückständen in Remobilisierungstests nur 3 % in ¹⁴C-Kohlendioxid und nur 0.4 % in die extrahierbare Fraktion überführt wurden, scheinen ¹⁴C-Paracetamol-Rückstände allerdings weitgehend irreversibel in der Bodenmatrix festgelegt zu werden.

Im Klärschlamm dagegen zeigte ¹⁴C-Paracetamol keine so ausgeprägte Persistenz wie in Böden. Hier nahm die Anfangsaktivität um annähernd 60 % innerhalb von 7 Tagen ab. In der Tag 7-Probe überwogen in den Extrakten bereits korrespondierende Metaboliten. Nach Testklärschlamm-Applikation wurde die Rückstandsdynamik wieder durch die nicht-extrahierbare Fraktion geprägt. Aus diesem Rückstandsverhalten heraus ließ sich dann auch erklären, dass ¹⁴C-Paracetamol durch K_d -Werte von 46 bzw. 36 L kg⁻¹ als weitgehend immobile Substanz in Böden ausgewiesen wurde.

Da die Rückstandsdynamik von **¹⁴C-Sulfamethoxazol** und **¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol** bei niedrigen Mineralisationsraten überwiegend durch die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände geprägt wird, letzterer Prozess wird durch die Testklärschlamm-Applikation noch beschleunigt, sind beide Verbindungen in Böden als persistent anzusehen. Für ¹⁴C-Acetyl-Sulfamethoxazol ist dabei zu berücksichtigen, dass aus diesem aufgrund enzymatisch katalysierter, hydrolytischer Spaltung in mikrobiell aktiven Böden ¹⁴C-Sulfamethoxazol zurückgebildet wird. In den Kurzzeittests im Dunkeln und unter

Bestrahlung wurden auch in den mikrobiell inaktiven Böden nicht-extrahierbare Rückstände gebildet. Damit lag hier ein deutlicher Unterschied zu den Antiphlogistika vor. Das Metaboliten-Screening deckte allerdings die Unterschiede zu den Ansätzen mit mikrobiell aktiven Bodenproben auf. Während hier in den Extrakten Umwandlungsprodukte nachweisbar waren, wurden unter Ausschluss der Mikroorganismentätigkeit überwiegend die Ausgangsverbindungen bestimmt.

Die ermittelten K_d -Werte wiesen bereits eine deutliche Mobilität aus, die auch in den Kleinlysimetertests wiedergegeben wurde. Nach Standard- und Testklärschlamm-Applikation betrug der Substanzdurchbruch von ^{14}C -Sulfamethoxazol-Rückständen 13-40 % und von ^{14}C -Acetyl-Sulfamethoxazol-Rückständen 13-31 %. In letzteren Tests bleibt noch die Umwandlung zu ^{14}C -Sulfamethoxazol zu berücksichtigen, die zu entsprechenden Nachweisen auch dieser Verbindung im Perkolat führte. Insgesamt sind unter diesen Testbedingungen beide Sulfonamid-Derivate in Böden als mobil und verlagerbar einzustufen.

Weiterer Forschungsbedarf

Die Untersuchung des Rückstandsverhaltens von Human- und Veterinärpharmaka-Rückständen in Böden wird sich z.B. im Rahmen von Zulassungsverfahren überwiegend auf Labortests zur Abbaubarkeit und Verlagerung konzentrieren müssen, da die Anwendung des im Zulassungsverfahrens für Pflanzenschutzmittel etablierten mehrstufigen Prüfkonzeptes von Labortests über Lysimeterexperimente zu mehrjährigen Freilandstudien kurz- bis mittelfristig kaum durchsetzbar sein dürfte. Vor allem die Durchführung von realistischen Freilandstudien könnte im Gegensatz zur gesetzlich geregelten Pflanzenschutzmittel-Applikation zu Problemen mit der ökologischen Akzeptanz führen. Die hier entwickelten und eingesetzten Labortestsysteme haben bereits deutlich gezeigt, dass ausschließlich die Bestimmung von DT_{50} - und DT_{90} - sowie K_d - und K_{OC} -Werten keine umfassende Beschreibung des Rückstandsverhaltens liefern. Insbesondere die Eintragssituation für Human- und Veterinärpharmaka über kontaminierte Klärschlämme bzw. Wirtschaftsdünger kann auf diese Weise nicht berücksichtigt werden.

Die im "Boden-Projekt" und "Runoff-Projekt" entwickelten Labortestsysteme weisen diesbezüglich schon in die richtige Richtung. Wie für die Verlagerung von ^{14}C -Ibuprofen gezeigt werden konnte, sollten bei Labortests zur Verlagerung geschlossene Laborlysimetersysteme mit Fließstrecken von 30 cm Einsatz finden, um hier entsprechend der

Mächtigkeit von ackerbaulich genutzten Oberböden (Ap-Horizonten) Abbau- und Verlagerungsprozesse simultan erfassen zu können. Hier ist allerdings eine Fortführung der Testsystementwicklung notwendig, die auch in geschlossenen Anlagen eine automatische Berechnung unter Beibehaltung eines ungesättigten Wasserflusses und somit aerober Milieubedingungen ermöglicht. Für die Risikobewertung einer Grundwassergefährdung sind mittels dieser Labortestsysteme ermittelte Verlagerungstendenzen schließlich durch Lysimeter- bzw. Freilandstudien zu validieren.

Weitere Entwicklungsarbeiten sollten in die Optimierung des Versuchsdesigns von Stabilitätstests in Klärschlamm oder Wirtschaftsdünger einfließen. Insbesondere für Veterinärpharmaka ist der Eintragspfad durch kontaminierte Gülle eindeutig belegbar und sollte deswegen in die Bewertung dieser Rückstände in güllegedüngten Böden einbezogen werden. In Vorbereitung einer einheitlichen Arbeitsvorschrift mit Richtliniencharakter sind hier allerdings noch weitergehende Untersuchungen erforderlich, die unterschiedliche Lagerungszeiträume und -bedingungen einbeziehen. Aus diesen Arbeiten würde sich auch eine definierte Herstellung von Testklärschlamm bzw. Testgülle herleiten, die dann in den Tests zum mikrobiellen, chemischen und photoinduzierten Abbau sowie in den Verlagerungstests gezielt eingesetzt werden könnten.

Die Untersuchungen im "Boden-Projekt", aber auch im "Runoff-Projekt", verdeutlichen für einige untersuchte Substanzen, dass deren Rückstandsverhalten sehr stark durch das Auftreten nicht-extrahierbarer Rückstände geprägt wird. Diese besondere Affinität zur Bodenmatrix wird als eines der Persistenzkriterien für Pflanzenschutzmitteln und verwandte Umweltchemikalien herangezogen, ohne dass die chemische Natur dieser Rückstände bisher im Detail aufzuklären ist. Insbesondere für Verbindungen wie Paracetamol oder die Sulfonamide, deren Festlegung in der Bodenmatrix zumindest teilweise auf mikrobielle Prozesse zurückzuführen ist und die durch die Einbringung als Testklärschlamm oder Testgülle noch gesteigert wird, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Diese sollte auch eine Differenzierung einschließen, inwiefern die in der Bodenmatrix festgelegte Radioaktivität auf die applizierte Ausgangsverbindung oder gebildete Metaboliten zurückzuführen ist. Zur Ermittlung der Bindungsstärke sind verschiedene sequentielle Extraktionstechniken, beginnend mit z.B. Calciumchlorid-Lösung, der sich nach Polarität abgestufte Lösungsmittlextraktionen und Derivatisierungsschritte anschließen, anzuwenden. Die hier bereits exemplarisch durchgeföhrten Remobilisierungstests mit Zusatz von Belebtschlamm zur Erhöhung der mikrobiellen Aktivität in den Extraktionsrückständen sind weiter zu optimieren. Ferner können Wir-

kungstests zur Charakterisierung dieser nicht-extrahierbaren Rückstände herangezogen werden. Diese neuen Forschungsansätze sind für die umfassende Bewertung der Rückstandssituation von Human- und Veterinärpharmaka in Böden von umweltchemischer und ökotoxikologischer Relevanz. Zusammen mit der mathematische Modellierung des Rückstandsverhaltens ("fate modelling") lassen sich die abzuleitenden Bewertungskriterien erweitern und eine Gefährdungsabschätzung präzisieren.

7. Summary and Conclusions

Application of laboratory test systems

In numerous screening and monitoring programmes of the 1990s, pharmaceutical residues have been identified as a new class of environmentally relevant chemicals. Therefore, a research programme entitled "Behaviour of Selected Pharmaceutical Medicines and Relevant Metabolites in Test Systems for Aquatic and Terrestrial Compartments" was consequently announced by the UOPLAN 1999 of the German Federal Environmental Agency (UBA). This programme was divided into two subprojects investigating fate and behaviour of pharmaceutical residues in "Laboratory Water/Sediment Systems" (Subproject 1: UBA-FKZ 299 67 401) and in "Laboratory Soil Systems" (Subproject 2: UBA-FKZ 201 67 401/02)[#].

In the "Soil Project" presented here, the use of contaminated surface water for artificial groundwater enrichment and the application of contaminated sewage sludge onto arable land have been assumed to be the entry routes for human pharmaceutical residues into soil environments. The fate of veterinary pharmaceutical residues in manured soils has been in the focus of the UBA funded research programme entitled "Investigations on runoff of veterinary pharmaceutical residues in manured soils after sprinkler irrigation" (UBA-FKZ 20267435)^{##}. In both projects contemporarily managed in the Institute of Ecological Chemistry and Waste Analysis, Technical University of Braunschweig, laboratory test systems have been designed to investigate sorption and degradation as concentration determining processes for pharmaceutical residues in soils.

In the first approach of the multistep research concept applied, basic data on adsorption/desorption and biodegradability were gathered according to standard guidelines established in the registration procedure for pesticides. Thus, ¹⁴C-labelled target compounds were directly applied to two soils of different physico-chemical properties. Herefrom, first tendencies of persistence and mobility in soils under study have been revealed.

In the second more specific approach, chemical and photoinduced degradation processes were taken into account. In contrast to testing on biodegradability, chemical

[#] briefly: "Soil Project"

^{##} briefly: "Runoff Project"

processes were monitored in microbially inactive soil samples. Photoinduced effects on microbial and chemical degradation were monitored in a special irradiation apparatus to simulate additionally field conditions. Supplementary to soil/water distribution coefficients, column and laboratory lysimeter experiments were conducted with special respect to leaching by matrix and preferential flow. Thereby, the use of closed apparatus facilitated the determination of leaching and degradation as simultaneously occurring processes.

In the third approach, the entry route via contaminated sewage sludge was simulated by the application of test sludges^{###} with defined aged residues. According to this innovative experimental design, parent compounds^{####} or metabolites formed during the short-term sludge storage were applied as extractable or non-extractable residues to the soil samples under study. Furthermore, in contrast to the standard application, matrix effects of the sewage sludge on degradation and leaching of pharmaceutical residues in soil could be assessed.

Fate of pharmaceutical target compounds

The target compounds diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, diazepam, paracetamol, sulphonamethoxazole and acetyl-sulfamethoxazole were applied as ¹⁴C-labelled radiotracers. Therefore, detailed mass balances were set up considering the mineralisation and the formation of extractable and non-extractable residues. On the basis of the persistence criteria, which have been established for pesticides as DT₉₀ > 100 days, mineralisation < 5 % and formation of non-extractable residues > 70 % in 100 days, the persistence of human pharmaceutical residues in soil environments was estimated.

^{###} "Test sludge" defines sewage sludge samples that have been fortified with the respective ¹⁴C-labelled pharmaceutical substance and stored for 7 days to simulate short-term ageing processes of the pharmaceutical residues.

^{####} In the discussion of the metabolite screening analyses, the respective parent compound is definitely revealed by e.g. "¹⁴C-ibuprofen as the parent compound". The total residues are identified by the terms of e.g. "¹⁴C-ibuprofen residues" or "% of initially applied radioactivity" without that parent compounds and metabolites have been distinguished analytically.

The slight mobility of **¹⁴C-Diclofenac** in clayey silt and silty sand soil was revealed by soil/water distribution coefficients (K_d values) of 8 and 10 L kg⁻¹, respectively. This tendency slightly increased after test sludge application####. Due to the biodegradability, differences were found in both soils. In clayey silt soil, ¹⁴C-diclofenac formed non-extractable residues of > 70 % within 100 days. Contrary to this, the extractable residues predominated the non-extractable ones in the silty sand soil. In the extractable fraction, ¹⁴C-diclofenac was identified as the parent compound until 56 days after application. The DT₅₀ value was calculated to be 2 days. According to the total mineralisation, only little differences occurred. A two-phase mineralisation process, found in the batches with clayey silt soil samples, though indicated a release of ¹⁴C-carbon dioxide out of the non-extractable fraction. Since these non-extractable residues were only formed in microbially active soil samples, their formation has considered to be dependent on the microbial degradation and to be rather independent on sorption processes in soil. Furthermore, it was distinctive that degradation of ¹⁴C-diclofenac in soil could not be enhanced by means of irradiation although diclofenac has been identified as a photosensitive substance in water/sediment systems.

A similar fate in soil was revealed for the structural analogues **¹⁴C-ibuprofen** and **¹⁴C-ketoprofen**. Independent on standard or test sludge application, highest mobility in soil was derived for ¹⁴C-ketoprofen from K_d values of < 6 L kg⁻¹. Within the initial incubation intervals of the batch experiments, ¹⁴C-ibuprofen was degraded more rapidly. Later on, these differences to ¹⁴C-ketoprofen were compensated. According to amounts of 40 % mineralisation and non-extractable residues each, both propionic acid derivatives were classified as impersistent substances revealed by DT₅₀ < 1 or 3 days. In the short-term tests, similar tendencies to ¹⁴C-diclofenac were found. Mineralisation and non-extractable residues predominated in microbially active soil samples, particularly in the clayey silt soil. This fact was emphasised in batches at different soil temperatures and soil moisture contents. Particularly in dry soil samples, the degradability was extremely reduced due to the inhibition of the microbial activity. The temperature effect was less relevant.

By the "test sludge application", ¹⁴C-labelled pharmaceutical residues containing the parent compound initially applied, metabolites and non-extractable residues formed during the sludge storage, were fortified in the batch equilibrium tests. Therefore, the determined K_d values correspond to the total residues (e.g. ¹⁴C-ibuprofen residues).

In the stability tests of both substances in sewage sludge, similar tendencies were found as they occurred in silty sand soil. After the application of 7–days aged test sludge, in which the residues of both parent compounds amounted on average 13 % and 24 %, respectively, non-extractable residues were formed more rapidly. At the end of the incubation period, ¹⁴C-carbon dioxide was released out of the non-extractable fraction.

In contrast to the mobility tendencies revealed by K_d values, ¹⁴C-ibuprofen residues underlined leaching in column and laboratory lysimeter tests. Especially in the clayey silt soil, column test systems turned out to be an artificial test design because leaching tendencies were overestimated compared to laboratory lysimeter tests. This fact was clearly pointed out by the simultaneous determination of leaching and degradation. Under saturated water flow, mineralisation dropped down indicating the inhibition of the microbial activity. In small-sized cores of undisturbed soil samples under unsaturated water flow, mineralisation rates were found to be as high as in batch biodegradability tests. However, leaching was affected by the soil structure during soil sampling. By enhancing the undisturbed soil monolith to 30 cm depth and 15 cm ID, the breakthrough of ¹⁴C-ibuprofen residues was reduced to 3 % of the radioactivity initially applied. Thus, only a slight mobility of ¹⁴C-ibuprofen residues was found. The moderate mobility of ¹⁴C-ketoprofen revealed by low K_d values was also reflected by the leaching tendencies determined in the small-size lysimeter tests.

In comparison to the other target compounds, fate and behaviour of the basic compound **¹⁴C-diazepam** was different. Although this 1,4-benzodiazepine derivative is rapidly degraded in the human metabolism, microbial, chemical or photoinduced degradation processes in soils were not considered relevant. Its persistence in soil was revealed by $DT_{90} > 100$ days and mineralisation rates < 5 % within 100 days. A slight mobility was derived from K_d values of 13 L kg⁻¹ for clayey silt and of 20 L kg⁻¹ for silty sand. An impact of the test sludge matrix reflected by K_d value determination could not be confirmed by small-size lysimeter tests.

Another exceptional position accounted for **¹⁴C-paracetamol**. Contrary to ¹⁴C-diazepam, however, fate in microbially active soils was predominated by the formation of non-extractable residues. Within the first days after standard application, > 80 % of the radioactivity initially applied was remained non-extractable. Due to this extremely high

disappearance time, the parent compound itself seemed to be fixed in the soil matrix. Until the end of the incubation period, a decrease of non-extractable amounts was accompanied by an enhanced release of ^{14}C -carbon dioxide. In first tests on the remobilisation of non-extractable ^{14}C -paracetamol residues, only 3 % of the radioactivity were released as ^{14}C -carbon dioxide and only 0.4 % were transferred into the extractable fraction emphasising a relevant bonding strength to the soil matrix.

During the stability tests in sewage sludge, however, a less distinctive persistence was found. Within 7 days after application, 60 % of the radiotracer applied disappeared and the extracts were dominated by corresponding metabolites. After test sludge application, the fate in soil was determined again by the formation of non-extractable residues. This affinity of ^{14}C -paracetamol residues was also reflected by K_d values of 46 L kg $^{-1}$ for clayey silt and of 36 L kg $^{-1}$ for silty sand which revealed only a slight mobile to immobile compound.

In batch experiments on the biodegradability of **^{14}C -sulfamethoxazole** and **^{14}C -acetyl-sulfamethoxazole** in soils, persistence criteria were fulfilled by low mineralisation rate and a relevant formation of non-extractable residues. The latter was accelerated by the test sludge application. For the metabolic fate of ^{14}C -acetyl-sulfamethoxazole in soil, the hydrolytic decomposition to ^{14}C -sulfamethoxazole had to be considered relevant. In contrast to the antiphlogistica under study, non-extractable residues were also formed in microbially inactive soils applied in short-term tests in the dark and under irradiation. Indeed, the metabolite screening showed differences in the extractable fractions of microbially active and inactive soil samples. In the first ones, the parent compounds applied were accompanied by unknown metabolites while in the latter ones only the parent compounds were detected.

The mobility of both target compounds were reflected by low K_d values and shown by the small-size lysimeter tests. After standard and test sludge application, the breakthrough of ^{14}C -sulfamethoxazole and ^{14}C -acetyl-sulfamethoxazole residues thus amounted to 13-40 % and 13-31 %, respectively. In the percolates of the latter tests, ^{14}C -sulfamethoxazole was found again as the hydrolytic decomposition product of ^{14}C -acetyl-sulfamethoxazole. Finally, both sulfonamide derivatives were considered mobile in these small-size silty clay soil cores.

Needs of additional research activities

In the frame of the registration procedures of human and veterinary medicines, the investigation on fate and behaviour of residues in soils is focused on laboratory tests. A multistep concept from laboratory and lysimeter trials to perennial field studies, as it has been established in the registration of pesticides, cannot be short-dated realised. Especially, the implementation of realistic field studies, as they are common practice for pesticides, will cause difficulties in the ecological acceptance against the application of the medicines under field conditions. Therefore, more sophisticated laboratory test systems will be needed. The experimental design developed and applied here, already showed that the determination of DT₅₀, DT₉₀, K_d and K_{OC} values after standard application did not supply a thorough characterisation of fate and behaviour. Particularly the entry route of human and veterinary pharmaceutical residues via contaminated sewage sludge or manure cannot be understood in this way.

The laboratory test systems developed in the "Soil Project" and the "Runoff Project" have been directed in this tenor. The mobility tests, e.g. on ¹⁴C-ibuprofen, have shown that leaching tendencies can be reliably assessed only by the application of laboratory lysimeter tests simulating a 30-cm flow distance of an Ap horizon. Nevertheless, the development of this laboratory lysimeter test system has to be continued to realise self-controlled irrigation measures that remained aerobic conditions under unsaturated water flow. For the risk assessment of groundwater contamination, additional lysimeter and field studies will be necessary.

Further research activities should be focused on the experimental design of stability tests in sewage sludge and liquid manure. Especially for veterinary pharmaceutical residues, the entry route via contaminated manure into soil environments has been well understood. Therefore, the stability of those compounds during the manure storage should be incorporated into the environmental risk assessment for soils. According to the technical preparation of a catalogue of standard operation procedures, additional research on different storage periods and storage conditions will be required. These tests will consequently cause methods for the preparation of test sludge and test slurry with defined aged pharmaceutical residues and their application in laboratory tests on microbial, chemical and photoinduced degradation as well as on mobility in soils.

The laboratory tests within the "Soil Project" and the "Runoff Project" clearly showed that the fate of several pharmaceutical medicines have been dominated by the formation of non-extractable residues. This special affinity to the soil matrix has been implied

to characterise the persistence of pesticides and related chemicals although the bonding characteristics have not been understood in detail. Therefore, additional tests on their formation in microbially active soil samples should be carried out for e.g. paracetamol and sulfonamides. Especially the fact that this process is accelerated by the application of test sludge or test slurry should be taken into account with respect to the real entry routes. Sequential extraction techniques, starting with e.g. calcium chloride solution, followed by organic solvents of different polarity and extraction power and finally by derivatisation techniques, will facilitate to investigate bonding strengths and remobilisation tendencies. Metabolite screening analyses of the resulting extracts will possibly identify parent compounds, metabolites or other decomposition products of high affinity to the soil matrices. Additionally, the tests on remobilisation of non-extractable pharmaceutical residues, in which the activated sludge application enhanced the microbial activity of the soil samples already extracted, should be advanced. Furthermore, ecotoxicological testing may contribute to characterise non-extractable residues. According to the concepts and principles of environmental chemistry and ecotoxicology, these innovative research activities will be considered relevant to assess fate and behaviour of human and veterinary pharmaceutical residues in soils. Supplemented by mathematical fate modelling, it will be possible to specify criteria for environmental risk assessment.

8. Literaturverzeichnis

- Agnihotri, N.P., Barooah, A.K. (1994): Bound residues of pesticides in soil and plant - A review. *J. Sci. Ind. Res.*, 53, 850-861.
- Anderson, J.P.E., Domsch, H. (1987): A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 215-221.
- Balizs, G., Benesch-Girke, L., Börner, S., Hewitt, S.A. (1994): Comparison of the determination of four sulphonamides and their N⁴-acetyl metabolites in swine muscle tissue using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectral detection. *J. Chromatogr. B*, 661, 75-84.
- BBA (1986a): Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden -Abbau, Umwandlung und Metabolismus. Richtlinien für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, ACO Druck, Braunschweig.
- BBA (1986b): Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln. Richtlinien für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, ACO Druck, Braunschweig.
- BBA (1990): Auswirkungen auf die Bodenmikroflora. Richtlinien für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 1-1. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, ACO Druck, Braunschweig.
- BBA (1992): Bewertung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren. *Mitt. a.d. Biol. Bundesanst.*, 284, 61-65.
- BBA (1998). Data requirement and criteria for decision-making in the European Union and the Federal Republic of Germany for the authorization procedure of plant protection products. *Mitt. a. d. Biol. Bundesanst.*, 358, 63-68.
- Boesten, J.J.T.I. (1990): Influence of solid/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil systems. *Pestic. Sci.*, 12, 484-494.
- Boxall A.B.A, Blackwell, P., Cavallo, R., Kay, P., Tolls, J. (2002): The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicol. Lett.*, 131, 19-28.
- Buser, H.R., Poiger, T., Müller, M.D. (1998): Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: Rapid photodegradation in a lake. *Environ. Sci. Technol.*, 32 (22), 3449-3456.
- Dünge-Verordnung (1997): BGBl., I, 1835.

- EMEA (1998): Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-containingt and immunological products. EMEA/CVMP/055/96-FINAL.
- EMEA (2001): Discussion paper on environmental risk assessment of non-genetically modified organism (NON-GMO) containing medicinal products for human use. Committee for proprietary medicinal products, CPMP/SWP/4447/00 draft corr.
- Encinas, S., Bosca, F., Miranda, M.A. (1998): Phototoxicity associated with diclofenac: a photophysical, photochemical, and photobiological study on the drug and its photoproducts. *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 946-952.
- Fichter, P.M., Holden, P.W. (1992): A field study to meet United States Environmental Protection Agency regulatory for measurement of movement of pesticides to ground water. *Brighton Crop Protect. Conf. Pests and Diseases*, 7C (15), 853-858.
- Gawlik, B.M., Bo, F., Kettrup, A., Muntau, H. (1999): Characterisation of the second generation of European reference soils for sorption studies in the framework of chemical testing – Part I: chemical composition and pedological properties. *Sci. Total Environ.*, 229, 99-107.
- Gevao, B., Semple, K.T., Jones, K.C. (2000): Bound pesticide residues in soils: a review. *Environ. Pollut.*, 108, 3-14.
- Haberer, K., Ternes, T.A. (1996): Bedeutung von wasserwerksgängigen Metaboliten für die Trinkwasserversorgung. *gwf Wasser Abwasser*, 137 (10), 573-578.
- Hartig, C., Storm, T., Jekel, M. (1999): Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 854, 163-173.
- Heberer, T., Dünnbier, U., Reilich, C., Stan, H-J. (1997): Detection of drug metabolites in ground water samples of a drinking water treatment plant. *Fresenius Envir. Bull.*, 6, 438-443.
- Heberer, T., Stan, H-J. (1996): Vorkommen von polaren organischen Kontaminanten im Berliner Trinkwasser. *Vom Wasser*, 86, 19-31.
- Heberer, T., Stan, H-J. (1998): Arzneimittellrückstände im aquatischen System. *Wasser & Boden*, 50 (4), 20-25.
- Hirsch, R., Ternes, T.A., Haberer, K., Kratz, K-L. (1996): Nachweis von Betablockern und Bronchospasmolytika in der aquatischen Umwelt. *Vom Wasser*, 87, 263-274.
- Höllrigl-Rosta, A., Kreuzig, R. und Bahadir, M. (1999): Investigations on the metabolic fate of prochloraz in soil under field and laboratory conditions. *Pestic. Sci.*, 55 (5), 531-538.

- Hoeschen, G. (1997): Abbau von Morpholinfungiziden in Böden in Abhängigkeit vom Gehalt an Tonmineralen und Huminstoffen. Diplomarbeit, TU Braunschweig.
- Höltge, S. (2005): Zum Rückstandsverhalten von Veterinärpharmaka in güllgedüngten Böden - Labortests und Testplot-Experimente. Dissertation, TU Braunschweig. (in Vorbereitung).
- Hollis, J.M. (1991): Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale: In: Walker, A. (Ed.), Monograph No. 47. Pesticides in soils and water: current perspectives. Proceedings of a symposiumorganised by the British Crop Protection Council. University of Warwick, Coventry, UK.
- Klärschlamm-Verordnung (2002): BGBl. I, 912.
- Kögl-Knabner, I., Maxin, C., Totsche, K., Danzer, J. (1993): Co-Transport und Co-Sorption von PAK in Böden. Mittelg. Deut. Bodenk. Gesellsch., 63, 119-122.
- Kreuzig, R. (1998): Entwicklung analytischer Methoden zur Differenzierung von Abbau und Sorption als konzentrationsbestimmenden Prozessen für Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffe in Böden. Habilitationsschrift, TU Braunschweig, ISBN 3-89720-291-3, 1-189.
- Kreuzig, R., Dieckmann H. (1999): Untersuchungen zur mikrobiellen Abbaubarkeit von U-¹⁴C-Phenylring- und ¹⁴C-Morpholinring-markiertem Fenpropimorph in Boden. Unveröffentlichte Ergebnisse.
- Kreuzig, R., Höltge, S. (2005): Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soils: Laboratory experiments and test plot studies. Environ. Toxicol. Chem., 24, 260-265 .
- Kreuzig, R., Höltge, S., Brunotte, J., Berenzen, N., Wogram, J., Schulz, R. (2005a): Test plot studies on runoff of sulfonamides from manured soils after sprinkler irrigation. Environ. Toxicol. Chem., 24, 266-270.
- Kreuzig, R., Kullmer, C., Mathies, B., Höltge, S., Dieckmann, H. (2003): Fate and behaviour of pharmaceutical residues in soils. Fresenius Environ. Bull., 12 (6), 550-558.
- Kreuzig, R., Plaga, B., Kullmer, C., Dieckmann, H. (2005b): Laboratory testing on degradation and leaching as simultaneously occurring processes for ibuprofen in soil. Sci. Total Environ. (in Vorbereitung).
- Kukowski, H., Brümmer, G. (1997): UBA-Forschungsbericht 10602045, Teil 2. In: Schachtschabel, P., Blume, H.P., Brümmer, G., Hartge, K.H. und Schwertmann,

- U. (1998): Scheffer/Schachtschabel Lehrbuch der Bodenkunde. 14. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Kullmer, Ch. (2005): Humanpharmaka in Böden – Labortests zu Abbau und Sorption. Dissertation, TU Braunschweig. (in Vorbereitung).
- Langhammer, J.P. (1989): Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Diss., Universität Bonn.
- LUFA (2003): Bodeneigenschaften von Referenzböden. <http://lufa-speyer.de>.
- Matthies, B. (2002): Untersuchungen zum Sorptions- und Abbauverhalten des Antiphlogistikums Diclofenac in Böden. Diplomarbeit, TU Braunschweig.
- Moore, D. E., Roberts-Thomson, S., Zhen, D. und Duke, C. C. (1990): Photochemical studies on the anti-inflammatory drug diclofenac. Photochem. Photobiol., 52, 4, 685-690.
- Mutschler, E. (1991): Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Nordmeyer, H., Aderhold, D. (1994): Aufbau und Betrieb einer Lysimeterstation zur Erfassung der Verlagerung von Pflanzenschutzmitteln im Bodenprofil. Z. Pflanzenähr. Bodenk., 157, 93-98.
- OECD (1981a): Guideline for the testing of chemicals. Inherent biodegradability in soil. 304 A, 1-11.
- OECD (1981b): Guideline for testing of chemicals. Adsorption/Desorption. 106, 1-18.
- OECD (2000): C. 18. Adsorption/desorption using a batch equilibrium method. In: Commission Directive 2001/59/EC. Off. J. Europ. Commun., L 25, 200-237.
- OECD (2002a): Guideline 307 for the testing of chemicals. Aerobic and anaerobic transformation in soil. OECD, Paris.
- OECD (2002b): Guideline for testing of chemicals. Proposal for a new guideline. Photo-transformation of chemicals on soil surfaces. OECD, Paris.
- OECD (2002c): Guideline for testing of chemicals. Leaching in soil columns. Revised proposal for a new guideline 312. 1-15.
- Oepen von, B., Kördel, W., Klein, W. (1991): Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106. Chemosphere, 22 (3-4), 285-304.
- Oppel, J. (2002): Verhalten von Pharmaka in Bodentestsystemen – Eine Risikoabschätzung für den Boden- und Grundwasserschutz. Diplomarbeit, Universität

Münster.

- Oppel, J., Broll, G., Löffler, D., Meller, M., Römbke, J., Ternes, T.A. (2004): Leaching behavior of pharmaceuticals in soil-testing-systems: A part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Sci. Total Environ.*, 328, 265-273.
- Poiger, T., Buser, H. R. und Müller, M. D. (2001): Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: pathway, field measurements, and mathematical modelling. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 2, 256-263.
- Roberts, T.R. (1984): Non-extractable pesticide residues in soils and plants. *Pure Appl. Chem.*, 56 (7), 945-956.
- Rönnefahrt, I., Koschorrek, J. und Kolossa-Gehring, M. (2002): Arzneimittel in der Umwelt – Teil 2: Rechtliche Aspekte und Bewertungskonzepte. *Mittlg. FG Umweltchem. Ökotox.*, 8 (4), 6-9.
- Roth, H.J., Fenner, H. (1994): *Arzneistoffe*. Georg Thieme.
- Rückert, M. (1997): Untersuchungen zum Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Böden unter besonderer Berücksichtigung korrespondierender Metabolite und gebundener Rückstände. Dissertation, TU Braunschweig, ISBN 3-89720-116-X.
- Rüters, H., Höllrigl-Rosta, A., Kreuzig, R., Bahadir, M. (1999): Sorption behaviour of prochloraz in different soil. *J. Agric. Food. Chem.*, 47 (3), 1242-1246.
- Sacher, F., Lochow, E., Bethmann, D., Brauch, H-J. (1998): Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächengewässern. *Vom Wasser*, 90, 233-243.
- Spengler, P., Körner, W. und Metzger, J. W. (1999): Schwer abbaubare Substanzen mit östrogenartiger Wirkung im Abwasser von kommunalen und industriellen Kläranlagenabläufen. *Vom Wasser*, 93, 141-157.
- Steger-Hartmann, T., Kümmerer, K. und Schecker, J. (1999): Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two-step solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 726, 179-184.
- Stockmaier, M. (1996): Investigations on the behaviour of fenpropimorph and fenpropimorphic acid in soil. *Pestic. Sci.*, 46, 361-367.
- Stockmaier, M., Kreuzig, R., Bahadir, M. (1997): Labor- und Felduntersuchungen zum Abbau- und Sorptionsverhalten des Morpholinfungizids Aldimorph im Boden. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.*, 49 (1), 5-10.
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Haberer, K., Seel, P., Baumann W. (1996a): Nachweis von

- Arzneimittelrückständen in Kläranlagen und Fließgewässern. Vom Wasser, 86, 291-303.
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Haberer, K., Baumann, W. (1996b): Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. Vom Wasser, 87, 251-261.
- Ternes, T. A. (1998): Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. Wat. Res., 31 (11), 3245-3260.
- Ternes, T.A., Kreckel, P. und Mueller, J. (1999): Behaviour and occurrence of estrogens in municipale sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. Sci. Total Environ., 225, 91-99.
- Ternes, T. (2001): Vorkommen von Pharmaka in Gewässern. Wasser & Boden, 53, 4,9-14.
- Thiele-Bruhn, S. (2003): Pharmaceutical antibiotic compounds in soils- a review. J. Plant Nutr. Soil Sci., 166, 145-167.
- Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986): Zur statistischen Interpretation und graphischen Darstellung des Abbauverhaltens von Pflanzenschutzmittel-Rückständen. II. Pflanzenschutz-Nachr. Bayer, 39, 188-204.
- TVO (2001): Verordnung zur Novellierung der Trinkwasserverordnung vom 21. Mai 2001.
- Wang, W. (1999): Investigations on the behavior of the carbamate insecticide pirimicarb and the thiocarbamate herbicide triallate and their metabolites in soil. Dissertation, Technische Universität Braunschweig, 1-120.
- Wang, W., Kreuzig, R., Bahadir, M. (1998): Laboratory lysimeter experiments on leaching of triallate and its metabolite 2,3,3-trichloro-prop-2-en-sulfonic acid in soil. Fresenius Environ. Bull., 7, 627-634.